

Inaugural – Dissertation

Zur
Erlangung der Doktorwürde (Dr. rer. nat.)
der
Gesamtfakultät für Mathematik,
Ingenieur- und Naturwissenschaften
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Christian Busch, M.Sc.

Geboren in
Ludwigshafen am Rhein

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2025

Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus
für parallele Neutronenreflektometrie,
ATR-Infrarotspektroskopie und Ellipsometrie
zur Untersuchung der Interaktion von
Gold-Nanopartikeln mit biomimetischen
Membranen

Gutachter: Prof. Dr. (apl.) Reiner Dahint
Prof. Dr. Motomu Tanaka

Kurzzusammenfassung

Neutronenreflektometrie ist eine zerstörungsfreie Methode der Untersuchung schichtförmig aufgebauter Proben, die die Möglichkeit bietet, deren Aufbau und Zusammensetzung zu ermitteln. Jedoch ist die Auswertung erhaltener Reflexionsprofile aufwändig und kann häufig mit mehreren Modellen ähnlich gut beschrieben werden. Besonders für Untersuchungen weicher Materie sind so fundierte Aussagen zu den Eigenschaften der Probe oft nicht möglich. Um diese Probleme zu beheben hat sich die Anwendung komplementärer Messtechniken bewährt, womit der mögliche Parameterraum der zur Anpassung der Reflexionsprofile verwendeten Modelle eingegrenzt wird. Diese Techniken können an separaten Proben oder zur parallelen Charakterisierung an einer einzigen Probe angewandt werden. Letzteres bietet den Vorteil, dass mögliche Probe-zu-Probe Unterschiede vermieden werden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung zweier Messaufbauten zur parallelen Anwendung von Neutronenreflektometrie, ATR-Infrarotspektroskopie und spektraler Ellipsometrie. Die parallele Verwendung dieser Techniken ermöglicht es, ihre individuellen Schwächen auszugleichen. Die Messaufbauten wurden als mobile Aufsätze für zwei Reflektometer des Institut Laue-Langevin in Grenoble, Frankreich entwickelt, von denen eines für horizontale und das andere für vertikale Probenorientierungen ausgelegt ist. Die Entwicklung des Aufbaus für horizontale Probenorientierungen wird anhand mehrerer Entwicklungsstufen beschrieben. Dabei werden die Erkenntnisse der einzelnen Stufen anhand von Pilotexperimenten gezeigt und die daraus gefolgerten Schlüsse für die Weiterentwicklung des Aufbaus dargelegt. Der zweite Aufbau wird dann ohne Prototypen oder Zwischenstufen auf Grundlage der Erkenntnisse des ersten Aufbaus entworfen. Die Aufbauten demonstrieren das Potential komplementärere Messapparaturen zur Untersuchung weicher Materie, insbesondere für kinetische Messungen, wobei auch die abweichenden Ergebnisse der einzelnen Methoden sowie etwaige Probleme, die beim Umgang mit den Apparaturen auftreten können, aufgezeigt werden.

Mithilfe der Messaufbauten, sowie separater Messungen mit den darin kombinierten Techniken wird die Interaktion von Gold-Nanopartikeln und Salzlösungen mit biomimetischen Lipid-Membranen unterschiedlicher Komplexität untersucht. Es werden zunächst die Eigenschaften von DMPC-Oligobilagen in trockenem Zustand untersucht und die Phasenübergangstemperatur mithilfe von IR-Spektroskopie überprüft. Die Untersuchung der Interaktion mit Fremdmolekülen erfolgt dann in wässrigem Milieu. Einlagerung von Cholesterol und eines integralen Membranproteins zeigt stabilisierende Effekte auf die Oligobilagen. Eine Anlagerung eines peripheren Membranproteins an geladene oberflächenadsorbierte Bilagen wird demonstriert. Zwar kann ein Einfluss der Nanopartikel auf die Bilagenstrukturen gezeigt werden, jedoch keine Anzeichen auf Änderungen der Strukturen beider Proteine.

In weiteren Untersuchungen wird der enzymatische Verdauungsprozess von Membranproteinen durch eine Peptidase untersucht. Hierbei werden neben den Proteinen auch biologische Membranen verwendet. Während das integrale Protein keinen Abbau durch die Peptidase zeigt, kann für das periphere Protein, sowie die biologischen Membranen ein Abbauprozess gezeigt werden. Im Falle der letztgenannten Proben wird auch die kinetische Untersuchung des Prozesses gezeigt.

Darüber hinaus werden mithilfe off-spekularer Neutronenreflektometrie die mechanischen Eigenschaften von Lipid-Multilagen untersucht, sowie der Einfluss von Polyelektrolyten auf diese. Die

Polyelektrolyte stellen dabei ein Modellsystem der zur Behandlung von Arthrose verwendeten Viskosupplementation mit Hyaluronsäure dar. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen einen starken Quellprozess durch die Einwirkung der Polyelektrolyte, jedoch sind die erhaltenen mechanischen Parameter aufgrund der Datenqualität wenig aufschlussreich.

Abstract

Neutron reflectometry is a non-destructive method of examining samples with a layered structure, which enables the determination of their structure and composition. However, evaluation of the obtained reflection profiles is complex and can often be described similarly well using several models. Particularly for investigations of soft matter, it is often not possible to make well-founded statements about the properties of the sample. To overcome these problems, the use of complementary measurement techniques has proven to be effective, limiting the possible parameter space of the models used to fit the reflection profiles. These techniques can be used with separate samples or a single sample for parallel characterization. The latter offers the advantage of avoiding possible sample-to-sample differences.

The present work deals with the development of two measurement setups for the parallel application of neutron reflectometry, ATR infrared spectroscopy and spectral ellipsometry. The parallel use of these techniques makes it possible to compensate for their individual weaknesses. The measurement setups were developed as mobile attachments for two reflectometers at the Institute Laue-Langevin in Grenoble, France, one of which is designed for horizontal and the other for vertical sample orientations. The development of the setup for horizontal sample orientations is described based on several development stages. The findings of the individual stages are shown on the basis of pilot experiments and the conclusions drawn for the further development of the setup are presented. The second setup is then designed without prototypes or intermediate stages based on the findings of the first setup. The setups demonstrate the potential of complementary measuring techniques for investigating soft matter, particularly for kinetic measurements, while also highlighting the deviating results of the individual methods and any problems that may arise when handling the setups.

The interaction of gold nanoparticles and salt solutions with biomimetic lipid membranes of varying complexity is investigated using the measurement setups and separate measurements with the techniques implemented in the combined setup. First, the properties of DMPC oligobilayers in the dry state are investigated and the phase transition temperature is checked using IR spectroscopy. The interaction with foreign molecules is then investigated in an aqueous environment. Incorporation of cholesterol and an integral membrane protein shows stabilizing effects on the oligobilayers. Attachment of a peripheral membrane protein to charged surface-adsorbed bilayers is demonstrated. Although an influence of the nanoparticles on the bilayer structures can be shown, there is no evidence of changes in the structures of both proteins.

In further investigations, the enzymatic digestion process of membrane proteins by a peptidase is studied. In addition to the proteins from previous investigations, biological membranes are used. While the integral protein shows no degradation by the peptidase, a degradation process can be shown for the peripheral protein and the biological membranes. In the case of the latter samples, kinetic investigation of the process is also shown.

In addition, off-specular neutron reflectometry is used to investigate the mechanical properties of lipid multilayers and the influence of polyelectrolytes on them. The latter represents a model system for viscosupplementation with hyaluronic acid used in the treatment of osteoarthritis. The results of these investigations show a strong swelling process due to polyelectrolytes, but the mechanical parameters obtained are not very informative due to the quality of the data.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung und Motivation	1
2. Theoretische Grundlagen	5
2.1. Reflektometrie	5
2.1.1. Messinstrumente für Reflektometrie	10
2.1.2. Auswertung reflektometrischer Messreihen	12
2.1.3. Off-spekulare Reflektometrie	14
2.2. Ellipsometrie	16
2.3. Infrarotspektroskopie	19
2.3.1. ATR-Infrarotspektroskopie	22
2.4. Eukaryotische Zell-Membranen	23
2.4.1. Lipid-Bilagen	25
2.4.2. Membranproteine Zytochrom C und Gramicidin	29
2.5. Gold-Nanopartikel	30
3. Experimentaltteil	33
3.1. Liste verwendeter Chemikalien	33
3.2. Verwendete Software	34
3.3. Chemische Synthese	35
3.3.1. Synthese von MACl	35
3.3.2. Synthese kationischer Gold-Nanopartikel	35
3.4. Probenpräparation	36
3.4.1. Reinigungsprotokolle	37
3.4.2. Präparation von Lipid-Oligobilagen mit Rotationsbeschichtung	37
3.4.3. Präparation von Lipidvesikeln	40
3.4.4. Probenpräparation durch Tropfenguss	40
3.4.5. Präparation von selbstorganisierten Monoschichten auf Silizium-Substraten	40
3.5. Reflektometrie	41
3.6. Ellipsometrie	44
3.7. ATR-Infrarotspektroskopie	44

3.7.1. Simulation von Absorptionsbanden in ATR-FTIR	45
3.7.2. Simulation kinetischer Messungen in ATR-FTIR.....	47
3.8. Elektronenmikroskopie	49
4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie	51
4.1. Vorüberlegungen	52
4.2. Erster Prototyp für horizontale Probengeometrien und Test an FIGARO	53
4.2.1. Reduktion des Strahldurchmessers mit fokussierender Optik	54
4.2.2. Strahlführung des FIGARO-Prototyps.....	55
4.3. Kombierter Messaufbau für NR und ATR-FTIR	58
4.3.1. Erste kombinierte Messungen von ATR-FTIR und NR an FIGARO	59
4.4. Erweiterung des Messaufbaus für horizontale Probengeometrien um spektrale Ellipsometrie .	65
4.4.1. Kombinierte Messungen von NR, ATR-FTIR und SE an FIGARO.....	67
4.5. Kombierter Messaufbau für vertikale Probengeometrie und Tests an D17	73
4.5.1. Kombinierte Messungen von NR, ATR-FTIR und SE an D17.....	75
4.5.2. Kompatibilität des Aufbaus zu anderen Reflektometern.....	83
4.6. Zusammenfassung und Ausblick zur Entwicklung der kombinierten Messaufbauten.....	84
5. Untersuchung der Interaktion von kationischen Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Bilagen	89
5.1. Vorcharakterisierungen trockener Lipid-Oligobilagen mit SE, ATR-IR-Spektroskopie und XRR	90
5.2. Einfluss der DMPC-Konzentration auf die Probendicke von Oligobilagen-Proben bei Rotationsbeschichtung.....	90
5.2.1. Einfluss der Probendicke auf die Intensität der Methylen-Valenzschwingungsbande in ATR-IR-Spektroskopie.....	92
5.2.2. Einfluss von Cholesterol auf die Struktur von DMPC-Oligobilagen	95
5.3. Hydratisierte DMPC-Oligobilagen.....	100
5.3.1. Phasenübergangstemperatur von hydratisierten DMPC-Oligobilagen.....	100
5.3.2. Interaktion von hydratisierten DMPC-Oligobilagen mit Gold-Nanopartikeln und Magnesiumchlorid.....	103
5.4. Interaktion hydratisierter Lipid-Oligobilagen aus DMPC und Cholesterol mit Gold-Nanopartikeln und Magnesiumchlorid	113
6. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit integralem Gramicidin	125
6.1. Gramicidin-haltige Lipid-Oligobilagen.....	126
6.1.1. Voruntersuchungen von Gramicidin-haltigen Lipid-Oligobilagen mit ATR-FTIR	126

6.1.2. Untersuchung proteinhaltiger Lipid-Oligobilagen mithilfe komplementärer Messtechniken	131
6.2. Gramicidin auf hydrophoben Oberflächen.....	140
7. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit peripherem Zytochrom C.....	145
7.1. DMPC-Bilagen adsorbiertem Zytochrom C.....	145
7.2. Zytochrom C auf geladenen Lipid-Bilagen.....	147
7.3. Zytochrom C auf hydrophoben Oberflächen.....	151
8. Untersuchung des enzymatischen Abbaus von Proteinen durch Chymotrypsin.....	153
8.1. Enzymatischer Abbau von Membranproteinen	153
8.1.1. Enzymatischer Abbau von Gramicidin	153
8.1.2. Enzymatischer Abbau von Zytochrom C	155
8.2. Enzymatischer Abbau biologischer Zellmembranen.....	156
9. Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von DMPC-Multilagen mit off-spekularer Neutronenstreuung	163
9.1. Probenvorbereitung und Analytik	164
9.2. Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften von DMPC-Multilagen unter Einfluss von PAH.....	167
9.2.1. Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die mechanischen Eigenschaften von DMPC-Multilagen	169
9.2.2. Einfluss von D ₂ O und PAH auf die mechanischen Eigenschaften von DMPC-Multilagen	172
9.3. Untersuchungen der mechanischen Parameter von DMPC-Multilagen unter Einfluss von HS176	176
9.4. Diskussion der Untersuchungen mechanischer Parameter an DMPC-Multilagen	177
10. Zusammenfassung und Ausblick	181
10.1. Entwicklung kombinierter Messapparaturen.....	181
10.2. Interaktionen von Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Oligobilagen	184
10.3. Untersuchungen an Lipidfilmen mit Membranproteinen	185
10.4. Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Lipid-Multilagen.....	187
11. Literaturverzeichnis	i
12. Anhang	vii
12.1. Einfluss der Verkipfung des Probenstisches auf erhaltene IR-Spektren in IRRAS-Konfiguration	vii
12.2. Aufkommen von Etalons bei Probenmanipulation.....	viii
Danksagungen	xi
Abbildungsverzeichnis.....	xiii

Tabellenverzeichnis.....	xxiii
Abkürzungsverzeichnis	xxv
Eidesstattliche Erklärung	xxvii

1. Einleitung und Motivation

Bei der Reflektometrie handelt es sich um eine zerstörungsfreie Methode zur Untersuchung von Aufbau und Zusammensetzung schichtförmig aufgebauter Proben.^[1] Dabei werden diese unter flachem Winkel mit Röntgen- oder Neutronenstrahlung beleuchtet. Erstere Variante wird Röntgenreflektometrie genannt (X-ray reflectometry, XRR), letztere ist die Neutronenreflektometrie (NR). Die Reflexion der Strahlung wird in Abhängigkeit von Einfallswinkel oder Wellenlänge gemessen, wobei Interferenzmuster entstehen, deren Lage und Intensität Informationen zum Probenaufbau tragen.^[2] Dabei ist jedoch der Großteil der beinhalteten Informationen nicht direkt aus den Messdaten zugänglich. Stattdessen wird eine Modellierung der gemessenen Reflexionsprofile anhand einem geeigneten Probenmodell durchgeführt.^[3] Oft ist der ungefähre Aufbau der Probe initial bereits bekannt, weshalb hierfür Grundannahmen mithilfe von Literaturwerten getroffen werden können.^[4] Ein häufiges Anwendungsgebiet der Reflektometrie ist die Untersuchung weicher Materie. Jedoch sind gerade hier die in den Reflexionsprofilen enthaltenen Peaks und Oszillationen oft nur schwach ausgeprägt oder zum Beispiel aufgrund von Unregelmäßigkeiten im Probenaufbau verbreitert.^[1] Somit ist häufig unklar, ob das genutzte Modell die Probe tatsächlich beschreibt oder nur zufällig ein ähnliches Reflexionsprofil vorhersagt. Daher ist es wichtig, zusätzliche Informationen zur Probe zur Verfügung zu haben, die zur Verfeinerung der genutzten Modelle führen. Ein etablierter Ansatz hierfür ist die Verwendung komplementärer Messtechniken. Durch die zusätzliche Charakterisierung der Probe mithilfe dieser werden ergänzende Informationen erhalten. Die verwendeten Techniken reduzieren so gegenseitig den Spekulationsraum bei der jeweiligen Dateninterpretation.^[5-8] Als besonders wertvoll hat sich dabei die parallele Untersuchung der Proben mit komplementären Techniken erwiesen, da dies zusätzlich den Vorteil bietet, Probe-zu-Probe Unterschiede zu vermeiden.^[5]

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei Messaufbauten für Neutronenreflektometer des Institut Laue-Langevin in Grenoble, Frankreich zu konstruieren. Diese sollten neben NR die Möglichkeit der parallelen Probenuntersuchung durch Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) in abgeschwächter Totalreflexion (attenuated total reflection, ATR) und spektraler Ellipsometrie (SE) eröffnen. Die Aufbauten waren dabei als mobile Aufsätze für die Probentische der Reflektometer gedacht, womit weiterhin die flexible Nutzung der Reflektometer ermöglicht werden sollte. Interessierte Forschungsgruppen können die konstruierten Messaufbauten verwenden, um ihrerseits die Vorteile komplementärer Messtechniken zu nutzen. Diese sollten anhand einer Reihe von Pilotexperimenten demonstriert werden, welche außerdem Aufschluss über etwaige Probleme liefern und zur Verbesserung der Aufbauten genutzt werden sollten.

Mithilfe der kombinierten Messaufbauten, sowie separater Untersuchungen mithilfe von NR, XRR, ATR-FTIR-Spektroskopie und SE sollten außerdem die Interaktionen von Nanopartikeln (NP) mit biomimetischen Membranen unterschiedlicher Komplexität untersucht werden. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Untersuchung möglicher nanotoxischer Effekte der Partikel.

NPs sind größtenteils synthetische Materialien, welche viele nützliche Eigenschaften haben, die sie von ihren makroskopischen Gegenständen unterscheiden. Sie sind somit für Wissenschaft und Industrie von großem Interesse. So zeigen beispielsweise Gold-Nanopartikel (AuNP) in Abhängigkeit von ihrer Größe

1. Einleitung und Motivation

eine starke frequenzabhängige Oberflächenplasmonenresonanz, wodurch sie in Farben erscheinen, welche für gewöhnlich nicht mit dem Edelmetall assoziiert werden. Somit sind unter anderem für den Einsatz in Optiken und Sensoren von Interesse.^[9] Darüber hinaus sind sie vielversprechende Trägermaterialien für Medikamente in der Krebstherapie, da sie so funktionalisiert werden können, dass sie sich explizit in den betroffenen Organen anreichern und somit negative Nebenwirkungen der Chemotherapie reduziert werden.^[10] Durch Lichteinstrahlung ist ferner eine Erhitzung von ein- oder angelagerten AuNPs und dadurch eine lokale Schädigung von Krebsgewebe möglich.^[11] Nichtsdestoweniger birgt die ständig wachsende Exposition mit NPs erhebliche und zum Teil noch unbekannte gesundheitliche Risiken, insbesondere da sie aufgrund ihrer diversifizierten Anwendungsbereiche auf unterschiedliche Arten in Organismen eindringen können, wie Absorption über die Haut, Verschlucken oder Einatmen.^[12] So wird beispielsweise das Einatmen von NPs in Feinstaub mit einem erhöhten Risiko an Lungenkrebs zu erkranken in Verbindung gebracht.^[13] Bislang ist der Einfluss von Nanomaterialien auf Mensch und Umwelt noch unzureichend aufgeklärt und Gegenstand aktueller Forschung.

Für vorliegende Arbeit sollte Interaktion von kationischen AuNPs mit biomimetischen Membranen auf nanotoxische Wirkung, also Schädigung des Gewebes oder Funktion der Biomoleküle durch NPs untersucht werden. Hierzu werden Lipid-Oligobilagen präpariert, bestehend aus 10 bis 20 Bilagen, womit ein stärkerer Kontrast in den Reflexionsprofilen erreicht werden kann, als dies bei einzelnen substratgebundenen Bilagen der Fall ist. Somit sollte auch der Einfluss der NPs deutlicher sichtbar gemacht werden können. Darüber hinaus sind – mit Ausnahme der untersten, substratgebundenen Bilage – die einzelnen Lipidlagen weitgehend vom Trägermaterial entkoppelt und spiegeln somit die native Situation besser wider. Zunächst wird ein einfaches System aus reinen Phospholipiden untersucht, welches anschließend durch Inkorporation von Sterolen und Membranproteinen zu einem möglichst naturnahen Modellsystem für Zellmembranen erweitert wird. Ebenso werden Zellmembranen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR-Membranen) von Hasen-Muskelgewebe untersucht, welche von der Arbeitsgruppe Tanaka, Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt wurden. Neben der Interaktion von Lipidfilmen mit NPs wird auch der enzymatische Abbau proteinhaltiger Modell- und SR-Membranen durch das Verdauungsenzym Chymotrypsin untersucht.

Lipidfilme spielen auch in natürlichen Gelenken eine wichtige Rolle. Hier bedecken sie die Knorpelschicht und sorgen zusammen mit der Hyaluronsäure (hyaluronic acid, HS) enthaltenden Synovialflüssigkeit für eine deutliche Reibungsverminderung bei der Gelenkbewegung. Ein Abbau der Lipidschicht und nachfolgende Schädigung des Knorpels ist eine wesentliche Ursache für Arthrose. Medizinische Studien zeigen, dass in erkrankten Gelenken Konzentration und Molekulargewicht (molecular weight, MW) der HS reduziert sind. Mit einer neueren Behandlungsmethode, der sogenannten Viskosupplementation, wird daher versucht, durch Einspritzen von HS in das Gelenk dieses wieder zu regenerieren.^[14-15] Die Wirksamkeit der Methode wird jedoch bislang kontrovers diskutiert. In weiteren Untersuchungen soll daher der Einfluss von Polyelektrolyten, die als Ersatzstoffe für HS dienen, auf die mechanischen Eigenschaften von Lipid-Bilagen untersucht werden, um Rückschlüsse auf ihre Stabilität zu ziehen. Hierfür kommt off-spekuläre Neutronenreflektometrie zum Einsatz, um die Biegesteifigkeit und Kompressibilität von Lipid-Multilagen zu bestimmen. In vorherigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass die eingesetzten Polyelektrolyte einen vergleichbaren Einfluss auf das Quellverhalten und die Stabilität von Lipid-Oligobilagen gegen Scherkräfte haben wie HS. Es ist

somit naheliegend, dass sich dies auch in den mechanischen Eigenschaften der Lipidfilme widerspiegelt, was mit den hier präsentierten Untersuchungen nachgewiesen werden soll. Somit sollen tiefere Einblicke in die zugrundeliegenden Prozesse der Viskosupplementation gewonnen werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Reflektometrie

Reflektometrie von Neutronen und Röntgenstrahlung ist eine oberflächensensitive Messtechnik, mithilfe derer die chemische Zusammensetzung und der Aufbau dünner Proben auf unterschiedlichen Substraten bestimmt werden kann. Hierbei wird ein einfallender Strahl unter kleinen Winkeln an Grenzschichten reflektiert. Interferenz der teiltransmittierten Strahlung führt dabei zu einer Abweichung der gemessenen reflektierten Intensität von der sogenannten Fresnel-Reflexion, welche einen Abfall proportional zur vierten Potenz des Streuvektors vorhersagt. Durch Analyse der so aufgenommenen Reflexionsprofile können Rückschlüsse auf den Aufbau der Probe gezogen werden. Anwendung findet die Reflektometrie häufig in der Untersuchung biomolekularer Schichten, wie Lipid-Bilagen, jedoch auch in der Materialforschung an harter Materie.^[2-3, 16]

Im Folgenden werden die theoretischen Grundlagen der NR nach einschlägiger Literatur^[2-3, 17-19] hergeleitet, wobei an den relevanten Stellen auf Unterschiede zu XRR hingewiesen wird. Die mathematischen Grundlagen beider Methoden sind jedoch analog und die Unterschiede entstehen hauptsächlich durch die unterschiedliche Interaktion beider Strahlungen mit Materie.

Betrachtet man eine unendlich breite und perfekt flache Oberfläche eines homogenen Materials, so sind ihre Reflexionseigenschaften durch ihren Brechungsindex n_m und den des umgebenden Mediums n_0 definiert. Für ein Substrat in Luft oder im Vakuum gilt $n_0 = 1$. Ein einfallender monochromatischer Neutronenstrahl kann über seinen Winkel relativ zur Oberfläche θ und den Betrag seines Wellenvektors $|\vec{k}_0| = k_0$ beschrieben werden. Im Vakuum beträgt letzterer $k_0 = 2\pi/\lambda$ mit der De-Broglie-Wellenlänge λ . Der Brechungsindex kann dabei über das Verhältnis der Wellenvektoren im Medium k_m relativ zum umgebenden Medium k_0 definiert werden:

$$n_m^2 = \frac{k_m^2}{k_0^2} = 1 - \frac{\lambda^2}{\pi} N b_{coh} = 1 - \frac{\lambda^2}{\pi} \rho_{coh} + i \cdot i\rho \quad (2.1)$$

Hierbei bezeichnet N die Teilchenzahl und b_{coh} die kohärente Streulänge. Diese stoffspezifische Größe beschreibt die Amplitude der Wechselwirkung zwischen Atomkern und Neutron und hat typischerweise eine Größenordnung von 10^{-12} cm. Die genauen Werte sind dabei ohne Trend über das Periodensystem verteilt und können sowohl positiv als auch negativ sein. Das Produkt Nb_{coh} wird als die kohärente Streulängendichte (SLD) ρ_{coh} bezeichnet und kann in einem homogenen Material als konstant angesehen werden. Es handelt sich um eine wichtige Größe, welche Aufschluss über die chemische Zusammensetzung der Probe geben kann. Im Gegensatz dazu findet bei XRR die Interaktion der Röntgenstrahlung mit Elektronen statt. $\rho_{coh,XRR}$ ist in diesem Fall immer positiv und hängt maßgeblich von der Ordnungszahl der streuenden Atome ab. Es sei angemerkt, dass b_{coh} , und somit auch ρ_{coh} , eine komplexe Größe ist. Während der Realteil die Streuung beschreibt, beschreibt der Imaginärteil die Absorption der Strahlung durch das Material. Der Imaginärteil von ρ_{coh} wird imaginäre Streulängendichte (iSLD) genannt. In den Reflexionsprofilen äußern sich diese durch eine Absenkung der Reflektivität, sowohl der beobachteten Strukturen als auch der Totalreflexionskante (siehe unten).

2. Theoretische Grundlagen

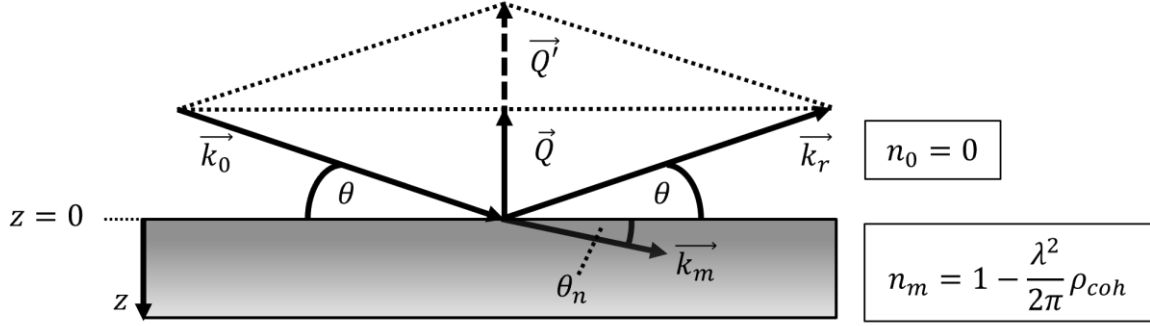


Abbildung 2.1: Elastische Reflexion eines einfallenden Neutronen- oder Röntgenstrahls $\vec{k}_0$ unter dem Winkel $\theta > \theta_c$ an einem Substrat unter Luft. Ein Teil der Strahlung tritt in das Substrat mit dem Wellenvektor $\vec{k}_m$ ein.^[3]

Für NR ist die iSLD meistens vernachlässigbar klein. Für Materialien die neutronenabsorbierende Elemente wie Gadolinium oder Bor enthalten, muss diese Größe jedoch berücksichtigt werden.^[20]

Für Neutronenwellenlängen im Bereich weniger Å und den obengenannten typischen Größen für ρ_{coh} ist n immer nahe 1, weshalb Reflexion und Streuung nur bei kleinen Winkeln $\theta \approx 1^\circ$ beobachtet werden können. Es ergibt sich eine Vereinfachung von Gleichung (2.1):

$$n_m \approx 1 - \frac{\lambda^2}{2\pi} \rho_{coh} \quad (2.2)$$

Bei der Reflexion an Oberflächen kann beobachtet werden, dass bei kleinem θ die Strahlung vollständig reflektiert wird und keine Transmission in das bestrahlte Material stattfindet. Dieser Effekt wird Totalreflexion genannt. Der Winkel, unter dem Totalreflexion eintritt, wird kritischer Winkel θ_c genannt und lässt sich über das Snellius'sche Brechungsgesetz berechnen. Bei Reflexion unter Luft gilt somit:

$$\begin{aligned} \cos \theta_i &= n_m \cdot \cos \theta_n \\ \cos \theta_c &= n_m \end{aligned} \quad (2.3)$$

θ_i beschreibt den Winkel des einfallenden Strahls und θ_n den des an der Grenzfläche gebrochenen Strahls im Medium mit Brechungsindex n_m (siehe Abbildung 2.1). Der kritische Winkel ergibt sich für die Bedingung $\theta_n = 0$. Mit Gleichung (2.2) gilt:

$$\sin \theta_c = \sqrt{\frac{\rho_{coh}}{\pi}} \lambda \quad (2.4)$$

Totalreflexion ist nach Gleichung (2.4) nur möglich, wenn $\rho_{coh} > 0$, was im Falle von NR nicht für alle Substrate gegeben ist. So kann zum Beispiel an einer Luft/H₂O-Grenzfläche bei einfallendem Neutronenstrahl von der Luftseite Totalreflexion nicht erzielt werden, da aufgrund der negativen Streulänge von Wasserstoff $\rho_{H_2O} < 0$. Durch isotopische Substitution des Substrats kann ρ_{coh} beeinflusst werden, somit ist Totalreflexion an der Luft/D₂O Grenzfläche bei einem Neutroneneinfall von der Luft-Seite möglich. Es sei darauf hingewiesen, dass dieses Phänomen für Röntgenstrahlung nicht auftritt, da hier wie oben beschrieben immer gilt $\rho_{coh, XRR} > 0$.

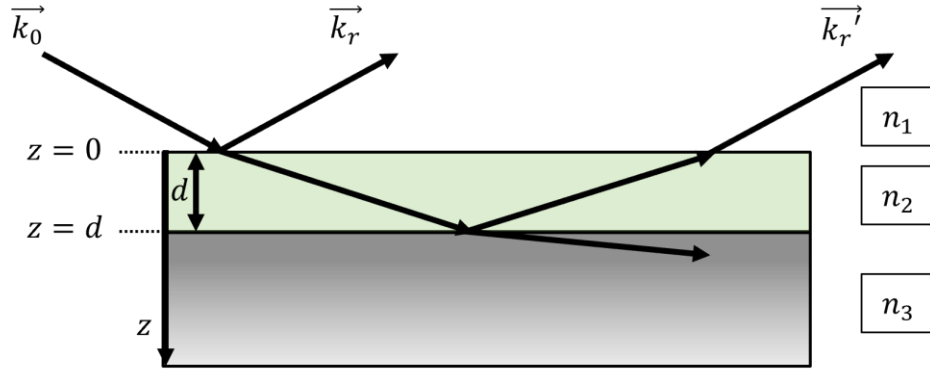


Abbildung 2.2: Reflexion eines einfallenden Neutronen- oder Röntgenstrahls $\vec{k}_0$ unter dem Winkel $\theta > \theta_c$ an einem Substrat mit dünner Beschichtung. Analog zu Abbildung 2.1 findet teilweise Reflexion und Transmission an den Grenzflächen statt. Die reflektierten Anteile $\vec{k}_r$ und $\vec{k}_r'$ interferieren je nach entstandenem Phasenunterschied konstruktiv oder destruktiv und erzeugen so charakteristische Interferenzmuster in den aufgenommenen Reflexionsprofilen.^[3]

Um die obigen Zusammenhänge zu verallgemeinern, wird anhand der Wellenlänge und des Einfallswinkels des Neutronenstrahls der Streuvektor $\vec{Q}$ definiert:

$$\vec{Q} = \frac{\vec{k}_r - \vec{k}_0}{2} \quad (2.5)$$

$$|\vec{Q}| = Q = \frac{2\pi \sin \theta}{\lambda}$$

$\vec{k}_r$ und $\vec{k}_0$ sind die Wellenvektoren des reflektierten respektive einfallenden Neutronenstrahls. Q entspricht somit der Projektion von $\vec{k}_i$ auf die z-Achse senkrecht zur Oberfläche (siehe Abbildung 2.4). Analog zu (2.4) kann auch der kritische Streuvektor Q_c definiert werden, unter welchem die Bedingungen für Totalreflexion gegeben sind.

$$Q_c = 2\sqrt{\pi\rho_{coh}} \quad (2.6)$$

Falls das Medium des einfallenden Strahls nicht Luft ist, wird die Lage der Totalreflexionskante stattdessen über die Differenz der SLD von reflektierendem und dem ursprünglichen Medium des Strahls $\Delta\rho_{coh} = \rho_{coh,m} - \rho_{coh,0}$ berechnet:^[21]

$$Q_c = 2\sqrt{\pi\Delta\rho_{coh}} \quad (2.7)$$

Weiter muss auch der Fall betrachtet werden, dass die Reflexion nicht nur an einer Grenzfläche auftreten kann, sondern auch an einem System aus vielen einzelnen Schichten. Ein einfallender Neutronenstrahl wird hierbei, unter der Annahme, dass in keinem Fall Totalreflexion auftritt, an jeder Grenzfläche teilweise transmittiert und reflektiert. Der Reflexionskoeffizient R an der Grenzfläche zwischen den Lagen p und $p+1$ ist definiert als der Quotient der Intensitäten des einfallenden Strahls B_p und des reflektierten Strahls A_p . Trifft ein Strahl im Vakuum auf eine ideale planare Grenzfläche, so ergibt sich die sogenannte Fresnel-Reflexion, welche abhängig von den SLD des reflektierenden Mediums ρ_s ist:

$$R_F = \frac{|A|^2}{|B|^2} = \left| \frac{Q - Q_s}{Q + Q_s} \right|^2 = \left| \frac{1 - \sqrt{1 - \left(\frac{Q_c}{Q}\right)^2}}{1 + \sqrt{1 - \left(\frac{Q_c}{Q}\right)^2}} \right|^2 \quad (2.8)$$

Hierbei gilt $Q_c^2 = 4\pi\rho_s$ und $Q_s^2 = Q^2 - Q_c^2$. Unterhalb von Q_c findet Totalreflexion an der Oberfläche statt. Somit kann anhand der Lage der Totalreflexionskante in einem typischen Reflexionsprofil die SLD des Substrats ρ_s bei der Messung unter Luft sehr exakt bestimmt werden, was ein zuverlässiges Instrument zur Bestimmung von dessen chemischer Zusammensetzung darstellt. Ist $Q \gg Q_c$, so gilt $R_F \propto Q^{-4}$. Daraus folgt, dass der Anteil der reflektierten Strahlung mit steigendem Streuwinkel immer stark abfällt, gleich welche Probe untersucht wird. Um Unterschiede im Reflexionsverhalten sichtbar zu machen, werden logarithmische Auftragungen verwendet. Auch wird anstelle der Reflexion von $R(Q)$ häufig die sogenannte Fresnel-Auftragung $f(Q) = RQ^4$ verwendet, welche die obengenannte Proportionalität kompensiert und somit schwache Abweichungen vom idealen Verhalten der Reflexionsprofile besser sichtbar macht.

Befindet sich eine homogene Schicht der Dicke d auf der Oberfläche des untersuchten Substrats findet oberhalb von Q_c Reflexion und Transmission an allen Grenzflächen der einzelnen Phasen statt (siehe Abbildung 2.2). Es handelt sich hierbei um ein 3-Phasen-System, bestehend aus Substrat, der aufgetragenen Schicht und der Umgebung (zum Beispiel Luft). Der einfallende Neutronenstrahl wird dabei an der ersten Grenzfläche ($z = 0$) teilweise reflektiert. Der übrige Teil der Strahlung dringt in die erste Schicht ein und wird an der inneren Grenzfläche ($z = d$) erneut teilweise reflektiert und transmittiert. Die Brechungswinkel werden dabei wie im vorherigen Fall durch die Brechungsindizes n_i

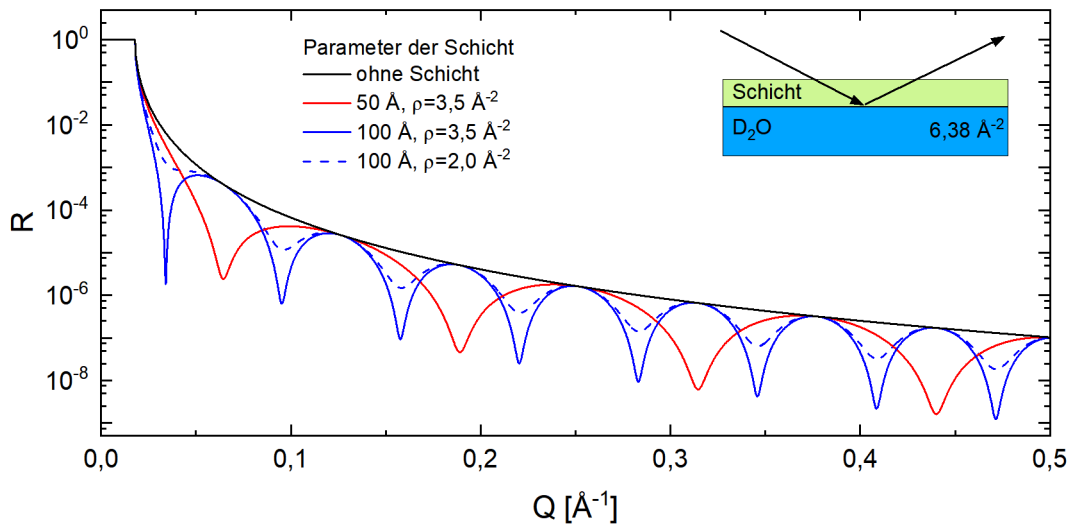


Abbildung 2.3: Simulation des Reflexionsprofils eines Neutronenstrahls an einer idealen D_2O -Oberfläche. Durch das Aufbringen einer arbiträren Schicht entstehen Kiessig-Oszillationen, deren Periodizität abhängig von der Dicke der Schicht ist. Die Intensität der Interferenzmuster ist abhängig von der Differenz der SLD von D_2O und der Schicht.

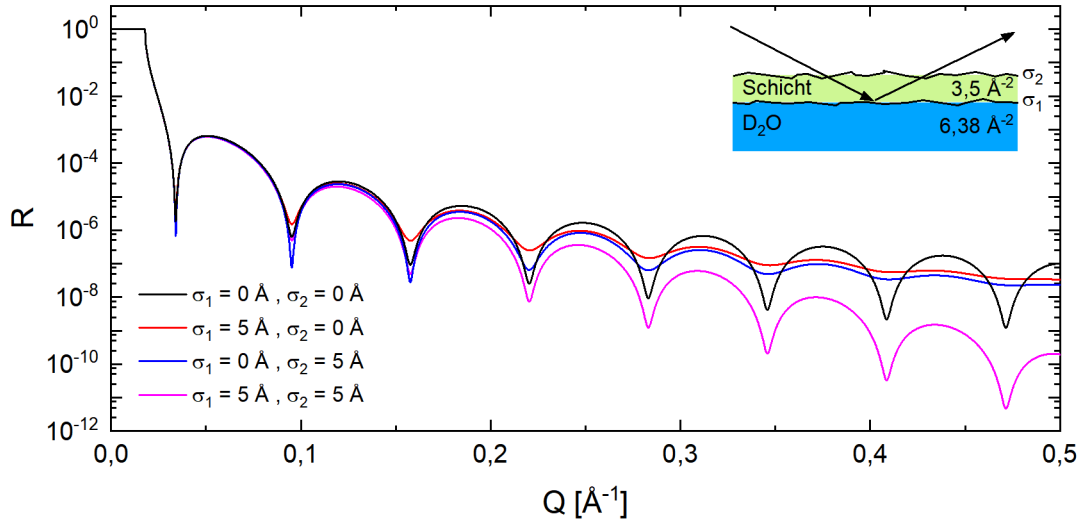


Abbildung 2.4: Simulation des Reflexionsprofils eines Neutronenstrahls an einer rauhen Probe. Die aufgetragene Schicht hatte eine konstante Dicke von $d = 100 \text{ \AA}$ und $\rho = 3,5 \text{ \AA}^{-2}$. Rauigkeiten σ_i an den Grenzflächen 1 und 2 äußern sich auf unterschiedliche Arten in den erhaltenen Profilen.

der einzelnen Schichten beschrieben. Die reflektierten Anteile $\vec{k}_r$ und $\vec{k}_r'$ interferieren im Anschluss. Je nach Phasenverschiebung, hervorgerufen durch die unterschiedlichen Weglängen, findet diese Interferenz konstruktiv oder destruktiv statt. Die Weglänge ist dabei abhängig von der Dicke der Probe, während die Anteile der reflektierten und transmittierten Strahlungen maßgeblich durch die Unterschiede der einzelnen SLDs beeinflusst sind. Die beobachteten Interferenzmuster werden Kiessig-Oszillationen genannt, ihre Periodizität hängt mit der Probendicke wie folgt zusammen:

$$\Delta Q_{\text{Kiessig}} = 2\pi/d_{\text{probe}} \quad (2.9)$$

Dieser Zusammenhang ergibt sich aus den Bragg-Bedingungen der Röntgenbeugung. Eine Simulation der Reflexion eines Neutronenstrahls an einer idealen D_2O -Oberfläche mit einer arbiträren Schicht unterschiedlicher Dicke und SLD ist in Abbildung 2.3 dargestellt.

Im Falle eines Mehrschichtsystems können die beschriebenen Zusammenhänge entsprechend erweitert werden. Es treten hierbei auch weitere Phänomene in den beobachteten Reflexionen auf. Bei sich wiederholenden Schichtfolgen mit identischen Parametern sind neben Kiessig-Oszillationen auch Bragg-Peaks zu beobachten. Diese entstehen durch konstruktive Interferenzen der reflektierten Strahlung an den unterschiedlichen Wiederholeinheiten. Ihrem Abstand steht analog zu Gleichung (2.9) in Zusammenhang mit der Dicke der Wiederholeinheit d_{wdh} . Mithilfe der Abstände zwischen Bragg-Peaks und Kiessig-Oszillationen kann die Zahl der Wiederholeinheiten N berechnet werden.

$$\Delta Q_{\text{Bragg}} = 2\pi/d_{\text{wdh}} \quad (2.10)$$

$$N = \frac{d_{\text{probe}}}{d_{\text{wdh}}} = \frac{\Delta Q_{\text{Bragg}}}{\Delta Q_{\text{Kiessig}}} \quad (2.11)$$

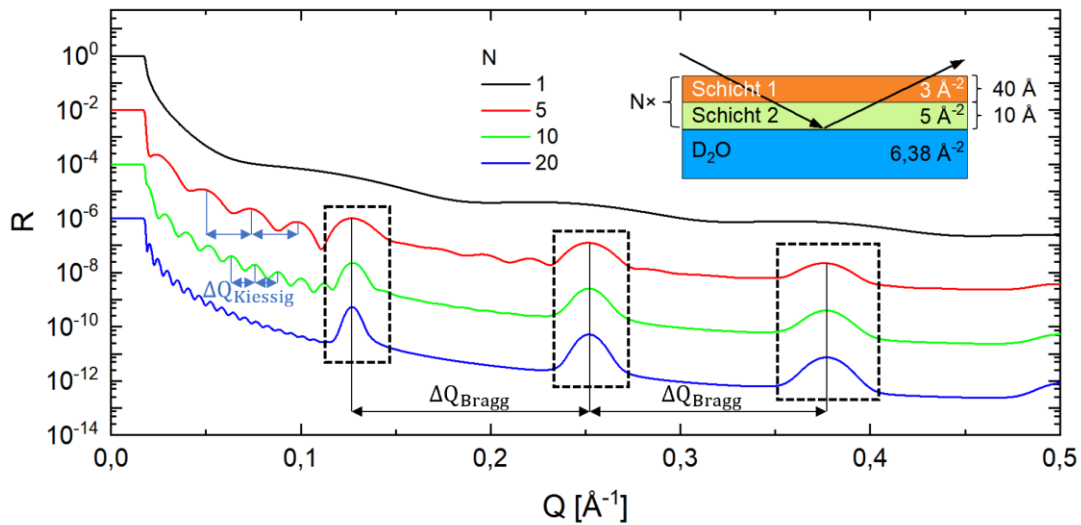


Abbildung 2.5: Simulation des Reflexionsprofils eines Neutronenstrahls an unterschiedlichen Zahlen von Wiederholungen N zweier arbiträrer Schichten auf D_2O . Durch konstruktive Interferenz der an den Wiederholeinheiten (Schicht 1 und Schicht 2) reflektierten Strahlung ergeben sich Bragg-Peaks, die durch die gestrichelten Kästen markiert sind. Je größer N , desto deutlicher sind die Bragg-Peaks ausgeprägt. Ihre Abstände ΔQ_{Bragg} sind unabhängig von N und antiproportional zur Dicke der Wiederholeinheit, hier der Summe der Dicke von Schicht 1 und Schicht 2. Dahingegen sinkt der Abstand der Kiessig-Oszillationen $\Delta Q_{Kiessig}$ mit zunehmendem N aufgrund der wachsenden Probendicke.

Eine Simulation verschiedener N zweier arbiträrer Schichten ist in Abbildung 2.5 dargestellt. Es ist zu sehen, dass mit steigendem N die Bragg-Peaks deutlicher ausgeprägt und schmaler werden, ihre Position jedoch im Gegensatz zu Kiessig-Oszillationen unverändert bleibt.^[15, 22-23]

Zur Berechnung der Reflexion des Gesamtsystems wird zunächst die Reflexion zwischen der letzten Schicht und dem rückseitigen Bulkmaterial berechnet, und anschließend sukzessiv die Reflexionen an den darüberliegenden Grenzflächen. Somit wird schlussendlich die Reflektivität des Gesamtsystems erhalten. Diese Methode der Berechnung wird optische Matrix-Methode genannt und über den Abelès-Formalismus gelöst.^[24] Eine alternative Berechnungsmethode stellt der Parratt-Formalismus dar, welcher ebenfalls auf einer rekursiven Berechnung der SLDs beruht.^[25]

Die bisherige Beschreibung der Reflexion beruht auf ideal planparallelen Grenzflächen, was jedoch in reellen Systemen nicht gegeben ist. Rauigkeiten der Grenzschichten und Interdiffusion benachbarter Schichten führen zu einem Abweichen vom idealen Verhalten. Um diese Effekte zu berücksichtigen, kann die berechnete Reflexion (siehe Gleichung (2.8)) um eine Gauß-Fehlerfunktion korrigiert werden. Der resultierende Effekt auf die simulierten Reflexionsprofile ist in Abbildung 2.4 dargestellt.

2.1.1. Messinstrumente für Reflektometrie

Zur Untersuchung von Proben mithilfe von NR werden spezialisierte Instrumente benötigt. Diese werden von einer Neutronenquelle mit den namensgebenden Teilchen gespeist, welche über Strahlleiter in einem genau definierten Winkel auf die Probenoberfläche geleitet werden. Solche Aufbauten sind

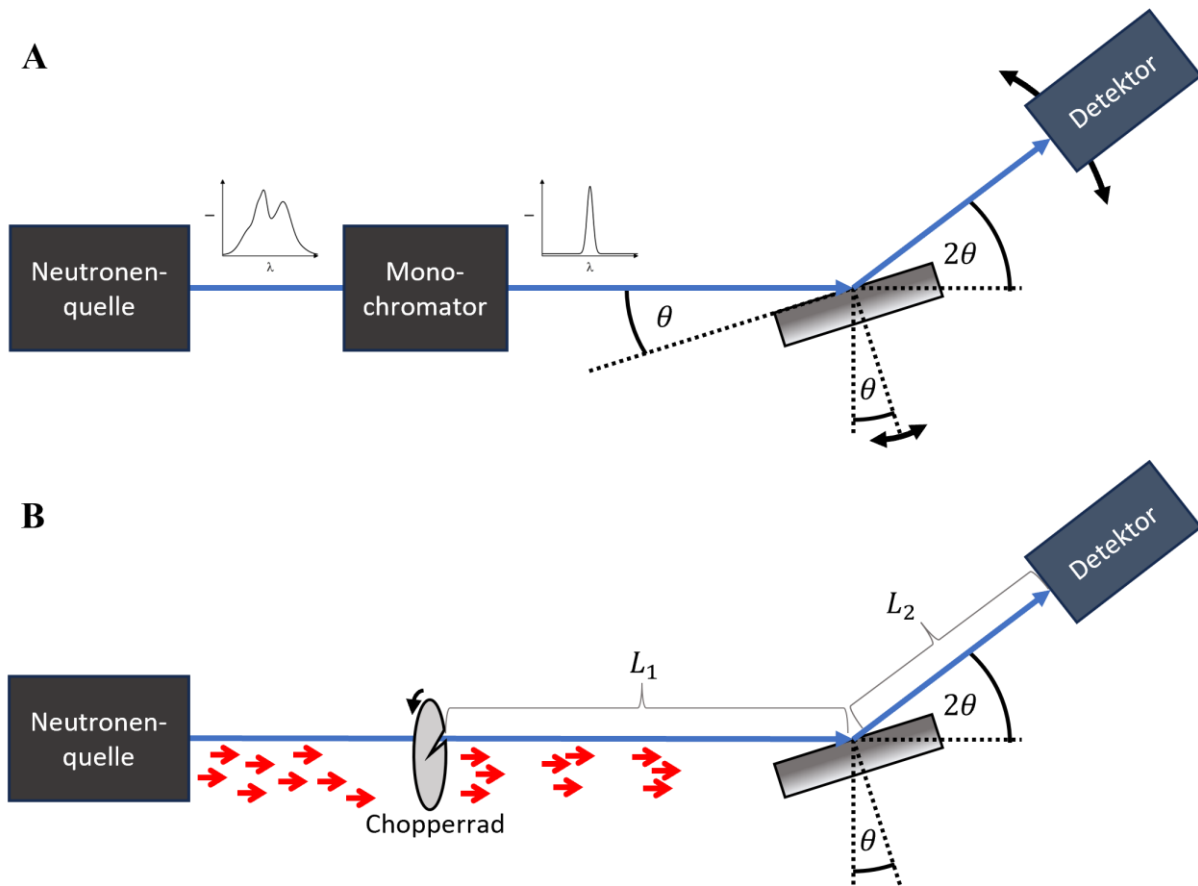


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung üblicher Reflektometer. **A** Monochromatisches Reflektometer. Ein monochromatischer Strahl wird auf die Oberfläche geleitet. Durch Variation des Winkels θ der Probe und des Winkels 2θ des Detektors wird die spekulare Reflexion $R(Q)$ erhalten. **B** Time-of-flight Reflektometer. Ein Chopperrad erzeugt einen Strahlungspuls, welcher unter einem festen Winkel θ auf die Probe geleitet wird. Die Wellenlänge, und somit auch Q , ergeben sich aus der Summe der zurückgelegten Wegstrecken L_1 und L_2 zwischen Chopperrad, Reflexionspunkt und Detektor, sowie der dafür benötigten Zeit unter Annahme elastischer Reflexion.^[3]

kostspielig und nicht zuletzt auch aufgrund der politischen und gesellschaftlichen Umstrittenheit von Kernreaktoren selten. Nichtsdestotrotz existiert eine aktive Forschungsgemeinde, welche Neutronen für diverse Methoden der Probencharakterisierung verwendet.

Für NR werden kalte, das heißt langsame Neutronen von wenigen meV benötigt. Typische Forschungsreaktoren produzieren jedoch Neutronen mit Energien im Bereich weniger MeV, somit ist ein Abbremsen der Neutronen vor dem Instrument nötig. Der so erhaltene Neutronenstrahl ist polychromatisch und zeigt Wellenlängen im Bereich von $\lambda = (2\sim 20) \text{ \AA}$.^[2-3]

Neutronenreflektometer können grob in zwei Kategorien eingeteilt werden, welche in Abbildung 2.6 schematisch dargestellt sind. Monochromatische Neutronenreflektometer arbeiten mit einem Monochromator, welcher vor der Probe eine Wellenlänge des Neutronenstrahls auswählt. Der übrige Strahl wird kollimiert und in einem flachen Winkel θ auf die Probenoberfläche geleitet, welcher durch Verkippen der Probe eingestellt wird. Der reflektierte Strahl hat somit den Winkel 2θ relativ zum Direktstrahl. Während der Messung werden die Winkel von Probe und Detektor schrittweise variiert, womit $R(Q)$ erhalten wird. Diese Betriebsart wird auch $\theta/2\theta$ -Modus genannt. Im Gegensatz hierzu arbeiten Time-of-flight Reflektometer mit polychromatischen Neutronenquellen und machen sich die

endliche Geschwindigkeit kalter Neutronen zunutze. Mithilfe eines rotierenden Chopperrads wird gepulste Strahlung erzeugt, welche unter einem festen Winkel θ an der Probe reflektiert wird und auf den Detektor trifft. Die Geschwindigkeit eines Neutrons ist nach De-Broglie über $v = h/m\lambda$ gegeben, mit der Planck-Konstante h und der Wellenlänge des Neutrons λ . Unter Annahme vollständig elastischer, das heißt Energieverlust-freier Reflexion ist $v = \text{konst.}$ Somit kann die Geschwindigkeit und damit auch die Wellenlänge des Neutrons über die zurückgelegte Wegstrecke L zwischen Chopperrad und Detektor, sowie der dafür benötigten Zeit t nach $\lambda = th/mL$ ermittelt werden. L ergibt sich dabei aus der Summe der einzelnen Wegstrecken zwischen Chopperrad und Reflexionspunkt auf der Probenoberfläche L_1 , sowie dem Reflexionspunkt und dem Detektor L_2 . Nach Gleichung (2.5) kann dann der Streuvektor Q berechnet werden. Die Reflektivität $R(Q)$ ergibt sich durch den Intensitätsvergleich zwischen der reflektierten und der direkt auf den Detektor treffenden Strahlung (Direktstrahl) für alle gemessenen Wellenlängen.^[2-3]

Für die Untersuchung biologischer Proben bieten Time-of-flight Reflektometer erhebliche Vorteile gegenüber den monochromatischen Instrumenten. Da hier üblicherweise keine Verkippung der Probe vonnöten ist, können zum Beispiel Proben an der Wasseroberfläche untersucht werden. Weiter erfordert die Einstellung von Proben- und Detektorwinkel einen nicht unerheblichen Zeitaufwand, weshalb bei monochromatischen Spektrometern ein deutlicher Zeitversatz zwischen den Intensitätsmessungen bei unterschiedlichen Q -Werten auftritt. Die Untersuchung kinetischer Prozesse ist somit nur bei äußerst langsamen Prozessgeschwindigkeiten sinnvoll. Time-of-flight Reflektometer können hingegen das gesamte Profil in einem größeren Q -Bereich zeitgleich aufnehmen, benötigen jedoch auch einen höheren Neutronenfluss, um ein hinreichend gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis in sinnvollen Aufnahmezeiten zu erreichen. Dies stellt jedoch bei modernen Neutronenquellen und Reflektometern kein Problem dar, weshalb die Untersuchung kinetischer Prozesse mit NR zunehmend an Bedeutung gewinnt. Die Zeit, welche für die Aufnahme eines Reflexionsprofils benötigt wird, ist abhängig vom Neutronenfluss, der Probenoberfläche und der gewünschten niedrigsten Reflektivität, welche erzielt werden soll. Bei einer Probenoberfläche von etwa 10 cm^2 kann mit typischen Reflektometern mit einem Neutronenfluss in der Größenordnung von $\sim 10^{10} \text{ cm}^{-2}\text{s}^{-1}$ eine Reflektivität von $R \geq 10^{-5}$ bereits nach wenigen Minuten erhalten werden, während für $R \geq 10^{-6}$ bereits mehrere Stunden benötigt werden.^[2-3, 26]

Da der Neutronenfluss für Reflektometer eine begrenzende Größe darstellt, muss selbst bei leistungsstarken Reaktoren ein Kompromiss zwischen dem Fluss und der Auflösung getroffen werden, um in sinnvollen Zeiten ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Die Auflösung $\Delta Q/Q$ setzt sich dabei aus der Auflösung des kollimierten einfallenden Strahls $\Delta\theta/\theta$ und der durch Monochromator oder Chopper bedingten Auflösung der Neutronenwellenlänge $\Delta\lambda/\lambda$ zusammen. Bei der Untersuchung biologischer Proben wird üblicherweise $\Delta Q/Q = (5\sim 10)\%$ gewählt, während für Untersuchungen an harter Materie bessere Auflösungen vonnöten sind.^[2]

2.1.2. Auswertung reflektometrischer Messreihen

Reflektometrische Untersuchungen von Proben bieten einen hohen Informationsgehalt, der jedoch größtenteils nicht direkt aus den gemessenen Profilen abgelesen werden kann. Zwar kann, wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, über die Positionen der Kiessig-Oszillationen und Bragg-Peaks die Dicke der Probe und die Länge der Wiederholeinheiten bestimmt werden, genauere Informationen zum

Probenaufbau, wie die Zusammensetzung, Rauigkeiten einzelner Schichten, Zahl der Wiederholeinheiten, Lösungsmittelanteil und Dicke der einzelnen Schichten, sind jedoch nicht direkt zu erhalten. Stattdessen wird anhand von bekannten Eigenschaften der Probe ein Modell aufgestellt und dessen Parameter so variiert, dass der Unterschied zum gemessenen Reflexionsprofil minimiert wird. Hierfür können mehrere kostenfreie Programme wie zum Beispiel RefNx^[27] Motofit^[28], Refl1D^[29] oder GenX^[30] verwendet werden, welche von den Reflektometrie-Forschungsgemeinschaften über die Jahre entwickelt wurden. Bei hinreichend guter Übereinstimmung kann dann angenommen werden, dass die erhaltenen Modellparameter das reelle System gut beschreiben.^[31]

Ein großer Nachteil der Auswertung anhand eigens aufgestellter Modelle ist die Gefahr von Fehlinterpretationen aufgrund falscher Annahmen, insbesondere bei komplexen Profilen oder Proben. Auch gibt es häufig mehrere Sätze an Parameterkombinationen, die zu ähnlichen oder identischen Profilen führen.^[31] Um passende Grundannahmen treffen zu können, sollte daher auf typische Probenparameter aus der Literatur zurückgegriffen werden. SLDs einzelner Atome oder kleiner Moleküle können Datenbanken oder verschiedenen Publikationen entnommen werden.^[3, 18, 32-33] Auch kann man sich für einige Systeme an Pilot-Arbeiten orientieren, von denen ausgehend komplexere Modelle aufgebaut werden können. Für Lipid-Bilagen sei hierbei auf die Arbeiten von Tristram-Nagle *et al.*^[34], Mortensen *et al.*^[35] oder Schalke *et al.*^[36] verwiesen, welche essenzielle Parameter wie Dicken der Kopf- und Seitenketten und deren SLD für verschiedene Lipide untersuchten. Auch kann durch Einsatz komplementärer Messtechniken das verwendete Modell verfeinert und der Parameterraum weiter eingeschränkt werden. In der Literatur wurde bereits über den erfolgreichen Einsatz von Methoden wie Rasterkraft-Mikroskopie^[37-38], IR-Spektroskopie^[39], Quarzkristall-Mikrowaagen^[6] oder Ellipsometrie^[7-8] berichtet. Insbesondere die simultane Nutzung dieser Techniken bietet Vorteile, da somit mögliche Unterschiede separat präparierter und vermessener Proben vermieden werden.^[39] Für NR hat sich außerdem der Einsatz der Kontrastvariation bewährt. Da die Interaktion der Neutronen mit dem Atomkern stattfindet, ist NR besonders empfindlich für isotopische Substitution. So ist die Streulänge von Wasserstoff mit $b_{\text{H}} = -0,374 \cdot 10^{-12} \text{ cm}$ negativ, während die von Deuterium mit $b_{\text{D}} = 0,667 \cdot 10^{-12} \text{ cm}$ positiv ist.^[2] Somit kann durch isotopische Substitution die SLD von Probe oder Probenmedium stark beeinflusst werden. Eine Mischung von deuterierten und protonierten Komponenten erlaubt somit die Einstellung des Kontrasts. Einzelne Komponenten können so maskiert werden, indem ihre SLD derer anderer Komponenten gleichgesetzt wird. Es ist anzumerken, dass dies für XRR nicht der Fall ist, da hier die Interaktion der einfallenden Strahlung mit den Elektronen der Atome stattfindet, womit isotopische Substitution einen vernachlässigbar kleinen Einfluss auf die SLD hat. Durch teilweisen Austausch der Flüssigphase durch deuterierte oder protonierte Lösungsmittel können *in situ* verschiedene Kontraste in NR aufgenommen werden, ohne den Probenzustand drastisch zu ändern. Die erhaltenen Profile können dann simultan modelliert werden, wobei äquivalente Modellparameter gleichgesetzt werden können. Somit ergibt sich eine robustere Anpassung der erhaltenen Daten, da diese mehreren Einzelmessungen gerecht werden muss. Diese Technik wird häufig zur Untersuchung weicher Materie verwendet, da hier die Reflexionsprofile oft wenig ausgeprägte Strukturen zeigen. Dies führt dazu, dass mehrere Modelle die Probe ähnlich gut beschreiben und die Wahl des korrekten Modells erschwert ist. Durch die Verwendung von Kontrastvariation kann so eine fundiertere Auswahl des Modells stattfinden.^[3, 40-41]

2.1.3. Off-spekulare Reflektometrie

Spekulare Reflektometrie, wie sie in Abschnitt 2.1 beschrieben ist, misst die Reflexion von Neutronen- oder Röntgenstrahlung, bei identischem Einfallswinkel und Reflexionswinkel. Solche Messungen geben Aufschluss über den Aufbau der Probe orthogonal zur Probenebene (z-Achse in Abbildung 2.1 und Abbildung 2.2). Laterale Inhomogenitäten der Probe führen jedoch zu einem Abweichen von der spekularen Reflexion, welche mit off-spekularer Reflektometrie untersucht werden kann. Diese gibt unter anderem Aufschluss über Morphologie und lateralen Aufbau der Schichten sowie allgemeine mechanischen Eigenschaften der Probe.^[42-46] Dabei wird die Intensität der reflektierten Strahlung in Abhängigkeit von mindestens zwei Winkeln aufgenommen, zum Beispiel dem Winkel θ der Probe und dem Winkel Γ des reflektierten Strahls zum Direktstrahl (siehe auch Abbildung 2.7).^[44] Aus diesen kann dann der Streuvektor des reflektierten Strahls $Q = Q_z + Q_{||}$ berechnet werden, welcher sich aus einer Komponente Q_z orthogonal zur Probenebene und einer Komponente $Q_{||}$ parallel zu ebendieser zusammensetzt.^[47]

$$\begin{aligned} Q_z &= \frac{2\pi}{\lambda} [\sin(\Gamma - \theta) + \sin \theta] \\ Q_{||} &= \frac{2\pi}{\lambda} [\cos(\Gamma - \theta) - \cos \theta] \end{aligned} \quad (2.12)$$

Wenn $Q_{||} = 0$, dann entspricht das Experiment der spekularen Reflexion. Diese kann somit als Ausschnitt der off-spekularen Messung angesehen werden. Ein so erhaltener Datensatz nach Konvertierung in Q_z und $Q_{||}$ ist in Abbildung 2.8 A dargestellt. Es sei angemerkt, dass für die in Abbildung 2.7 dargestellte Geometrie die Streuvektoren, sowie der einfallende und reflektierte Strahl in einer Ebene sind. Jedoch ist ebenso Streuungen aus dieser Ebene heraus möglich, womit Q neben den beiden dargestellten Komponenten eine weitere Komponente $Q'_{||}$ orthogonal zu diesen und parallel zur Probenoberfläche enthält.^[45] Diese wird für die vorliegende Arbeit jedoch nicht betrachtet.

Die Auswertung von Messungen off-spekularer Reflektometrie ist bedeutend aufwändiger und komplexer als bei spekulare Reflektometrie und verschiedene Forschungsgruppen verwenden hierzu unterschiedliche Ansätze, abhängig davon, welche Probenparameter untersucht werden sollen.^[42, 46] Für die vorliegende Arbeit ist vor allem die Erörterung von mechanischen Eigenschaften

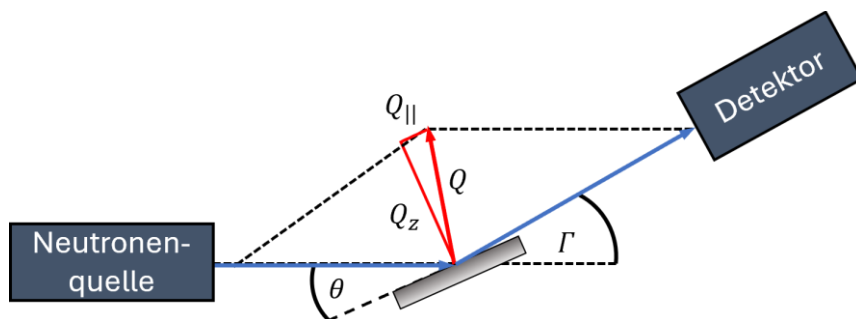


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Messung off-spekularer Reflektometrie. Um die Abweichung vom spekularen Verhalten zu messen, wird sowohl der Winkel Ω des einfallenden Strahls zur Probe, als auch der Winkel Γ zwischen einfallendem Strahl und Detektor variiert. Aus diesen wird der Streuvektor Q berechnet, welcher sich aus den orthogonalen Komponenten Q_z und $Q_{||}$ zusammensetzt.^[44]

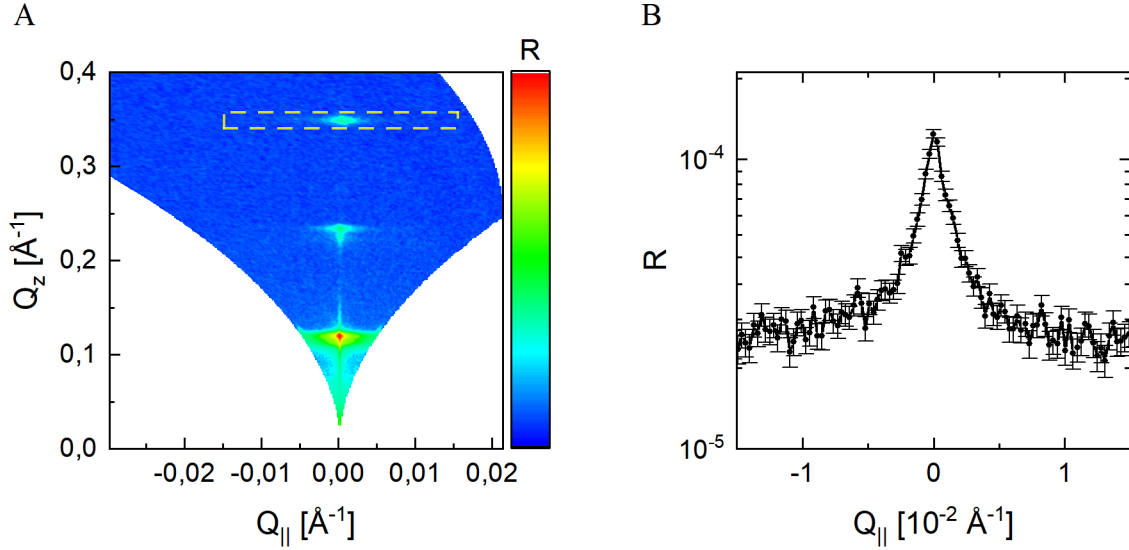


Abbildung 2.8: Beispielmessung von off-spekularer NR an einer Probe von Lipid-Multilagen. Die aufgetragenen Daten wurden einer der in Abschnitt 9 beschriebenen Messserien entnommen. **A** Auftragung der Reflektivität R in Q_z und $Q_{||}$. Entlang $Q_{||} = 0$ kann die spekulare NR beobachtet werden. Orthogonal zu den Positionen der Bragg-Peaks kann die off-spekulare Reflektivität der Probe beobachtet werden. **B** Auftragung des in A gelb markierten Bragg-Sheets bei $Q_z = 0,35 \text{ \AA}^{-1}$.

von Lipid-Multilagen von Interesse, wie sie zum Beispiel von Schenk *et al.*^[44, 48] und Yamamoto *et al.*^[42, 49] untersucht wurden. Diese bestehen aus hunderten bis tausenden gestapelten Lipid-Bilagen und zeigen in spekularer Reflexion die typischen Bragg-Peaks sich regelmäßig wiederholender Substrukturen, deren Position durch die Dicke von Bilage und Wasserzwichenschichten definiert ist. An diesen Stellen ist $Q_z = Q_{Bragg,i}$ mit der Ordnung i des Bragg-Peaks und entlang $Q_{||}$ kann ein logarithmischer Abfall der reflektierten Intensität beobachtet werden, was als Bragg-Sheet bezeichnet wird (siehe Abbildung 2.8 B). Diese entstehen durch regelmäßige Fluktuationen in den Bilagen. Anhand von Abfall und Breite des Bragg-Sheets können die Biegesteifigkeit κ und das Kompressions-Modul B der Multilagen bestimmt werden. Nachfolgend werden die wichtigsten Gleichungen für die Simulation der off-spekularen Reflektometrie in Abhängigkeit der mechanischen Parameter von Multilagen gezeigt. Für eine detaillierte Herleitung sei auf die Literatur verwiesen.^[44, 48, 50-51]

Zur Modellierung der off-spekulare Streuung $S(Q_z, Q_{||})$ von Lipid-Multilagen wird zunächst angenommen, dass die erste Born-Näherung gegeben ist. Diese besagt, dass die gestreute Strahlung schwach im Vergleich zum einfallenden Strahl ist. Dies ist üblicherweise bei Bragg-Sheets zweiter und höherer Ordnung gegeben. $S(Q_z, Q_{||})$ wird dann gegeben durch:

$$S(Q_z, Q_{||}) \propto \frac{e^{-Q_z^2 \sigma^2}}{Q_z^2} \left[N + 2 \sum_{k=1}^N (N - k) \cos(k Q_z d) \cdot \int_{-\infty}^{\infty} e^{Q_z^2 (\sigma^2 - g_k(r)/2)} e^{-i Q_{||} r} dr \right] \quad (2.13)$$

Hier beschreibt N die Zahl der Bilagen und σ deren mittlere Rauigkeit. Die Auslenkungs-Korrelationsfunktion $g_k(r)$ beschreibt den Versatz einer Lage und ihres k -ten Nachbarn aus ihrer jeweiligen idealen Position in Abhängigkeit der lateralen Distanz r . Letztere ist dabei definiert als der Betrag des Abstands zwischen zwei gedachten Punkten in der Bilagenebene. $g_k(r)$ kann über den Caillé-Parameter η und den de-Gennes-Parameter λ beschrieben werden.^[51]

$$g_k(r) = \frac{d^2}{\pi^2} \eta \int_{2\pi/R}^{\infty} f_k dQ_{\parallel} \quad (2.14)$$

$$f_k = \frac{[1 - J_0(Q_{\parallel} |\vec{r}|) \exp(-\lambda k Q_{\parallel}^2 d)]}{Q_{\parallel} \sqrt{1 + \frac{\lambda^2 d^2}{4} Q_{\parallel}^4}} \quad (2.15)$$

$$\eta = \frac{\pi k_B T}{2d^2 \sqrt{\kappa B/d}} \quad (2.16)$$

$$\lambda = \sqrt{\frac{\kappa}{Bd}}$$

B beschreibt die vertikale Kompressibilität benachbarter Bilagen, während κ die Resistenz der Lagen gegen Biegung beschreibt. Der mittlere Bilagenabstand d kann über die Lage der Bragg-Peaks in spekulärer Reflexion erhalten werden. $J_0(x)$ ist die Bessel-Funktion erster Art, k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Zur vollständigen Simulation der off-spekularen Streuung wurde von Schenk *et al.* die untere Integrationsgrenze in (2.14) definiert, welche die kleinste Distanz R in der Bilage beschreibt, welche für die Simulation berücksichtigt wird.^[44] $g_k(r)$ konvergiert somit gegen $2\sigma^2$ für große r . Somit kann $S(Q_z, Q_{\parallel})$ anhand der Parameter η , λ und R berechnet und mit Messdaten verglichen werden. Bei guter Übereinstimmung der betrachteten Bragg-Sheets ist es dann möglich nach (2.16) die mechanischen Parameter κ und B der Probe zu berechnen.

2.2. Ellipsometrie

Ellipsometrie ist eine nicht-destruktive optische Technik zur Bestimmung physikalischer und optischer Eigenschaften dünner Proben und Oberflächen.^[52-53] Hierbei wird die Änderung des Polarisationszustandes von reflektiertem Licht untersucht, womit Probenparameter wie Dicke, Brechungsindex n sowie Extinktionskoeffizient k bestimmt werden können. Ebenso können Mehrschichtsysteme analysiert und die Parameter der einzelnen Komponenten untersucht werden. Aufgrund der nicht-destruktiven und schnellen Anwendung, findet Ellipsometrie weite Verwendung unter anderem in den Gebieten der Materialwissenschaften, Biophysik und Nanotechnologie.^[52]

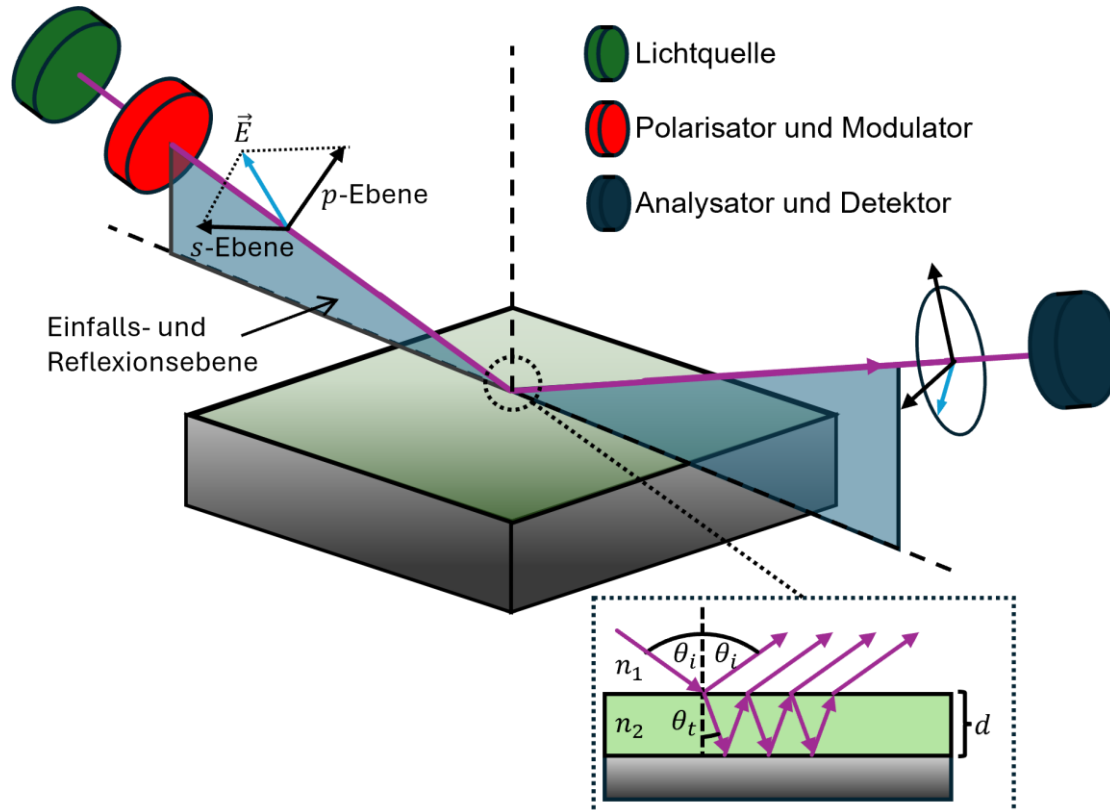


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung eines Aufbaus zur Messung von Ellipsometrie. Die Kombination von Lichtquelle und Polarisator erzeugt linear polarisiertes Licht, dessen Polarisationswinkel über den Modulator eingestellt werden kann. Bei Reflexion an einer Probenoberfläche kommt es aufgrund unterschiedlicher optischer Weglängen zwischen dem direkt reflektierten Strahl und denen, die die Probe durchquert und aus dieser nach Reflexion am Substrat wieder austreten zu einer Phasenverschiebung (siehe Detailansicht). So entsteht elliptisch polarisiertes Licht. Analysator und Detektor bestimmen die ellipsometrischen Winkel Ψ und Δ durch Messung der Lichtintensität in Abhängigkeit des Polarisationswinkels.^[52, 54]

Der Name der Messtechnik beruht auf dem Umstand, dass linear polarisiertes Licht nach Reflexion an einer Oberfläche häufig elliptische Polarisation aufweist.^[53] Abbildung 2.9 stellt ein typisches Ellipsometrie-Experiment dar. Das von der Quelle erzeugte Licht wird über einen Polarisator in linear polarisiertes Licht umgewandelt. Über den Modulator wird dabei der Winkel des elektrischen Feldvektors zur Einfallsebene eingestellt.^[52, 55] An der Grenzfläche zwischen den Medien tritt dann teilweise Reflexion und Transmission des Lichts auf, abhängig von den Brechungsindizes n_i und dem Einfallswinkel θ_i . Der transmittierte Strahl propagiert nach dem Snellius'schen Brechungsgesetz (analog zu Gleichung (2.3)) mit Winkel θ_t im Probenmedium und wird vom Substrat reflektiert. Es sei darauf hingewiesen, dass bei komplexeren Proben auch mehrfache Medienübergänge berücksichtigt werden müssen. Ebenso ist Totalreflexion am Substrat nur bei einem Einfallswinkel θ_i oberhalb des kritischen Winkels gegeben. An dieser Stelle sollen jedoch die Grundlagen der Ellipsometrie erklärt werden, weshalb solche Effekte hier nicht berücksichtigt werden können. Der aus dem Probenmedium austretende Strahl legt dabei eine zusätzliche Weglänge von $2d \cos \theta_t$ zurück, wodurch es zu einer Phasenverschiebung der elektrischen Feldvektoren bei Interferenz mit dem direkt reflektierten Strahl kommt. Sind die Komponenten des einfallenden Lichts in p - und s -Ebene, das heißt parallel oder senkrecht zur Einfallsebene nicht mehr in Phase, so entsteht elliptisch polarisiertes Licht. Auch

2. Theoretische Grundlagen

mehrfache Reflexionen in der Probe sind möglich, die einen analogen Effekt verursachen (siehe Detailansicht in Abbildung 2.9). Die Fresnel-Koeffizienten R_i in s - und p -Ebene können an der Grenzfläche mit Hilfe der Maxwell-Gleichungen berechnet werden

$$R_p = \frac{E_p^r}{E_p^t} = \frac{n_2 \cos \theta_i - n_1 \cos \theta_t}{n_2 \cos \theta_i + n_1 \cos \theta_t} \quad (2.17)$$

$$R_s = \frac{E_s^r}{E_s^t} = \frac{n_1 \cos \theta_i - n_2 \cos \theta_t}{n_1 \cos \theta_i + n_2 \cos \theta_t} \quad (2.18)$$

Hierbei beschreibt $E_{p/s}^{r/t}$ die elektrische Feldstärke des reflektierten oder transmittierten Strahls in p - oder s -Ebene. Die erhaltene Polarisation des Lichts entspricht dem Quotienten der Fresnel-Koeffizienten:

$$\rho = R_p/R_s \quad (2.19)$$

Nach der Reflexion trifft das elliptisch polarisierte Licht auf den Analysator. Hierbei handelt es sich um einen rotierenden Polarisator, welcher erneut linear polarisiertes Licht erzeugt. Dadurch entsteht abhängig von seiner Ausrichtung und dem Polarisationszustand des Lichts unterschiedliche Lichtintensität, welche vom Detektor gemessen wird. Da keine direkte Messung der Reflexionskoeffizienten möglich ist, finden stattdessen die ellipsometrischen Winkel Δ und Ψ Verwendung, welche die Änderung der Polarisation durch die Reflexion beschreiben.^[56] Der Amplitudenfaktor Ψ ist dabei beschrieben durch die Abschwächung oder Verstärkung der Amplituden der p - und s -Komponenten des reflektierten Lichts, während Δ die Differenz ihrer Phasenverschiebungen δ_i beschreibt:

$$\begin{aligned} \tan \Psi &= \frac{|R_p|}{|R_s|} \\ \Delta &= \delta_p - \delta_s \end{aligned} \quad (2.20)$$

Mit (2.20) gilt dann:

$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \tan(\Psi) e^{i\Delta} \quad (2.21)$$

Die Software des Ellipsometers berechnet die ellipsometrischen Winkel anhand der am Detektor gemessenen Lichtintensität in Abhängigkeit von Modulator- und Analysatorposition. Um verlässliche Aussagen über die Probe treffen zu können wird dabei entweder eine Vielzahl verschiedener Wellenlängen bei einem festen Einfallswinkel verwendet, oder der Einfallswinkel bei Verwendung monochromatischen Lichts variiert. Im ersten Fall spricht man von spektraler Ellipsometrie (SE), während letzteres als winkelvarierte Ellipsometrie bezeichnet wird.^[54]

Um anschließend die gesuchten Probenparameter zu erhalten werden die gemessenen ellipsometrischen Winkel anhand eines Modells simuliert.^[52, 54] Eine vollständig analytische Modellierung ist dabei nur bei Einsichtssystemen möglich, wohingegen bei Mehrschichtsystemen eine numerische Simulation benötigt wird. Ein Anpassungsalgorithmus vergleicht dann die gemessenen mit den simulierten Daten und variiert die Probenparameter, um die Abweichung zwischen Simulation und Realität zu minimieren. Für transparente Materialien mit vernachlässigbar kleinem k ist hier besonders das Cauchy-Modell zu erwähnen, welche den Brechungsindex neu parametrisiert:

$$n(\lambda) = A + B/\lambda^2 + C/\lambda^4 \quad (2.22)$$

Für die Modellierung können dann die Parameter A , B und C variiert werden, um das wellenlängenabhängig Verhalten des Brechungsindex darzustellen. Materialien, welche bei den untersuchten Wellenlängen stärkere Absorptionen zeigen, können mit diesem Modell jedoch nicht hinreichend beschrieben werden. Hierfür haben sich komplexere Modelle, wie das Lorentz-Modell etabliert.^[52]

2.3. Infrarotspektroskopie

Die Untersuchung von Materie mit infraroter Strahlung wird als IR-Spektroskopie bezeichnet. Hierbei werden bei Absorption des Lichts Schwingungen von Molekülen angeregt; die Lage und Stärke der Absorptionsbanden geben dabei Aufschluss über die molekulare Zusammensetzung. Unter IR-Licht werden typischerweise Wellenlängen im Bereich von 800 nm bis etwa 1 mm bezeichnet, womit es sich energetisch zwischen dem roten Teil sichtbaren Lichts und Mikrowellenstrahlung befindet.^[58-59] Anstelle der Wellenlänge λ wird zur Beschreibung von IR-Strahlung häufig die Wellenzahl $\tilde{\nu} = \lambda^{-1}$ verwendet, welche die Zahl der Schwingungsperioden des Lichts pro Längeneinheit angibt. Diese Größe ist proportional zur Frequenz und Energie des Lichts, was die Interpretation gemessener IR-Absorptionen erleichtert. Der IR-Bereich kann somit als $\tilde{\nu} = (12500 - 10) \text{ cm}^{-1}$ angegeben werden.^[58-59] Man unterscheidet grob zwischen drei Bereichen infraroten Lichts: das Nahinfrarot (NIR,

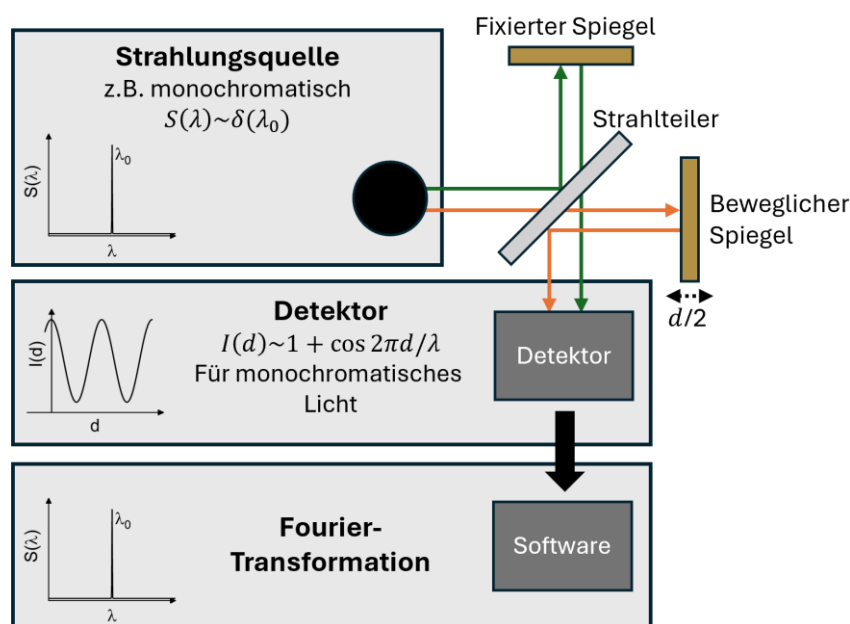


Abbildung 2.10: Aufbau und Funktionsweise eines FTIR-Spektrometers. Durch einen Strahlteiler wird das Licht der verwendeten Quelle in zwei Teile gespalten. Während ein Teil von einem fixierten Spiegel reflektiert wird, wird der andere an einem sich bewegenden Spiegel reflektiert. Durch Rekombination kommt es zu Interferenzmustern. Der Detektor misst die Intensität in Abhängigkeit der Spiegelposition d , was der Fourier-Transformierten des ursprünglichen Spektrums entspricht. Eine weitere Fourier-Transformation durch die verwendete Software rekonstruiert das ursprüngliche Spektrum. Die Abbildung zeigt den einfachen Fall einer monochromatischen Lichtquelle zur Visualisierung der Funktionsweise, während in realen IR-Spektrometern breitbandige Lichtquellen eingesetzt werden.^[57]

2. Theoretische Grundlagen

(12500 – 4000) cm^{-1}), das Mittinfrarot (MIR, (4000 – 400) cm^{-1}) und das Ferninfrarot (FIR, (400 – 10) cm^{-1}).^[58] In der chemischen Analyse wird meistens MIR-Strahlung verwendet, weshalb der technische Stand hier fortschrittlicher als bei den anderen Methoden ist. In diesem Bereich werden die Grundswingungsbanden der meisten Moleküle angeregt, womit wichtige Informationen über den molekularen Aufbau zugänglich sind. Jedoch wurde auch NIR-Spektroskopie, mit der Obertöne und Kombinationsschwingungen angeregt werden können, in den letzten Jahrzehnten stark weiterentwickelt. Mit FIR-Spektroskopie können dagegen intermolekulare Schwingungen und Rotationen angeregt werden.^[58] Für die vorliegende Arbeit findet ausschließlich MIR-Spektroskopie Verwendung. Somit werden MIR und IR im Folgenden synonym verwendet.

Bis in die 1970er Jahre wurden üblicherweise dispersive IR-Spektrometer verwendet. Bei diesen befindet sich zwischen Probe und Detektor ein Monochromator. Somit kann immer nur die Absorption einer Wellenlänge aufgenommen werden, für die Aufnahme eines Spektrums muss also der Monochromator sukzessive verstellt und die Einzelmessungen zusammengefügt werden. Solche Geräte finden heute nur noch in spezialisierten Experimenten Anwendung, beispielsweise für zeitaufgelöste Messungen bei einer einzelnen Wellenlänge.^[57] Die meisten heutzutage verwendeten IR-Spektrometer sind sogenannte FTIR-Spektrometer, deren Aufbau in Abbildung 2.10 dargestellt ist.^[57] Die zentralen Bauelemente sind eine breitbandige Lichtquelle, ein Interferometer und ein Detektor, wobei die Probenposition zwischen Interferometer und Detektor lokalisiert ist. Das Interferometer selbst besteht aus einem Strahlteiler, einem fixiertem und einem beweglichen Spiegel. Der Strahlteiler reflektiert etwa 50% des einfallenden Lichts auf den fixierten Spiegel, während der Rest auf den beweglichen Spiegel trifft. Die Position d des beweglichen Spiegels erzeugt so unterschiedliche Weglängen, bei der Rekombination der Strahlen am Strahlteiler kommt es zu konstruktiver oder destruktiver Interferenz. Das entstehende Signal wird Interferogramm genannt und entspricht mathematisch der Fourier-Transformation des ursprünglichen IR-Spektrums der Lichtquelle. In Abbildung 2.10 wird dies exemplarisch für eine monochromatische Lichtquelle dargestellt, bei breitbandigen Lichtquellen, wie sie üblicherweise verwendet werden, entsteht ein komplexes Interferogramm durch die Rekombination aller Wellenlängen. Das Interferogramm wird vom Detektor gemessen. Um aus diesem das IR-Spektrum zu rekonstruieren, wird Kenntnis über die Spiegelposition benötigt, welche durch einen zusätzlich in das Interferometer eingekoppelten monochromatischen Laser erhalten wird. Die Gerätesoftware berechnet mittels Fourier-Transformation des Interferogramms das IR-Spektrum. Somit ist eine schnelle Datenaufnahme bei hoher Lichtintensität und damit einhergehend gutem Signal-Rausch-Verhältnis möglich. Außerdem erlaubt der Aufbau eines FTIR-Spektrometers eine einfache Anbindung weiterer Messtechniken wie Chromatografie oder Mikroskopie.^[58]

Das erhaltene Spektrum enthält sowohl Informationen der Probe als auch der Gerätebauteile. Um letztere zu entfernen, wird es mit einem Spektrum ohne Probe verrechnet. Die einzelnen Spektren werden dabei als Einkanalspektren bezeichnet. Je nachdem, wie die Verrechnung der Einkanalspektren durchgeführt wird, wird das Absorptionsspektrum A oder das Transmissionsspektrum T erhalten.^[59]

$$A = -\log_{10} T = -\log_{10} I/I_0 \quad (2.23)$$

Hierbei beschreibt I_0 die Intensität des Strahls ohne Probe und I die mit Probe im Strahlengang. Durch die Wahl des alternativen Einkanalspektrums I_0 können bestimmte Aspekte des Absorptions- oder Transmissionsspektrums verstärkt sichtbar gemacht werden. Wird zum Beispiel das Einkanalspektrum

der Probe vor einem chemischen Prozess verwendet, so können dessen Einflüsse auf die weiteren erhaltenen Spektren direkt sichtbar gemacht werden.^[59]

Durch Interaktion mit Materie wird ein Teil der IR-Strahlung absorbiert, was sich in Absorptionsbanden der Spektren äußert. Dabei werden molekulare Schwingungen angeregt werden. Diese sind definiert als Auslenkungen der einzelnen Atome im Molekül, ohne dass sich der Massenschwerpunkt des Gesamtmoleküls ändert. Ein n -atomares Molekül besitzt $N_{vib,nicht-linear} = 3n - 6$ Eigenmoden, beziehungsweise $N_{vib,linear} = 3n - 5$ im Falle linearer Moleküle. Gehen diese Moden mit einer Änderung des Dipolmoments einher, können sie mit IR-Strahlung angeregt werden. In realen Systemen stimmt die Zahl der beobachteten Schwingungsbanden jedoch nicht genau mit N_{vib} überein, da einzelne IR-Frequenzen oft mehrere Schwingungsbanden gleichzeitig anregen. Ebenso können zusätzliche Banden in Form von Obertönen, Kombinations- oder Differenzschwingungsbanden auftreten. Die wichtigsten Molekülschwingungen sind die Streck- oder Valenzschwingung ν , bei der die Auslenkung zu einer periodischen Änderung der Bindungslänge führt, und die Deformationsschwingung δ , bei der eine periodischen Änderung der Bindungswinkel stattfindet. Es handelt sich hierbei um diskrete, quantisierte Zustände. In realen IR-Spektren wird jedoch eine Bandenverbreiterung beobachtet, welche zum Beispiel durch gleichzeitig angeregte Rotationen zustande kommt.^[59] Die Bandenpositionen und -stärken sind abhängig von Stärke des Dipolmoments der Bindung. Bestimmte funktionelle Gruppen zeigen somit Absorptionsbanden mit charakteristischer Lage und Stärke. Somit können über das Absorptions- oder Transmissionsspektrum Aussagen über die chemische Struktur der Probe getroffen werden. Dabei ist IR-Spektroskopie besonders empfindlich auf Einflüsse auf die Elektronendichte und damit die Stärke der Bindungen, wie zum Beispiel durch Wasserstoffbrücken oder induktive Effekte. Bereits eine Änderung der Bindungsstärke um 0,02% ist in IR-Spektren nachzuweisen.^[60]

Zur Untersuchung komplexerer Moleküle sind Kenntnisse über ihre charakteristischen Schwingungsbanden nützlich. Lipide und Proteine, wichtige Bausteine eukaryotischer Zellen (siehe Abschnitt 2.4), besitzen zum Beispiel Banden, welche eindeutig bestimmten funktionellen Gruppen zugeordnet und zur Identifikation des Probenzustands genutzt werden können.^[61-63] So zeigen Methylen(CH_2)-Gruppen im Kopf- und Kettenbereich von Phospholipiden eine symmetrische Valenzschwingungsbande bei $\nu_{\text{CH}_2,sym} \approx 2849 \text{ cm}^{-1}$ und eine asymmetrische Valenzschwingungsbande bei $\nu_{\text{CH}_2,asym} \approx 2917 \text{ cm}^{-1}$ in der $L_{\beta'}$ -Phase, welche beim Übergang in die L_{α} -Phase um etwa 3 bis 6 cm^{-1} zu größeren Wellenzahlen verschoben werden (die Phasen von Lipid-Bilagen sind in Abschnitt 2.4.1 beschrieben). Durch isotopische Substitution des Wasserstoffs in den Kettengruppen besteht die Möglichkeit, die Schwingungsbanden in andere Bereiche zu verschieben, womit Überlagerung mit anderen Schwingungsbanden vermieden und Effekte auf einzelne Bereiche der Probe besser sichtbar gemacht werden können.^[61] Unter Einsatz polarisierter IR-Strahlung kann außerdem die Ordnung der Lipid-Kettengruppen bestimmt werden.^[62]

Proteine zeigen mehrere charakteristische Absorptionsbanden aufgrund ihrer Aminosäure-Seitenketten und dem Peptid-Rückgrat. Von besonderem Interesse sind die Absorptionsbanden der Amid-Bindung. Die Amid I Bande bei ca. 1650 cm^{-1} zeigt eine komplexe Struktur, welche abhängig von der Sekundärstruktur des Proteins ist (siehe Tabelle 2.1). Ein Aufschlüsseln der Bande in ihre einzelnen Komponenten erlaubt somit die Untersuchung der Proteinsekundärstruktur.^[57] Dabei ist die genaue

Tabelle 2.1: Typische Amid I Absorptionsbanden für Protein-Sekundärstrukturen.^[65]

Sekundärstruktur	Bandenposition in H ₂ O, [cm ⁻¹]		Bandenposition in D ₂ O, [cm ⁻¹]	
	Mittelwert	Extremwerte	Mittelwert	Extremwerte
α -Helix	1654	1648 – 1657	1652	1642 – 1660
β -Faltblatt	1633	1623 – 1641	1630	1615 – 1638
	1684	1674 – 1695	1679	1672 – 1694
Schleife	1672	1662 – 1686	1671	1653 – 1691
Ungeordnet	1654	1642 – 1657	1645	1639 – 1654

Zuordnung häufig jedoch schwierig, weshalb mathematische Methoden wie Fourier-Selbstentfaltung genutzt werden, um die Unterbanden deutlicher sichtbar zu machen.^[64]

2.3.1. ATR-Infrarotspektroskopie

Für die IR-Spektroskopie stehen verschiedene Messtechniken zur Verfügung, um Proben unterschiedlicher Art zu untersuchen. Bei Transmissionsmessungen durchquert das IR-Licht die Probe vor dem Detektor. Bei einer homogenen Probe ist die wellenzahlabhängige Absorption gegeben durch das Lambert-Beer'sche Gesetz

$$A(\tilde{\nu}) = c\epsilon(\tilde{\nu})d \quad (2.24)$$

Hierbei beschreibt c die Konzentration der Probe im Lösungsmittel, d die Weglänge des Strahls in der Probe und $\epsilon(\tilde{\nu})$ den wellenzahlabhängigen Extinktionskoeffizienten. Aufgrund der starken IR-Absorption wässriger Lösungen, müssen Küvetten jedoch so konstruiert werden, dass eine sehr kleine Weglänge im Bereich weniger Mikrometer gewährleistet ist.^[57] Der Umgang mit und die Reinigung solcher Küvetten ist aufwändig und ein Austausch des Lösungsmittels schwierig.

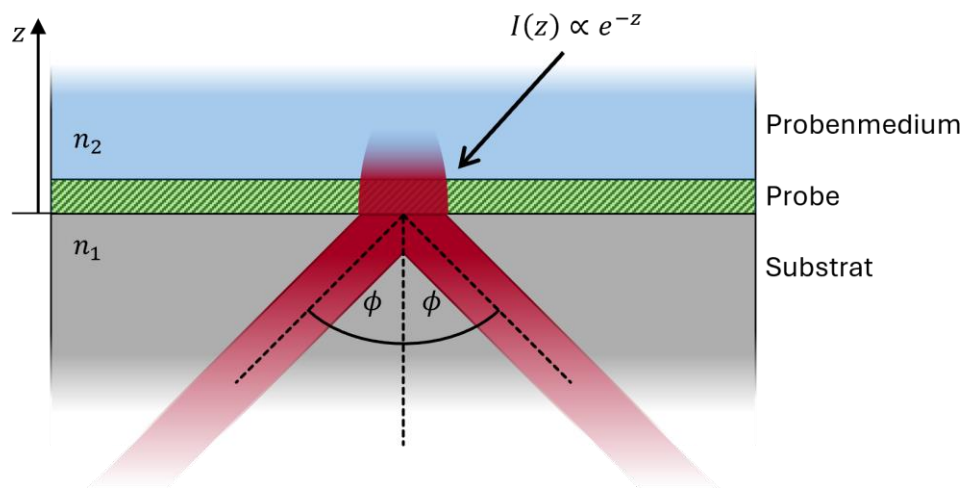


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der ATR-Messtechnik. Einfallendes IR-Licht im Substrat wird an der Grenzfläche zu Probe und Probenmedium totalreflektiert, wobei ein evaneszentes Feld ausgebildet wird (dargestellt als Halbellipse mit Farbverlauf). Dessen Intensität nimmt exponentiell mit dem Abstand z zur Grenzfläche ab und ist außerdem von den Brechungsindizes des Substrats n_1 und des Probenmediums n_2 , sowie dem Einfallswinkel ϕ abhängig. Das evaneszente Feld wird von Probe und Probenmedium absorbiert und schwächt somit das reflektierte Licht ab.^[57, 61, 66]

Um diese Problematik zu umgehen, kann die Probe mithilfe ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht werden. Dabei wird sie auf ein passendes, IR-transparentes Substrat aufgebracht und der IR-Strahl innerhalb des Substrats totalreflektiert.^[67] Am Reflexionspunkt entsteht ein evaneszentes Feld, welches in Probe und Probenmedium eindringt (siehe Abbildung 2.11). Dieses hat dieselbe Wellenlänge, wie das einfallende Licht und kann ebenso wie dieses von der Probe absorbiert werden. Das reflektierte Licht zeigt eine Absorptionsbande, ähnlich wie im Falle einer Transmissionsmessung.^[57, 61] Die Intensität des evaneszenten Feldes fällt mit zunehmendem Abstand zur Grenzfläche exponentiell ab und hat eine Eindringtiefe d_p in der Größenordnung der Wellenlänge des Lichts. Somit ist diese klein genug, dass keine vollständige Absorption der IR-Strahlung durch wässrige Medien stattfindet und Messungen unter diesen Bedingungen ermöglicht sind.^[57, 61] d_p wird definiert als die Distanz zur Grenzfläche, bei der die Intensität der elektrischen Feldstärke auf das e^{-1} -fache ihres Ursprungswertes an der Grenzfläche abgefallen ist. Diese wird auch als Eindringtiefe oder Abklinglänge des elektrischen Feldes bezeichnet. Somit ergibt sich:

$$d_p = \frac{\lambda_0}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \phi - n_2^2}} \quad (2.25)$$

Mit der Vakuumwellenlänge λ_0 , dem Einfallswinkel ϕ und den Brechungsindizes des Substrats n_1 und des Probenmediums n_2 .^[61, 66] Weiter erlaubt die Verwendung von ATR-IR-Spektroskopie den Einsatz von Flusszellen, welchen einen einfachen Austausch des Probenmediums während der Experimente erlauben, ohne dass die Probe selbst austrocknet oder zerstört wird.^[57] Die Präparation von Proben für ATR-IR-Untersuchungen kann jedoch unter Umständen komplexer ausfallen, als dies für andere IR-Messtechniken der Fall wäre. Weiter müssen die Effekte des evaneszenten Feldes auf die erhaltenen Spektren berücksichtigt werden. So ist die Eindringtiefe bei kleinen Wellenzahlen größer, weshalb Absorptionsbanden hier stärker ausfallen als unter gleichen Voraussetzungen bei höheren Wellenzahlen.^[57, 61]

2.4. Eukaryotische Zell-Membranen

Eukaryotische Zellen, das heißt biologische Zellen, welche einen Zellkern enthalten, bilden einen wichtigen Grundstein des Lebens. Das Äußere der Zelle bildet die Zellmembran, welche das Zytoplasma, bestehend aus Zytosol und Organellen, beinhaltet. Die Membran stellt dabei den ersten Kontaktpunkt der Zelle mit der Außenwelt, wie anderen Zellen oder Fremdkörpern dar. Ihre Integrität ist somit essenziell für Fortbestehen und Funktionen der Zelle.^[68]

Ihre Hauptfunktion besteht in der Regelung des Flusses von Molekülen und Ionen in und aus der Zelle heraus.^[68] Sie liefert dabei einen wichtigen Beitrag zum Erhalt des Gleichgewichts des Zytosols.^[69] Auch beeinflusst sie maßgeblich die interzelluläre Kommunikation und ist an einer Vielzahl komplexer Prozesse wie beispielsweise Phagozytose beteiligt. Auch einige Organellen der Eukaryonten, wie Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum, sind von einer eigenen Membran umgeben.^[70]

Die Zellmembran ist ein komplexes Gebilde aus Lipiden, Proteinen und Kohlehydraten (siehe Abbildung 2.12).^[68] Dabei bilden Lipide eine Bilagen-Struktur aus, welche das Grundgerüst der Membran darstellt und deren grundlegenden Funktionen bestimmt. In Säugetierzellen wurden bereits über tausend verschiedene Lipide nachgewiesen.^[71] Auf Grundlage typischer molekularer Bausteine und

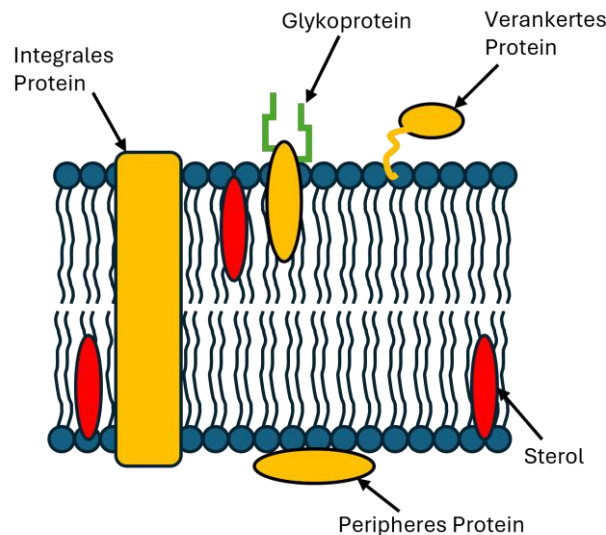


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung einer typischen Zellmembran. Das Grundgerüst wird durch Lipide gebildet. Verschiedene Arten von Proteinen binden an die Lipid-Bilage oder lagern sich in diese ein, ebenso wie Sterole. Die Zusammensetzung der Membran bestimmt durch die Vielzahl an verschiedenen Komponenten deren biologische Funktionalität.^[68]

physikalisch-biologischer Eigenschaften ist es möglich, diese in einzelne Gruppen, wie Phospholipide und Sterole, einzuteilen (siehe auch Abschnitt 2.4.1). Jedoch besteht auch innerhalb dieser Gruppen eine hohe Diversität. Etwa 50% der Membran-Matrix besteht aus Proteinen. Diese lassen sich in drei Gruppen eingliedern, die ihre Assoziation mit der Membran widerspiegeln. Integrale Proteine sind in die Membran eingelagert und durchdringen diese. Periphere Proteine lagern dagegen an die Oberfläche der Membran an. Verankerte Proteine sind nicht direkt mit der Zellmembran verbunden, sondern binden an andere, in der Membran eingelagerte Moleküle. Membranproteine sind üblicherweise nicht homogen über die Membran verteilt, sondern bilden laterale Domänen aus, die für spezielle Membranfunktionen wie Ionenaustausch oder interzelluläre Kommunikation zuständig sind. Während die Wechselwirkungen der Proteine mit der Membran hauptsächlich auf hydrophoben oder ionischen Wechselwirkungen beruhen, sind Kohlenhydrate kovalent an Lipide oder Proteine an der äußeren Oberfläche der Zellmembran gebunden und modifizieren somit deren Funktionalität.^[72]

Aufgrund der Bedeutung für biologische Prozesse und ihrer Komplexität, sind Zellmembranen ein viel untersuchtes Gebiet der biologischen und interdisziplinären Forschung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich primär mit biomimetischen Membranen, welche aus Lipid-Bilagen und Membranproteinen aufgebaut sind, weshalb diese Biomoleküle in den nachfolgenden Abschnitten genauer betrachtet werden.

2.4.1. Lipid-Bilagen

Lipide bilden das Grundgerüst der Zellmembran. Dabei gibt es eine große Zahl verschiedener Lipide, welche sich in Aufbau und ihren biologischen und physikalischen Eigenschaften, wie Dicke, Ladung und Affinität zu anderen Molekülen, unterscheiden. Dies lässt eine Klassifizierung in verschiedene Gruppen zu. Mit (50 – 60) mol% sind Phospholipide die am häufigsten in Säugetierzellmembranen vertretenen Lipide.^[73] Ihr Aufbau ist in Abbildung 2.13 A dargestellt. Das Rückgrat stellt Glycerin da (in Abbildung 2.13 A grün eingezeichnet). Zwei seiner Hydroxy-Gruppen sind mit Fettsäuren (blau) verestert, die dritte mit einer Phosphat-Gruppe, welche wiederum mit der Kopfgruppe verestert ist.^[68, 74] Je nach Kopfgruppe werden Phospholipide weiter unterteilt. So tragen zum Beispiel Phosphatidylglycerole (PG) Glycerin als Kopfgruppe, während Phosphatidylcholine (PC) eine Cholin-Gruppe beinhalten. Aufgrund des positiv geladenen Cholins handelt es sich bei PC um zwitterionische und netto-ungeladene Lipide, während es sich bei PG um negativ geladene Lipide handelt. Es besteht die weitläufige Annahme, dass die zwitterionische Eigenschaft des PC essenziell für die Ausbildung stabiler Zellmembranen ist. Die äußere Schicht dieser besteht dabei zu bis zu 90% aus diesen Phospholipiden.^[68] Daneben sind sie auch als oberflächenaktive Substanzen in biologischen Systemen zu finden, so zum Beispiel als Teil der Gelenkknorpel-Oberfläche^[75] oder als Surfactanten, welche die innere Oberfläche der Lungenbläschen bedecken.^[76] Durch den Aufbau existiert ein hydrophober und ein hydrophiler Bereich im Molekül, wobei ersterer die Alkyl-Ketten der Fettsäure beinhaltet, während das übrige Molekül letzterem Bereich zugeordnet wird. Es handelt sich bei Phospholipiden somit um amphiphile Moleküle. Bei Zusammenlagern von Phospholipiden können sie verschiedene Strukturen wie Mizellen, Vesikel, oder Mono- und Bilagen ausbilden. Dabei sind sie immer so angeordnet, dass die hydrophoben Bereiche der Lipide in räumlicher Nähe zueinander sind, ebenso wie die hydrophilen Bereiche. Somit zeigen auch diese Aggregate definierte hydrophile und hydrophobe Bereiche. In wässrigen Medien sind letztere dabei immer durch die hydrophile Schicht gegen das Lösungsmittel

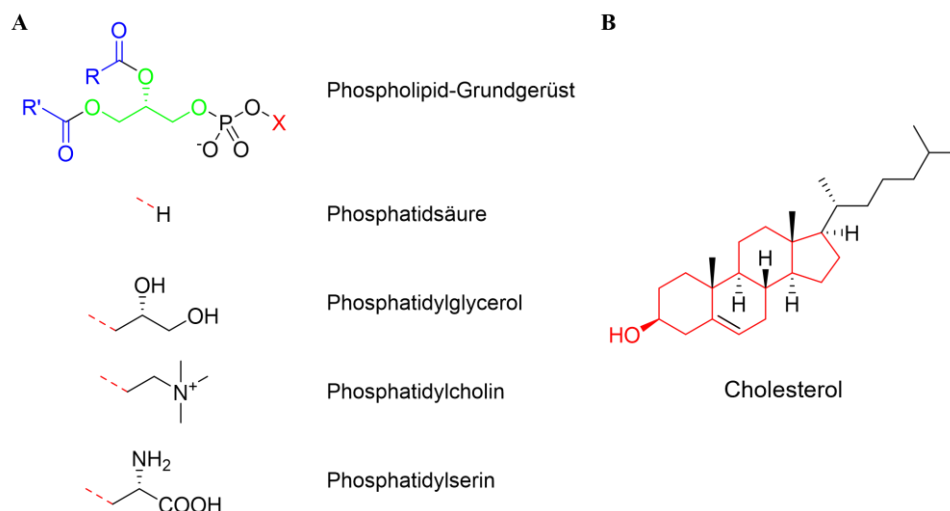


Abbildung 2.13: A Grundlegender Aufbau von Phospholipiden. Die obige Darstellung zeigt das Grundgerüst, bestehend aus Glycerol (grün), den veresterten Fettsäuren (blau), der Phosphatgruppe (schwarz) und der Kopfgruppe X (rot). Für letztere ist eine Auswahl von typischen Kandidaten und dem damit assoziierten Namen des Phospholipids gegeben.^[68] B Cholesterol, das häufigste in Eukaryoten-Membranen anzutreffende Sterol. Das Sterol-Grundgerüst ist rot eingezeichnet.

2. Theoretische Grundlagen

abgeschirmt.^[77] So bestehen Bilagen aus zwei Monolagen, welche so aggregieren, dass sich die Fettsäuregruppen im Inneren befinden. Lipide haben dabei keinen festen Platz, sondern können sich lateral in der Monolage bewegen. Auch können sie in die andere Lage übergehen, ein Prozess der durch spezialisierte Proteine, die Flippasen, katalysiert wird.^[68, 78] Eine weitere wichtige Klasse der Lipide sind Sterole. Diese weisen ein tetra-zyklisches Grundgerüst mit einer Hydroxy-Gruppe (in Abbildung 2.13 B rot eingezeichnet) sowie einer flexiblen hydrophoben Seitenkette auf. Die Hydroxid-Gruppe gibt dem anderweitig hydrophoben Sterol hydrophile Eigenschaften, während die Seitenkette für die Diversität der Sterole sorgt. Dabei sind verschiedene Seitenketten charakteristisch für bestimmte Domänen des Lebens. In tierischen Zellmembranen kommt zum Beispiel hauptsächlich das Sterol Cholesterol (Chol, Abbildung 2.13 B) vor, wohingegen in Fungi Ergosterol üblich ist. Sterole sind nicht dazu imstande, eigenständig Bilagen auszubilden. Stattdessen lagern sie sich in von Phospholipiden wie PC gebildeten Bilagen ein, wobei die Hydroxid-Gruppe in die hydrophile Kopfgruppen-Schicht integriert ist. Die Einlagerung führt dabei zu einer Umstrukturierung der Membran, was deren physikalische und biologische Eigenschaften wie Dicke, Biegesteifigkeit und Permeabilität beeinflusst.^[68, 79-81]

Die genaue Struktur der Phospholipid-Bilagen ist von mehreren internen und externen Faktoren abhängig. Je nach Art der Kopfgruppe, Länge und Sättigungsgrad der Fettsäuren, aber auch Zusammensetzung der Bilage sind die interne molekulare Anordnung und somit auch physikalische Eigenschaften wie Dicke und Biegesteifigkeit unterschiedlich.^[82-83] Dabei treten temperaturabhängige Phasen auf, wie sie in Abbildung 2.14 dargestellt sind. Sie sind strukturell charakterisiert durch die Welligkeit der Bilage und die interne Anordnung der Fettsäureketten.^[84] Bei niedrigen Temperaturen liegen die Lipide in der geordneten sub-Gel-Phase L_C vor. Die Fettsäureketten sind dabei gestreckt und zeigen einen hohen Ordnungsgrad. Gleichzeitig sind sie gewinkelt zur Bilagen-Normalen angeordnet. Bei Temperaturerhöhung findet ein Phasenübergang in die Gel-Phase L_β oder $L_{\beta'}$ statt. Die Bilage ist in dieser Phase stärker hydratisiert und die Ordnung der Kettengruppen sinkt, ist jedoch noch immer hoch. In der $L_{\beta'}$ -Phase liegen die Kettengruppen weiterhin gewinkelt zur Bilagen-Normale vor, während sie in der L_β -Phase parallel zu dieser angeordnet sind. Welche der beiden möglichen Gel-Phasen vorliegt, ist von der Kopfgruppe des Lipids abhängig. So bilden zum Beispiel Phosphatidylethanolamine (PE) typischerweise die L_β -Phase aus, während PC üblicherweise die $L_{\beta'}$ -Phase ausbildet.

Bei höheren Temperaturen findet ein Übergang in die flüssigkristalline L_α -Phase, bei der die Fettsäuren parallel zur Bilagen-Normale vorliegen, jedoch stark ungeordnet sind. Diese ist die physiologisch wichtigste Phase; die meisten Lipid-Bilagen in biologischen Systemen liegen in dieser Phase vor. Bei PC mit Fettsäuren unter einer Länge von 20 Kohlenstoffatomen kann ein zweistufiger Übergang zur flüssigkristallinen Phase über die gewellte $P_{\beta'}$ -Phase beobachtet werden. Diese ist charakterisiert durch langwellige Fluktuationen und eine anormale Zunahme der Lagendicke. Die Fettsäureketten liegen gewinkelt vor und zeigen eine Ordnung, welche zwischen der $L_{\beta'}$ - und L_α -Phase liegt. Langkettige PCs zeigen dahingegen keinen zweistufigen Übergang, wobei der Grund hierfür nicht abschließend geklärt ist. In gemischten Lipid-Bilagen können auch Mischungen verschiedener Phasen mit Domänenbildung vorliegen.^[82, 85]

Die direkte Untersuchung biologischer Membranen ist oft mit größeren Schwierigkeiten verbunden, da ihr Aufbau komplex und ihre Isolation aufwändig ist.^[86-89] Somit ist eine synthetische Darstellung von Lipid-Aggregaten nützlich, um biomimetische Modellsysteme der Membranen zu erhalten.

Monolagen und bis zu zwei Bilagen können mithilfe eines Langmuir-Trogs präpariert werden.^[86] Dabei werden die Lipide in einem flüchtigen organischen Lösungsmittel gelöst und auf eine Wasseroberfläche aufgetragen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels bleiben die Lipide auf der Oberfläche zurück, wobei sich die hydrophoben Fettsäureketten auf der Luft-Seite befinden. Der entstandene Film wird durch Zusammenschieben von Barrieren komprimiert, sodass eine vollständige Monolage entsteht. Diese kann dann direkt untersucht^[2, 90] oder verwendet werden, um substratgestützte Bilagen zu präparieren. Hierfür wird ein geeignetes Substrat vor dem Aufbringen der Lipide in den Trog eingetaucht. Beim Herausziehen des Substrats wird eine Monolage auf der Substrat-Oberfläche aufgebracht. Man bezeichnet diesen Prozess als Langmuir-Blodgett-Technik (LB). Die Substrat-Oberfläche ist dabei orthogonal zur Wasseroberfläche ausgerichtet. Um eine vollständige Bilage zu erhalten, kann das Substrat anschließend erneut in den Trog eingetaucht werden. Dies erfolgt entweder mit der genannten Orientierung nach LB oder mit einer Orientierung der Substrat-Oberfläche parallel zur Wasseroberfläche. Letzteres wird Langmuir-Schäfer-Technik (LS) genannt. Während bei LS die äußere Monolage nur auf einer Substrat-Oberfläche abgeschieden wird, findet die bei LB auf beiden Substrat-Oberflächen statt. Somit erlaubt LS eine asymmetrische Beschichtung beider Seiten. Ein weiterer Vorteil ergibt sich bei Lipiden, welche nur schwache Interaktionen mit der Substrat-Oberfläche haben. Hier besteht beim Auftragen der zweiten Monolage in LB-Orientierung die Gefahr, die erste Monolage beim Eintauchen in die Flüssigphase abzulösen, was in LS-Orientierung vermieden wird.^[86] Während mit LB und LS reproduzierbar bis zu zwei Bilagen mit guter Vollständigkeit abgeschieden werden können ist die Präparation größerer Bilagen-Stapel hiermit jedoch nicht möglich.

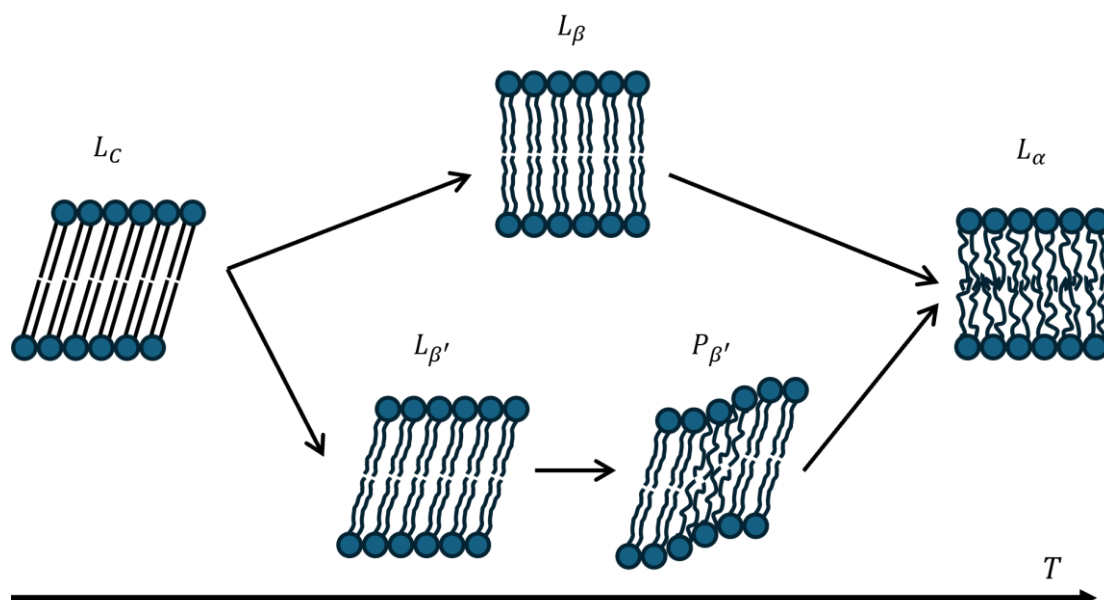


Abbildung 2.14: Darstellung typischer Phasen von Lipid-Bilagen. Von links nach rechts sind die thermodynamisch stabilen Anordnungen bei steigender Temperatur dargestellt, wobei die $P_{\beta'}$ -Phase nur bei einigen Phosphatidylcholinen beobachtet wird.^[84]

2. Theoretische Grundlagen

Alternativ können substratgestützte Bilagen mithilfe von Vesikelfusion präpariert werden.^[87] Hierfür wird zunächst eine Lösung von Lipid-Vesikeln hergestellt, beispielsweise durch Ultraschallbehandlung^[91] oder Extrusion.^[92] Diese wird dann in Kontakt mit der Substratoberfläche gebracht, sodass die Vesikel auf dieser adsorbieren und aufplatzen können, woraufhin sie zu einer Bilage zusammenwachsen. Oft findet dieser Prozess spontan statt, er kann jedoch auch durch äußere Einflüsse wie Temperatur oder osmotischen Druck ausgelöst werden. Die Lipide sind dabei während des gesamten Prozesses vollständig hydratisiert und zeigen dadurch ein Verhalten nahe ihrem nativen biologischen Zustand. Auch ist die Abscheidung von Vesikeln auf zuvor mit LB oder LS präparierten Bilagen möglich.^[86-87]

Werden größere Stapel von Bilagen, sogenannte Oligobilagen, benötigt, bietet sich deren Präparation durch Rotationsbeschichtung an.^[88] Hierbei wird eine Lösung der Lipide in einem flüchtigen Lösungsmittel angesetzt, welche auf das Substrat aufgebracht wird. Dieses wird sodann mit hoher Frequenz gedreht, sodass der Großteil der Lösung von der Oberfläche geschleudert wird und nur ein dünner Film verbleibt. Die Zahl der Bilagen kann dabei über verschiedene Parameter wie Rotationsgeschwindigkeit, Temperatur, Viskosität und Dampfdruck des Lösungsmittels oder die Konzentration der Lipide in Lösung gesteuert werden und ist gut reproduzierbar. Somit können Stapel von bis zu 30 Bilagen präpariert werden.^[88]

Um Multilagen von mehreren Hundert bis Tausend Bilagen zu präparieren können diese aus einer Lösung auf dem Substrat eingedampft werden. Es handelt sich hierbei um eine simple Präparationsmethode um die physikalischen Eigenschaften der Lipide-Bilagen zu untersuchen, da der Einfluss des Substrats durch die große Anzahl an Bilagen unterdrückt wird. Über die Lipid-Konzentration in der verwendeten Lösung ist die Anzahl der Bilagen einigermaßen gut kontrollierbar, jedoch nicht genau reproduzierbar.^[44]

Alternativ können Lipid-Oligobilagen und -Multilagen mit Airbrush-Techniken auf die Substratoberfläche aufgebracht werden. Dabei werden wässrige Lösungen von Lipid-Vesikeln auf die Oberfläche aufgesprüht, wobei die Bilagenzahl durch den am Sprühkopf angelegten Druck, den Abstand zum Substrat, die Dauer des Sprühvorgangs, sowie der Konzentration des Lipids in der Emulsion kontrolliert werden kann.^[93-94]

2.4.2. Membranproteine Zytochrom C und Gramicidin

Wie in Abschnitt 2.4 beschrieben enthalten Zellmembranen neben Lipiden und Kohlehydraten eine Vielzahl von Proteinen, welche auf unterschiedliche Art mit der Membran verbunden sind und ebenso deren Funktionalitäten auf verschiedene Arten modifizieren. Die Zahl der bekannten Membranproteine übersteigt den Rahmen der vorliegenden Arbeit deutlich, weshalb nachfolgend nur zwei Proteine, welche hier Anwendung finden, genauer beleuchtet werden sollen.

Das Protein Zytochrom C (CytC) ist ein essenzieller Bestandteil tierischen Lebens. Es handelt sich dabei um ein kleines Protein von 100 – 120 Aminosäuren und einem MW von 13 kDa. In den Mitochondrien ist es am Prozess der ATP-Synthese beteiligt. Darüber hinaus spielt es eine wichtige Rolle im Zelltod, der sogenannten Apoptose, sowie der embryonalen Entwicklung der Immunabwehr. In Eukaryoten ist es als peripheres Membranprotein der inner-mitochondrialen Membran zu finden.^[96] Die Struktur mitochondrialen CytC wurde in den 1970er Jahren von Swanson *et al.* aufgeschlüsselt.^[97] Die Unterschiede zwischen dem CytC verschiedener Säugetiere sind gering. Sie alle enthalten eine oder mehrere Häm-Gruppen, welche kovalent über eine Thioether-Bindung mit Cystein mit der Polypeptid-Kette verbunden sind (siehe Abbildung 2.15). Das Zentrum der Häm-Gruppe bildet ein sechsfach koordiniertes Fe^{2+} -Ion. Dieses ist vierfach von den vier Stickstoff-Atomen des Porphyrin koordiniert, zwei weitere Koordinationen finden durch Histidin und Methionin in den Protein-Seitenketten statt.^[98] In seiner Hauptfunktion dient CytC als Elektronentransferprotein im Zellatmungsprozess. Es agiert dabei als Redox-Intermediat zum Transfer zwischen membrangebundenen Proteinkomplexen der Mitochondrien. Dieser bewirkt einen Protonenfluss über die Membran aus der Mitochondrien-Matrix. Durch den passiven Rückfluss von Protonen wird die ATP-Synthase angetrieben.^[96, 98] Aufgrund seiner thermischen Stabilität und stark rötlichen Färbung ist die Isolation und Aufarbeitung vergleichsweise einfach, was es in Kombination mit seiner Bedeutung für wichtige Zellprozesse zu einem der meistuntersuchten Proteine macht.^[98-101]

Gramicidin ist ein antibiotisch wirkendes Protein, welches vom Bakterium *Bacillus brevis* während der Sporenbildung produziert wird.^[102] Dabei ist seine genaue Rolle für das Bakterium bislang nicht

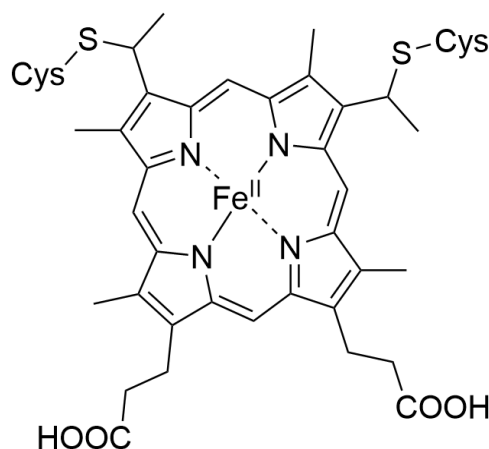


Abbildung 2.15: Häm C Gruppe, wie sie in Zytochrom C vorzufinden ist. Das zentrale Eisen-Ion wird sechsfach koordiniert. Es wird vierfach durch die Stickstoff-Atome des Porphyrin-Rings koordiniert, während zwei weitere Koordinationen durch Methionin und Histidin der Protein-Seitenketten gegeben sind.^[95]

2. Theoretische Grundlagen

bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass es eine Rolle bei der Gen-Regulation beim Übergang von der vegetativen Wachstumsphase des Bakteriums in die Sporulations-Phase spielt.^[102-103] Seine antibiotische Wirkung wurde durch René Dubos nachgewiesen und 1939 als erstes Antibiotikum in klinischen Studien angewandt.^[104] Der Erfolg dieser ebnete den Weg für die Forschung an weiteren wichtigen Arzneimitteln wie Penicillin.^[105] Gramicidin ist ein lineares Pentadecapeptid mit einem MW von etwa 1,9 kDa, welches nativ helikale Strukturen ausbildet. Es besteht ausschließlich aus hydrophoben und amphiphilen Aminosäuren. Zusätzlich sind der C- und N-Terminus funktionalisiert, wodurch es eine der hydrophobsten bekannten Peptidsequenzen zeigt.^[103, 106]

Es sind verschiedene Arten von Gramicidinen bekannt, die sich in ihrem Aufbau leicht unterscheiden. Gramicidin A macht etwa 85% der natürlichen Gramicidin-Mischung aus. An der elften Position seiner Aminosäuresequenz befindet sich Tryptophan, welches bei Gramicidin B durch Phenylalanin und bei Gramicidin C durch Tyrosin ersetzt ist. Die natürliche Mischung der Gramicidine wird als Gramicidin D (GramD) bezeichnet.^[103] Im Gegensatz zu den meisten Proteinen, welche ausschließlich aus L-Aminosäuren bestehen, besteht Gramicidin aus alternierenden L- und D-Aminosäuren. Dieser Aufbau begünstigt die Ausbildung der helikalen Struktur, da somit die hydrophoben Seitenketten auf der Außenseite der Helix angeordnet sind, während sich das polare Peptidrückgrat in deren Inneren befindet.^[107] Abhängig von seiner Umgebung bilden Gramicidine zwei Formen aus. In organischen Lösungsmitteln ist es häufig in Form einer zweisträngigen Helix vorzufinden, in Membranen eingelagertes Gramicidin liegt hingegen üblicherweise in Form gestapelter einsträngiger Helices vor, wobei die Dimerisierung über die N-Termini stattfindet.^[103]

So in Membranen eingelagertes Gramicidin bildet einen Ionenkanal von etwa 4 Å Durchmesser über die Membran hinweg aus, welcher groß genug für monovalente Kationen ist. Es sei angemerkt, dass die zweisträngige Form des Gramicidins solche Kanäle nicht ausbilden kann.^[103] Die Länge des Dimers beträgt etwa 26 Å, was in etwa der Größenordnung einer typischen Lipid-Monolage entspricht. Diese lagert bei Integration des Proteins um, sodass der Ionenkanal sie vollständig durchdringt.^[107-108] Die antibiotische Wirkung Gramicidins ist auf das Ausbilden der Ionenkanäle zurückzuführen. In Zellmembranen regeln diese den Austausch von Ionen zwischen Zytoplasma und Umgebung der Zelle. Durch das eingelagerte Gramicidin wird das empfindliche Gleichgewicht gestört, was die Funktionen der Zelle erheblich stört und zum Zelltod führen kann.^[107, 109] Aufgrund seiner guten Verfügbarkeit, einfachen Modifikation und seines gut aufgeklärten Verhaltens bei Einlagerung in Lipid-Membranen ist Gramicidin ein ideales Modell-Peptid zur Untersuchung von Peptid-Lipid-Interaktionen.^[103, 107]

2.5. Gold-Nanopartikel

Nanomaterialien sind Verbunde von Atomen oder Molekülen in der Größe von (1 – 100) nm.^[110] Diese treten in verschiedenen Formen und Zusammensetzungen auf. So können aus Metallen, Halbleitern und Metalloxiden unter anderem nanoskalige Partikel in Form von Sphären, Hohlkugeln, Stäben oder Scheiben synthetisiert werden.^[111] Auch Kohlenstoff-Nanoröhren, -Nanofasern und Fullerene zählen zu typischen Nanomaterialien.^[112] Nanomaterialien haben ein sehr großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis, weshalb sie sich in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften deutlich von den entsprechenden Bulk-Materialien unterscheiden. So können sie zum Beispiel als Trägermaterialien für medizinische Wirkstoffe verwendet werden. Durch Funktionalisierung kann eine gezielte Anreicherung

von AuNPs in dem Gewebe bewirkt werden, in dem der Arzneistoff wirken soll. Somit können die typischen Nebenwirkungen der Chemotherapie, bei der häufig gesundes Gewebe ebenso wie Karzinomen angegriffen wird, drastisch reduziert werden.^[10] Weiter zeigen AuNPs eine größenabhängige Färbung, die üblicherweise nicht mit dem Bulk-Edelmetall verbunden werden würde. Hintergrund ist die Oberflächenplasmonenresonanz, ein Phänomen, bei dem durch Interaktion von Licht mit Metallen eine kollektive Schwingung der an der Oberfläche befindlichen Elektronen ausgelöst wird. Dies macht AuNPs zu nützlichen Materialien für Optik und Sensorik.^[9] Hinsichtlich photothermischer Krebstherapie erlaubt die Oberflächenplasmonenresonanz auch die gezielte Schädigung von Krebsgewebe durch Erhitzen eingebrachter Partikel mithilfe von Lasern. Während das umliegende Gewebe nur schwache Absorption der Laserstrahlung zeigt und somit unbeschädigt bleibt, führt die Anhäufung der NP im Tumorgewebe zu einer starken Erhitzung, die das Absterben des Gewebes zur Folge hat.^[11]

Titanoxid-NPs zeigen starke Absorption von ultravioletter Strahlung und werden daher für in Kosmetika wie Sonnencreme eingesetzt.^[113] Darüber hinaus werden Nanomaterialien, insbesondere Edelmetall-NPs, für die heterogene Katalyse verwendet.^[114] Durch die vielfältigen Anwendungsgebiete ist in den letzten Jahrzehnten ein beständig wachsender Markt für Nanomaterialien entstanden. Die Marktforschung geht von einer jährlichen Produktion von über 2000 Kilotonnen bis 2028 aus.^[115]

Gleichzeitig birgt die wachsende Exposition zu Nanomaterialien auch Risiken für Mensch und Umwelt. Das Einatmen von NPs, zum Beispiel über Feinstaub, wird mit einem deutlich gesteigerten Krebsrisiko in Verbindung gebracht.^[13] Auch der Einsatz von Titanoxid-NPs in Sonnencreme wird in den letzten Jahren aufgrund der potenziellen Auswirkungen auf Flora und Fauna in Gewässern sowie Langzeitfolgen für menschliche Haut und Gesundheit kontrovers betrachtet.^[113] Die Auswirkungen von NPs auf biologische Systeme sind nicht vollständig aufgeklärt und Langzeitfolgen oft unvorhersehbar.^[12]

Da sich die vorliegende Arbeit mit der Interaktion kolloidaler AuNP mit biomimetischen Membranen beschäftigt, wird deren Herstellung im Folgenden näher beschrieben. Während AuNP bereits im antiken Rom zur Färbung von Glas zum Einsatz kamen, wenngleich ohne Kenntnis der genauen Hintergründe der Färbung,^[116] kommen heutzutage kontrollierte Prozesse zum Einsatz, mit denen Partikel reproduzierbarer Größe hergestellt werden können. Die verschiedenen Methoden können dabei grob in Top-Down- oder Bottom-Up-Verfahren unterteilt werden. Bei ersteren werden NPs aus einem Bulk-Material herausgelöst, zum Beispiel durch Laserablation oder dieses mechanisch zerkleinert, um das Nanomaterial zu erhalten.^[117] Dies erlaubt eine schnelle Präparation, welche gut skalierbar und somit vor allem für die chemische Industrie von Interesse ist. Jedoch ist die Größenverteilung oft breit und schlechter kontrollierbar als bei Bottom-Up-Verfahren. Diese basieren dagegen auf der spontanen Clusterbildung von einzelnen Atomen in übersättigter Lösung zu den Nanomaterialien. Durch den Einsatz von stabilisierenden Liganden und Variation der Reaktionsbedingungen können gezielte Partikelgrößen mit enger Größenverteilung erzeugt werden. Solche Verfahren sind jedoch nur bedingt skalierbar und üblicherweise deutlich zeitaufwändiger.^[117]

Synthesen von AuNP basieren dabei allgemein auf der Reduktion von Au^{3+} -Ionen in wässriger Lösung, wodurch eine Übersättigung von Au^0 erzeugt wird. Die Atome agglomerieren somit zu Partikeln.^[118] Die Größe der Partikel und erzielte Größenverteilung ist dabei in großem Maße von der Geschwindigkeit

2. Theoretische Grundlagen

des Reduktionsschritts abhängig. Bei schneller Reduktion und damit einhergehenden Übersättigung werden mehr Kristallisationskeime gebildet und es entstehen kleinere Partikel. Somit haben die Wahl von Lösungsmittel, Reduktionsmittel und Reaktionstemperatur einen großen Einfluss auf die erhaltene Partikelgröße.^[118] NPs sind metastabile Gebilde und neigen zur Agglomeration. Der Einsatz stabilisierender Liganden ist somit essenziell um eine kontrollierte Partikelgröße zu erhalten. Für AuNP kann hierfür dessen starke Affinität zu Thiolen ausgenutzt werden, um Liganden an der Partikel-Oberfläche zu adsorbieren, die ein Zusammenwachsen der Partikel hemmen.^[118] Die zwei wichtigsten Synthesemethoden werden nachfolgend erläutert.

Bei der Citrat-Synthese nach Turkevich *et al.* wird einer wässrigen Au^{3+} -Lösung unter Rühren eine Lösung von Natriumcitrat hinzugefügt.^[119] Dieses dient dabei sowohl als Reduktionsmittel, als auch als Partikel-Stabilisator. Somit können NPs mit einem Durchmesser von etwa (20 – 40) nm bei schmaler Größenverteilung synthetisiert werden. Die Größe der Partikel lässt sich dabei durch Variation des pH-Wertes oder Zusatz von Fremdsalzen regulieren.^[120-121] Eine Isolation der Partikel zur Untersuchung kontrollierter Interaktionsmechanismen ist jedoch schwierig.

Bei der in den 1990er Jahre entwickelten AuNP-Synthese nach Brust und Schiffrin findet dagegen die Reduktion der Au^{3+} -Ionen unter Phasentransferkatalyse in einer organischen Phase statt, welche langkettige Thiole als Stabilisatoren enthält.^[122] Durch den Einsatz starker Reduktionsmittel wie Natriumborhydrid können sehr kleine Partikel mit Durchmesser < 10 nm und großer Homogenität erhalten werden, die sich leicht isolieren und trocknen lassen. Die Partikelgröße kann außerdem durch das Mengenverhältnis der Au^{3+} -Ionen zu den Liganden gesteuert werden.^[123] Die Synthesemethode zeichnet sich außerdem durch eine gute Reproduzierbarkeit aus, was eine breite Anwendung in der Forschung seit der Erstpublikation zur Folge hatte.^[124] Neben AuNP wurde außerdem auch die Synthese anderer Edelmetall-NPs wie Silber und Kupfer demonstriert.^[125-126] Da die erhaltenen NPs jedoch aufgrund ihrer Liganden kaum wasserlöslich sind, müssen diese vor Verwendung in wässrigen Medien gegen amphiphile Liganden ausgetauscht werden. Hierbei ist wichtig, dass die amphiphilen Liganden eine ähnlich starke Bindung zum Metall eingehen, damit sich ein chemisches Gleichgewicht beider Liganden auf der Partikeloberfläche einstellen kann.^[118, 127]

3. Experimentaltteil

3.1. Liste verwendeter Chemikalien

Tabelle 3.1: Für die vorliegende Arbeit verwendete Chemikalien. Wo nicht genannt, wurde vom Hersteller keine Angabe zur Reinheit gegeben.

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
Aceton	≥ 99,8%	Sigma-Aldrich
Ammoniak (25%)	p.a.	Bernd Kraft
Chloroform	> 99%	Acros Organics
Chloroform (Uvasol)	≥ 99%	Supelco
Cholesterol	> 99%	Avanti Polar Lipids
α-Chymotrypsin aus Rinderpankreas, ≥ 40 units/mg	Keine Angabe (k.A.)	Sigma
Zytochrom C (CytC) aus Rinderherz	≥ 95%	Sigma
Deuterium Oxid (D ₂ O)	99,9 atom%	Sigma-Aldrich
Dichlormethan (DCM)	> 99%	Sigma-Aldrich
Diethylether	≥ 99,8%	Merck
1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC)	> 99%	Avanti Polar Lipids
1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DMPG)	> 99%	Avanti Polar Lipids
Ethanol	> 99,8%	Honeywell
Gold(III)chlorid-Trihydrat	> 99,9%	Aldrich
Gramicidin von <i>Bacillus aneurinolyticus</i> (<i>Bacillus brevis</i>), Mischung aus Gramicidin A, B und C	k.A.	Sigma-Aldrich
Hexan	> 95%	Acros Organics
Hyaluronsäure, 731 kDa		Lifecore
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethanolsulfonsäure	≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
Isopropanol	p.a.	Honeywell
Kaliumchlorid	≥ 99%	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl ₂), anhydrous	≥ 98%	Sigma-Aldrich

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
<i>N,N,N</i> -trimethyl-(11-mercaptoundecyl)ammoniumbromid (MABr)	> 90%	Aldrich
Natriumborhydrid	99%	Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	p.a.	Applichem
Octadecanthiol	≥ 98%	Merck
Octadecyltrichlorsilan	p.a.	Sigma-Aldrich
Octadecanthiol-funktionalisierte Gold-Nanopartikel, 2 – 4 nm durchschnittliche Partikelgröße, 2% (w/v) in Toluol	k.A.	Aldrich
Octanthiol	≥ 98,5%	Aldrich
Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH), 58 kDa	k.A.	Aldrich
PAH, 17,5 kDa	k.A.	Aldrich
Salzsäure (31%)	p.a.	Supelco
Tetrahydrofuran (THF)	99,8%	Fisher Scientific
Tetraoctylammoniumbromid	98%	Merck
Thioessigsäure	96%	Aldrich
Toluol	p.a.	Honeywell
Triethanolamin	> 99%	Sigma-Aldrich
Trimethylamin (4,2 mM in Ethanol)		Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05%	Gibco
11-Undecenylbromid	95%	Aldrich
Wasserstoffperoxid (30%)	p.a.	Labochem International

3.2. Verwendete Software

Zur Darstellung aller erhaltener Daten wurde OriginPro 2021b verwendet (OriginLab, Northampton, USA), die Darstellung von Molekülen erfolgte in ChemDraw 19.0 (PerkinElmer, Waltham, USA). Die Auswertung der Daten aus Messungen mit IR-Spektroskopie erfolgte mit in LabVIEW 2018 SP 1 (National Instruments, Austin, USA) selbst erstellten Programmen und Fityk^[128], für die Auswertung von Reflektometrie-Daten (sowohl NR als auch XRR) wurde das von Andrew Nelson in Python entwickelte RefNx verwendet.^[27] Die Auswertung off-spekularer NR-Messungen erfolgte mit einem von der Arbeitsgruppe Tanaka (Universität Heidelberg, Deutschland) entwickelten Programm in Igor

Pro 8.02 (WaveMetrics Inc., Portland, Oregon, USA). Aufnahmen mit Rasterelektronenmikroskopie wurden mithilfe von ImageJ analysiert.^[129] Die Planung der experimentellen Aufbauten, sowie das Erstellen sonstiger in der vorliegenden Arbeit präsentierte Abbildungen erfolgte in PowerPoint 2019 (Microsoft, Redmond, USA).

3.3. Chemische Synthese

3.3.1. Synthese von MACl

Die Synthese von *N,N,N*-trimethyl-(11-mercaptoundecyl)ammoniumchlorid (**3**, MACl) erfolgte in zwei Stufen nach der Vorschrift von Tien *et al.*^[130] Die zugehörigen Reaktionsgleichungen sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

Zunächst wurde *N,N,N*-trimethyl-10-undecen-1-ammoniumbromid (**2**) synthetisiert. 11-Bromundecenyl (**1**, 2,13 g, 52 mmol) wurde unter Rühren zu einer Lösung von Trimethylamin in Ethanol (50 ml, 4,2 mmol/l) gegeben. Die Reaktionslösung wurde zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, in Dichlormethan (DCM, 30 ml) gelöst und mit Toluol (500 ml) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Nach Abfiltrieren und Trocknen unter Normalbedingungen wurde **2** als farbloser Feststoff (8,79 g, 55%) erhalten. Die verglichen mit der Vorschrift geringe Ausbeute ist auf Verluste beim Umkristallisieren und Filtrieren zurückzuführen.

Anschließend erfolgte der Umsatz von **2** zu **3**. Es wurde **2** (2,92 g, 9,53 mmol) in DCM (20 ml) vorgelegt und unter Rühren Thioessigsäure (2 ml, 28,1 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 6 h mit einer Halogenlampe (500 W) beleuchtet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Feststoff mit Diethylether gewaschen. Dieser wurde anschließend mit verdünnter Salzsäure (20 ml, 10%) versetzt und 1 h unter Rückfluss gekocht. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene hellgelbe Feststoff wurde mit kaltem Isopropanol gewaschen und anschließend erneut im Vakuum getrocknet. **3** wurde als farbloser Feststoff erhalten (1,94 g, 72 %). Verluste kamen hauptsächlich durch das Waschen zustande.

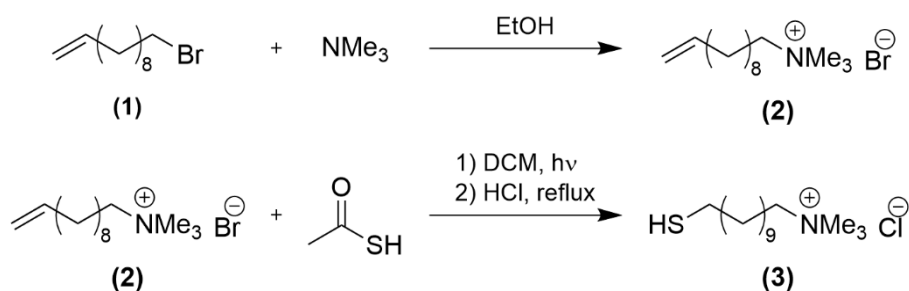


Abbildung 3.1: Synthese von MACl (**3**) nach Tien *et al.*^[130]

3.3.2. Synthese kationischer Gold-Nanopartikel

Die Synthese von AuNPs erfolgte in zwei Schritten. Zuerst sollten hydrophobe Partikel mit einem Durchmesser von 2 nm beziehungsweise 5 nm synthetisiert werden. Hierfür wurde die von Brust *et al.* beschriebene Vorschrift verwendet und die Partikelgröße anhand der von Hostetler *et al.* publizierten Daten eingestellt.^[122-123] Zu diesem Zwecke wurde das Verhältnis von Tetrachlorgoldsäure zu

3. Experimentaltteil

Alkanthiol angepasst, während die übrigen Reaktionsbedingungen gleich gehalten wurden. Für Partikel mit einem Durchmesser von 2 nm wurden beide Komponenten in gleichen Mengen verwendet, für solche mit einem Durchmesser von 5 nm wurde die Stoffmenge des Thiols gegenüber der Säure geviertelt. In einer beispielhaften Reaktion wurde Tetraoctylammoniumbromid (341,74 mg, 0,625 mmol) in Toluol (20 ml) gelöst und unter Rühren Tetrachlorgoldsäure-Trihydrat (98,46 mg, 0,25 mmol) in vollentsalztem Wasser (6 ml) zugegeben. Nach vollständiger Entfärbung der wässrigen Phase wurde diese abgetrennt und Octadecanthiol (71,64 mg, 0,25 mmol) zur organischen Phase gegeben. Es wurde verglichen mit der Literatur ein Thiol mit größerer Kettenlänge verwendet, um die Handhabung und Stabilität der erhaltenen Partikel zu verbessern. Die Reaktionslösung wurde 10 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend Natriumborhydrid (94,58 mg, 2,5 mmol) in vollentsalztem Wasser (25 ml) innerhalb von 10 s zugegeben. Die Lösung wurde 3,5 h gerührt. Anschließend wurde die wässrige Phase entfernt und die organische Phase unter vermindertem Druck auf wenige Milliliter eingengt. Ethanol (100 ml) wurde hinzugegeben und der Kolben 5 min in ein Ultraschallbad gebracht, um eine gleichmäßige Suspension zu erhalten. Diese wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, bis sich der Feststoff vollständig am Kolbenboden abgesetzt hatte. Dieser wurde zentrifugiert, anschließend mit Ethanol und Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet. Hydrophobe AuNP (105,92 mg) wurden als schwarzer Feststoff erhalten.

Um kationische AuNP herzustellen, wurden die Alkanthiole gegen den nach Abschnitt 3.3.1 synthetisierten Liganden **3** ausgetauscht.^[131] Hierzu wurden in einem beispielhaften Ansatz die AuNP (75 mg) in Tetrahydrofuran (THF, 10 ml) gelöst, **3** (75 mg) hinzugegeben und die Reaktionslösung drei Tage bei Raumtemperatur gerührt bis der Feststoff vollständig ausgefallen war. Dieser wurde zentrifugiert, mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Kationische AuNP wurden als schwarzer bis dunkelbrauner Feststoff (92 mg) erhalten.

3.4. Probenpräparation

Vorbereitend zur Beschichtung der verwendeten Substrate wurden unterschiedliche Reinigungsprotokolle verwendet, die im Folgenden beschrieben werden. Dabei unterscheidet sich das verwendete Reinigungsprotokoll je nach vorgesehener Anwendung der präparierten Proben.

Für SE, Rasterelektronen-Mikroskopie (REM) und XRR wurden Bor-dotierte (100)-Silizium (Si) Wafer (Siegert-Wafer GmbH, Aachen, Deutschland) mit 50,8 mm Durchmesser und 500 μm Dicke verwendet (nachfolgend auch 2"-Wafer genannt). Je nach Bedarf wurden sie vor der Reinigung oder nach der Beschichtung in passende Stücke gebrochen. Es wurde für diese Substrate fast ausschließlich das vereinfachte Reinigungsprotokoll, welches in Abschnitt 3.4.1 beschrieben ist, verwendet. Einzig für die Präparation selbstorganisierter Monoschichten (self-assembled monolayers, SAM) wurde die nachfolgende Methode auch für diese Substrate verwendet.

Für Experimente, welche ausschließlich mit NR stattfanden, wurden einseitig polierte, runde Si-Kristalle mit einem Durchmesser von 60 mm und einer Dicke von etwa 10 mm verwendet (Crytec, Berlin, Deutschland). Diese Messungen fanden am Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB) statt. Für diese Substrate waren Dotierung und Orientierung nicht bekannt. Für Experimente, in denen zusätzlich ATR-FTIR-Spektroskopie zum Einsatz kam, mussten beidseitig polierte Si-Kristalle mit 10 mm Dicke

verwendet werden, welche zusätzlich an gegenüberliegenden Seiten um 45° abgeschrägt waren (nachfolgend auch ATR-Kristalle genannt). Auch diese Flächen waren poliert. Diese Geometrie ermöglicht insgesamt fünf Reflexionen des IR-Strahls im Kristall (siehe Abbildung 3.6 A). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits vorhandene Substrate waren Bor-dotiert, wohingegen für spätere Experimente Phosphor-dotierte Kristalle eingekauft wurden (Siliciumbearbeitung Andrea Holm, Tann, Deutschland). Aufgrund des deutlich höheren Preises der für NR-Experimente genutzten Substrate wurden diese mehrfach verwendet. In vielen Fällen war auch hier das einfachere Reinigungsprotokoll ausreichend, blieben beim Spülen mit Chloroform jedoch noch Rückstände auf der beschichteten Fläche zurück, so wurde das RCA-Reinigungsprotokoll verwendet (entwickelt im Auftrag der Radio Corporation of America). Auch dieses ist in Abschnitt 3.4.1 beschrieben.

Für die in Kapitel 9 beschriebene Untersuchung von Lipid-Multilagen mit offspekularer NR wurden große Si-Wafer (Siegert Wafer, Aachen, Deutschland; Ø (100 ± 0,5) mm, Dicke (650 ± 25) µm, p-dotiert) verwendet. Diese wurden nach dem in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen vereinfachten Reinigungsprotokoll gereinigt. Die Probenpräparation erfolgte daraufhin durch Eintrocknen einer nach Abschnitt 3.4.3 hergestellten Vesikellösung im Trockenschrank bei 70 °C.

3.4.1. Reinigungsprotokolle

Die Reinigung der für die vorliegende Arbeit verwendeten Substrate erfolgte je nach Verschmutzungsgrad anhand zweier Protokolle. Unbenutzte oder nur leicht verschmutzte Substrate wurden dreimal mit Chloroform abgespült und im Stickstoff-Strom getrocknet. Anschließend wurden sie für mindestens eine Stunde in einem Ethanolbad gelagert, mit Ethanol abgespült und erneut im Stickstoffstrom getrocknet. Dieser Prozess wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit als vereinfachtes Reinigungsprotokoll bezeichnet.

Zeigten die Substratoberflächen Verschmutzungen, die mit dem beschriebenen Verfahren nicht entfernt werden konnten, wurden sie dem RCA-Verfahren unterzogen. Bei diesem werden die Substrate für 10 min in einer verdünnten Lösung von Ammoniak (25%) und Wasserstoffperoxid (30%) in Wasser (Verhältnis 1:1:5) bei 60 °C bis 70 °C gelagert. Das Substrat wurde anschließend entnommen, mit vollentsalztem Wasser abgespült und weitere 10 min in einer verdünnten Lösung von Salzsäure (37%) und Wasserstoffperoxid (30%) in Wasser (Verhältnis 1:1:5) bei 60 °C bis 70 °C gelagert. Nach Entnahme und Abspülen mit vollentsalztem Wasser und Ethanol wurde das Substrat mit Stickstoff getrocknet und bis zur weiteren Verwendung unter Stickstoff gelagert.

3.4.2. Präparation von Lipid-Oligobilagen mit Rotationsbeschichtung

Die Präparation von Lipid-Oligobilagen erfolgte nach der Methode der Rotationsbeschichtung. Hierbei werden Si-Substrate zunächst mit einer Lösung der Lipide, üblicherweise in einem Lösungsmittel mit hohem Dampfdruck, bedeckt. Das Substrat wird anschließend mit hoher Drehzahl rotiert, wobei es mithilfe eines angelegten Vakuums auf dem Probenteller fixiert ist. Dabei wird überschüssige Lösung von der zu beschichtenden Oberfläche geschleudert. Das verbleibende Lösungsmittel verdampft schnell und hinterlässt einen dünnen ebenmäßigen Film des Lipids auf der Substratoberfläche. Dieser Prozess

3. Experimententeil

ist in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt. Die Dicke des Filmes kann dabei sowohl über die Konzentration der verwendeten Lösung als auch über die gewählte Drehgeschwindigkeit angepasst werden. Auf diese Weise lassen sich Proben von Lipid-Oligobilagen mit guter Reproduzierbarkeit herstellen, jedoch ist auch die Präparation von anderen Materialien, wie zum Beispiel Polymeren in der Fachliteratur dokumentiert.^[88, 132]

Die Präparation der für die vorliegende Arbeit verwendeten Lipid-Oligobilagen erfolgte auf Grundlage der von Mennicke *et al.* beschriebenen Methode.^[88] Um die gewählten Substrate zu beschichten, wurden sie zunächst nach den in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen Reinigungsprotokollen gesäubert. Anschließend erfolgte am Spin-Coater eine weitere Reinigung, indem die Oberfläche dreimal mit Chloroform bedeckt und mit dem gewählten Programm rotiert wurde. Für die verschiedenen Substrate standen zwei Geräte zur Verfügung: Dünne Si-Wafer wurden an einem kommerziell erhältlichen Spin-Coater (Spincoat G3D-8, Specialty Coating Systems, Indianapolis, USA) beschichtet. Dieser war so programmiert, dass die Probe zunächst für eine Sekunde bei 500 rpm rotiert wurde und anschließend weitere 39 s bei 4000 rpm. Die Beschleunigung der einzelnen Schritte war hierbei maximal eingestellt, womit die angestrebte Drehzahl in etwa einer Sekunde erreicht wird. Für dickere Substrate, welche bei ATR-FTIR- und NR-Messungen zum Einsatz kamen, wurde ein Spin-Coater (708D, Specialty Coating Systems, Indianapolis, USA) verwendet. In diesem erfolgte eine direkte Beschleunigung auf 4000 rpm. Diese Drehzahl wurde nach ~ 1 s erreicht und für 45 s gehalten.

Bei der beschriebenen Beschichtung von Substraten mit Lipid-Lösungen in Chloroform verbleiben Rückstände des Lösungsmittels in der Probe. Diese führen zu einer Destabilisierung bei der Benetzung dieser mit Wasser, was sich häufig durch ein Ablösen der Probe äußerte. Um die Stabilität zu verbessern, wurden die Proben daher vor der Verwendung getrocknet. Wenn nicht anders vermerkt fand die

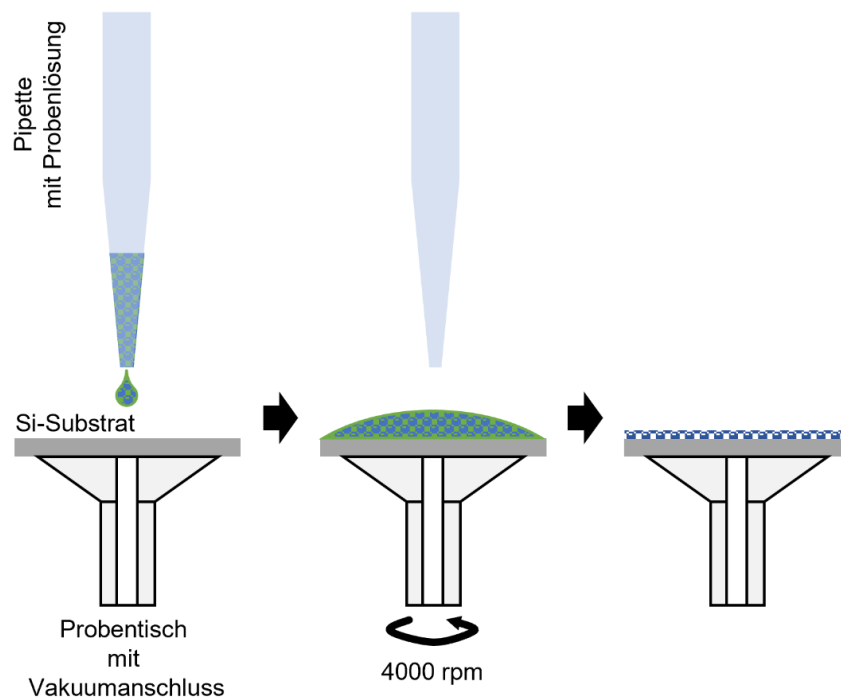


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Rotationsbeschichtung von Si-Substraten mit Lipid-Oligobilagen nach Mennicke *et al.*^[88]

Trocknung durch Lagerung des beschichteten Substrats unter vermindertem Druck über Nacht statt. Hierfür wurde ein Vakuumtrockenschrank (VD 23, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) aus dem Inventar der Arbeitsgruppe Tanaka verwendet. Vereinzelt fand auch eine Trocknung durch Erhitzen der Probe statt. Hierzu wurden diese für 30 min bei 60 °C in einem Trockenschrank (Kendro T12, Heraeus, Hanau, Deutschland) gelagert. Vor der Verwendung für Messungen wurden diese Probe mindestens eine Stunde abkühlen gelassen.

Beide Trocknungsmethoden führten zu einer Entfernung des verbleibenden Lösungsmittels und somit zu einer Stabilisierung der Probe für Untersuchung im wässrigen Milieu, änderten jedoch auch ihre Topografie. Dies wurde in Arbeiten von B.Sc. Lucca Neupert unter der Anleitung von Andreas Stöcklin (Arbeitsgruppe Dahint, Universität Heidelberg) mithilfe von Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen.^[133] Proben vor der Trocknung zeigten hier eine raue Oberfläche mit einer Vielzahl an Löchern und Hügeln. Beim Trocknen im Vakuum kam es zu einem lateralen Zusammenwachsen der Löcher. Es konnten Stufen in der Oberfläche beobachtet werden, welche abgesehen von der natürlichen Welligkeit der Probe mit ganzzahligen Vielfachen der in der Literatur beschriebenen Bilagendicke der verwendeten Lipide übereinstimmten.^[34, 81] Hierbei wurden Höhenunterschiede von mehreren Bilagen festgestellt. Auch die Trocknung durch Hitzeeinwirkung führte zu einer Veränderung der Probenoberfläche, wobei hier jedoch neben dem lateralen Zusammenwachsen der Löcher auch ein Ausheilen der Probe orthogonal zur Oberfläche beobachtet wurde. Die beobachteten Stufen waren so nur noch in der Größe einzelner Bilagen und tiefere Löcher wurden nicht mehr beobachtet. Eine Modellvorstellung der Veränderung der Probenstruktur durch den Trocknungsprozess ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die beobachteten Einflüsse auf die Eigenschaften der so erhaltenen Proben werden in Abschnitt 5.2 thematisiert.

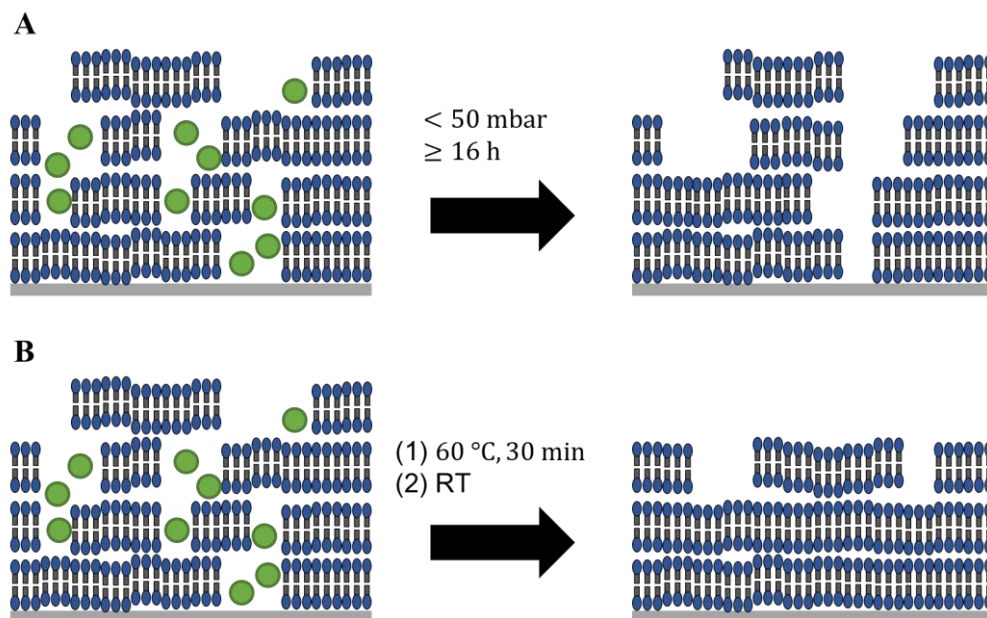


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Strukturänderung von Lipid-Oligobilagen durch Trocknung. Die Rückstände des Lösungsmittels (grüne Kreise) können durch verminderten Druck (A) oder Hitzeeinwirkung (B) entfernt werden. Vakuumtrocknung führt zu einem lateralen Zusammenwachsen der Löcher in den Bilagen, wobei die Probendicke erhalten bleibt. Bei der Hitzetrocknung erfolgt zusätzlich ein Ausheilen der inneren Bilagen durch Moleküle der äußeren Lagen.

3.4.3. Präparation von Lipidvesikeln

Zur Präparation von Lipid-Bilagen mit Vesikelfusion wurden kleine unilamellare Vesikel (small unilamellar vesicles, SUV) hergestellt. Hierzu wurde die gewünschte Lipidmischung in kleine Fläschchen abgewogen und mit wenig Chloroform gelöst. Die eingewogene Masse wurde so gewählt, dass die Konzentration bei der späteren Beschallung 5 mg/ml betrug. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom verdampft und Rückstände anschließend durch nächtliche Lagerung im Vakuumschrank entfernt. Die gewünschte Pufferlösung wurde hinzugegeben und die Lipide mithilfe einer Ultraschall-Sonde (Sonicator 3000, Misonix, Farmingdale, USA) in Lösung beschallt. Nach 10 – 30 min wurde eine transparente, leicht opake Lösung erhalten. Diese wurde zentrifugiert um Titanoxid, welches sich während der Beschallung von der Sonde löst, auszufällen. Der Überstand wurde anschließend auf die für die weitere Verwendung gewünschte Konzentration verdünnt.

Vesikel aus DMPC waren bei Lagerung bei Raumtemperatur etwa zwei Tage verwendbar, bis eine deutliche Agglomeration der Lipide beobachtet wurde. Die Zugabe von Gramicidin zu den Lipiden verlängerte diesen Zeitraum auf mehrere Monate, wobei nach etwa einem Monat eine Verfärbung der Flüssigkeit zu sehen war. Vesikel mit Chol-Anteil konnten aufgrund ihrer geringen Stabilität auf diese Weise nicht präpariert werden. Nach dem Zentrifugieren war bereits eine starke Agglomeration zu erkennen.

3.4.4. Probenpräparation durch Tropfenguss

Die Charakterisierung von NPs fand mittel REM statt. Hierfür wurden die Partikel als Tropfenguss auf Bruchstücke von Si-Wafer abgeschieden. Diese wurden zuvor aus einem 2"-Wafer gebrochen und analog zu Abschnitt 3.4.1 mit Chloroform und Ethanol gereinigt. Anschließend wurden die Bruchstücke mit einer Lösung der NPs in vollentsalztem Wasser oder, im Falle von wasserunlöslichen Partikeln, in THF vollständig bedeckt. Die Bruchstücke wurden unter einem Becherglas bei Raumtemperatur gelagert, bis das Dispersionsmedium vollständig verdampft war.

3.4.5. Präparation von selbstorganisierten Monoschichten auf Silizium-Substraten

Zur Untersuchung von auf Oberflächen adsorbierten Proteinen wurden Si-Substrate mit SAMs von Octadecyltrichlorsilan präpariert. Hierzu wurde eine literaturbekannte Methode verwendet, die für die vorliegende Arbeit leicht abgewandelt wurde.^[134-135]

Die Substrate wurden zunächst mit der in Abschnitt 3.4.1 genannten RCA-Methode gereinigt. Die für die Untersuchungen relevante Oberfläche wurde direkt nach Trocknung im Stickstoffstrom für 2,5 h einer Lösung von 3 mM Octadecyltrichlorsilan in Hexan ausgesetzt. Bei Verwendung eines 2"-Wafers wurde dieser für die genannte Zeit vollständig in einer gläsernen Petrischale unter der genannten Flüssigkeit gelagert. Da bei Verwendung von ATR-Kristallen die Beschichtung der Rückseite, sowie der angeschrägten Seiten des Substrats vermieden werden musste, wurde in Zusammenarbeit mit der feinmechanischen Werkstatt des PCI Heidelberg eine Konstruktion entwickelt, welche den zu beschichtenden Teil der Substrat-Oberfläche so vom Rest abtrennte, dass die Flüssigkeit diesen nicht

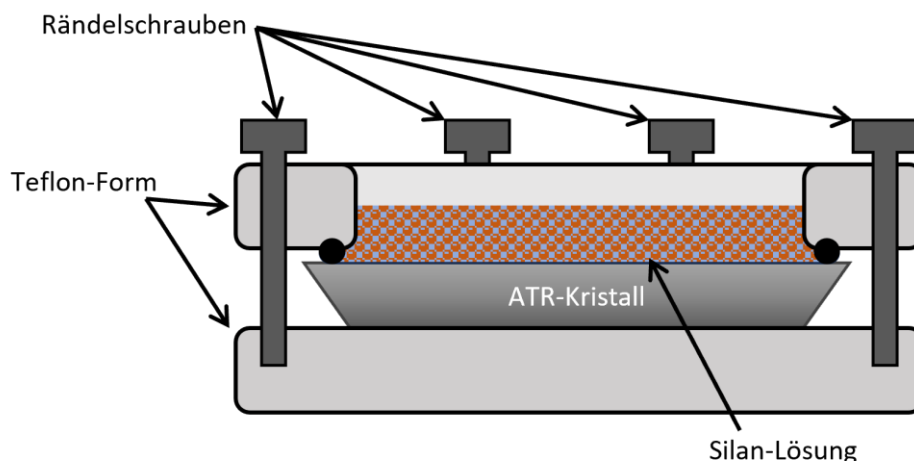


Abbildung 3.4: Querschnitt der zur SAM-Beschichtung von ATR-Kristallen verwendeten Konstruktion. Die beiden Hälften der Teflon-Form werden durch sechs Rändelschrauben (zwei vor der Querschnittsebene nicht dargestellt) zusammengepresst, sodass ein nach oben geöffneter Hohlraum über der zu beschichteten Seite des Kristalls entsteht, in den die Silan-Lösung eingefüllt wird. Durch die Abdichtung über O-Ringe (schwarze Kreise) wird die ungewollte Beschichtung der anderen Kristall-Flächen vermieden.

benetzen konnte. Hierfür wurde ein O-Ring aus einem chemisch beständigen Material verwendet, auf welchen ein Teflon-Zylinder gepresst wurde (siehe Abbildung 3.4). Nach Ablauf der Zeit wurde die Lösung entfernt, das Substrat mit Ethanol abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurde es unter Stickstoff gelagert.

Ein so präpariertes Substrat wurde für weitere Experimente mit dem vereinfachten Reinigungsprotokoll, welches in Abschnitt 3.4.1 beschrieben ist gesäubert, um die präparierte SAM nicht zu beschädigen.

3.5. Reflektometrie

Für die vorliegende Arbeit wurden Reflektometrie-Messungen sowohl mit NR als auch XRR durchgeführt.

Für XRR wurde das Röntgenreflektometer D8 Discover (Bruker, Billerica, USA) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT, Deutschland) verwendet. Der Probenstisch war mit einem am Physikalisch-Chemischen Institut Heidelberg (PCI, Deutschland) entwickelten luftgekühlten Peltier-Element ausgestattet, welches eine exakte Temperierung der Proben während der Messungen ermöglichte (siehe Abbildung 3.5). Zur Erzeugung der Röntgenstrahlung wurde eine Molybdän-Anode verwendet. Die K_{α} -Linie dieses Materials liefert eine charakteristische Röntgenstrahlung von $0,7107 \text{ \AA}$.^[136] Bei der Messung wurden Winkel der Röntgenquelle und des Detektors zur Probenoberfläche variiert, so dass diese in $\theta/2\theta$ -Geometrie stattfand (siehe Abschnitt 2.1.1). Durch die Messung wurden zunächst die Intensitäten der Röntgenstrahlung in Abhängigkeit des Einfallswinkels erhalten. Anhand der so gemessenen Intensitäten der Röntgenstrahlung wurde die Reflektivität in Abhängigkeit des Streuvektors mit einem von Andreas Stöcklin entwickelten Skript in OriginPro berechnet.

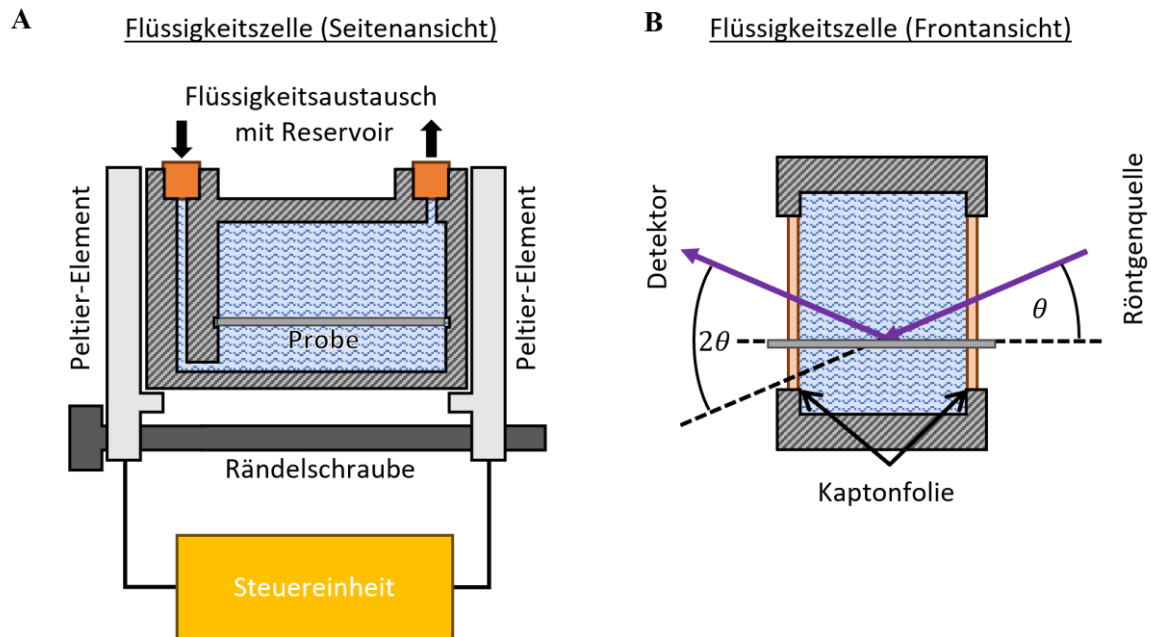


Abbildung 3.5: Flüssigkeitszelle und Geometrie des für temperaturkontrollierte Messungen verwendeten XRR-Aufbaus. **A** Seitlicher Querschnitt mit Peltier-Elementen (Kühler nicht eingezeichnet). Flüssigkeitsaustausch mit einem externen Reservoir erfolgte über einer Peristaltikpumpe. Die Flüssigkeitszelle wurde über eine Rändelschraube zwischen den Peltier-Elementen fixiert. **B** Frontaler Querschnitt mit Geometrie der Röntgenstrahlung. Durch Verfahren der Winkel von Röntgenquelle und Detektor zur Probenoberfläche findet die Messung in $\theta/2\theta$ -Geometrie statt.

Experimente mit NR wurden an verschiedenen Instituten und Instrumenten durchgeführt. Neutronenreflektometrie ohne simultane komplementäre Techniken wurde am Instrument V6 am Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB, Deutschland) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein monochromatisches Neutronenreflektometer mit horizontaler Probengeometrie und einer Neutronenwellenlänge von $4,66 \text{ \AA}$.^[137] Auch hier erfolgte die Datenprozessierung mit einem Skript von Andreas Stöcklin, welches auf Grundlage eines am HZB verwendeten Skriptes entwickelt wurde. Experimente, bei denen simultan ATR-FTIR-Spektroskopie und zum Teil SE zum Einsatz kamen, wurden mit den für die vorliegende Arbeit entwickelten Messaufbauten (siehe Kapitel 4) an den Instrumenten FIGARO und D17 des Institut Laue-Langevin (ILL, Grenoble, Frankreich) durchgeführt. Bei beiden handelt es sich um time-of-flight-Neutronenreflektometer, wobei FIGARO für horizontale und D17 für vertikale Probengeometrien ausgelegt ist. Beide bieten einen Wellenlängenbereich von $2 - 30 \text{ \AA}$ an. Danach können an FIGARO Streuvektoren im Bereich von $0,0045 - 0,42 \text{ \AA}^{-1}$ und an D17 $0,002 - 2 \text{ \AA}^{-1}$ gemessen werden.^[26, 138] Zusätzlich wurden Experimente mit dem für D17 konstruierten Messaufbau am Neutronenreflektometer SuperADAM des ILL durchgeführt, welches wie D17 über eine vertikale Probengeometrie verfügt. Hierbei handelt es sich um ein monochromatisches Reflektometer mit einer Neutronenwellenlänge von $5,21 \text{ \AA}$.^[139]

Tabelle 3.2: Parameter der verwendeten Verbindungen zur Modellierung von Reflektometrie-Profilen.

Verbindung	$V_M [\text{\AA}^3]$	$b [10^{-4} \text{\AA}]^{[32]}$	$\rho_{NR} [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]^{[140]}$	$\rho_{XRR} [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]^{[140]}$
DMPC-Kopfgruppe	331 ^[34]	6,01	1,82	13,98
DMPC-Kettengruppe	712 ^[34]	-2,92	-0,41	8,32
Cholesterol	628 ^[141]	1,32	0,21	9,70
H ₂ O	30,0 ^[142]	-0,17	-0,56	9,43
D ₂ O	30,0 ^[142]	1,92	6,38	9,39
Si	20,0 ^[142]	0,41	2,07	19,8
SiO ₂	47 ^[142]	1,58	3,47	18,1
Au ⁰	10,3 ^[143]	0,76	7,61	128
Gramicidin			2,42 ^[144-145]	12,3 ^[144-145]
Zytochrom C			1,80 ^[101, 144]	12,5 ^[101, 144]

Die Auswertung aller Messungen mit spekularer Reflektometrie erfolgte mit dem in Abschnitt 3.2 erwähnten Programm RefNx. Hierfür wurden aufgrund von Vorkenntnissen Modelle des Probenaufbaus erstellt. Diese werden an den entsprechenden Stellen in der vorliegenden Arbeit genauer erläutert. Literaturbekannte Streulängen und SLDs sind in Tabelle 3.2 angegeben. Typische Parameter der angepassten Modelle sind in Tabelle 3.3 aufgetragen.

In zusätzlichen Experimenten wurde die Steifigkeit hydratisierter Lipid-Multilagen in Gegenwart von Polyelektrolyten und HS mit Neutronenstreuung untersucht. Diese Experimente fanden am D16-Diffraktometer des ILL statt, welches mit Neutronenwellenlängen von 4,7 Å und 5,6 Å genutzt werden konnte.

Tabelle 3.3: Übersicht der bei Modellierung der Reflexions-Profile verwendeten Größen.

Parameter	Bedeutung
d_i	Dicke der Schicht (zum Beispiel Kopfgruppen, Kettengruppen, Bilage)
ρ_i	Reale Streulängendichte (SLD) der Lage i
$i\rho_i$	Imaginäre Streulängendichte (iSLD) der Lage i
σ_i	Rauigkeit der Lage i
$\phi_{w,i}$	Wasseranteil der Lage i
N	Anzahl der Bilagen der Probe
χ^2	Güte der Übereinstimmung von
$S_{w2,i}$	Quellfaktor durch Änderung der Dicken der inneren Wasserzwichenschichten d_{w2} der Probenbedingung i im Vergleich zur Charakterisierung unter D ₂ O
$\Delta Q/Q$	Relativer Fehler des Streuvektors, Auflösung der Messung in Q

3.6. Ellipsometrie

Die Probencharakterisierung mit Ellipsometrie erfolgte mithilfe zweier Geräte. In heimischen Laboren wurde das spektrale Ellipsometer M44 (J. A. Woollam, Lincoln, USA) verwendet. Dieses war mit einer 50 W Xenon-Kurzbogenlampe (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) ausgestattet. Es wurde so Licht im Bereich von 450 – 800 nm erzeugt, welches einen Polarisator passiert und an der Probenoberfläche in einem Winkel von 75° zur Oberflächennormale reflektiert wurde. Durch Interferenz an der Oberfläche entstand so elliptisch polarisiertes Licht, dessen ellipsometrische Winkel Δ und Ψ bei 44 Wellenlängen über einen Analysator bestimmt wurden (siehe Abschnitt 2.2). Die Bedienung des Ellipsometers erfolgte mithilfe des Programms WVASE32 (J. A. Woollam).

Vor den Probenmessungen erfolgte eine Kalibration des Geräts über einen Referenzwafer mit bekannter Siliziumoxid-Schichtdicke. Um anhand der ellipsometrischen Winkel die Schichtdicke der Probe zu bestimmen, mussten deren Brechungsindizes anhand eines geeigneten Modells angepasst werden. Hierzu wurden die Brechungsindizes des Substrats und eventueller Flüssigphase über im Programm vorhandene Modelle beschrieben. Die optischen Eigenschaften der Probe selbst wurden über ein Cauchy-Dispersions-Modell simuliert (siehe Gleichung (2.22)). Der Anpassungsalgorithmus des Programms verglich die so berechneten ellipsometrischen Winkel mit denen der Messung und minimierte die Abweichungen durch Variation der Cauchy-Parameter und der Probendicke d .

In den in den Abschnitten 4.4 und 4.5 beschriebenen kombinierten Aufbauten war das spektrale Ellipsometer iSE (J. A. Woollam) installiert, mit welchem Messungen simultan zu NR und ATR-FTIR möglich waren. Die genaue Beschreibung des Geräts findet sich in Abschnitt 4.4. Die Datenauswertung erfolgte analog zu den Messungen am Ellipsometer M-44.

3.7. ATR-Infrarotspektroskopie

Für die vorliegende Arbeit wurden Messungen mit IR-Spektroskopie mit einem Thermofisher Nicolet iG50 (Dreieich, Deutschland) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein modulares IR-Spektrometer, bei dem der MCT-Detektor in einem separaten Gehäuse eingebaut war, was eine auf die geplante Anwendung angepasste Führung des IR-Strahls ermöglichte. Eine genaue Beschreibung des Geräts und der Strahlführung ist in Kapitel 4 zu finden. Alle beschriebenen Messungen wurden in ATR-Konfiguration durchgeführt. Hierzu wurde der IR-Strahl auf ein entsprechendes Prisma aus Si geleitet, in welchem er insgesamt fünfmal totalreflektiert wurde und wieder aus dem Kristall in die Strahlführung austrat. Dieser Prozess ist in Abbildung 3.6 A dargestellt. Si ist aufgrund seiner geringen Absorption oberhalb von 1500 cm^{-1} sehr gut für Untersuchungen von Biomolekülen und Polymeren geeignet. Viele funktionelle Gruppen dieser Substanzen finden sich in diesen Bereichen, wie zum Beispiel C – H-Streckschwingungen von Methylen- und Methylgruppen bei $\tilde{\nu} = (3100\sim 2800) \text{ cm}^{-1}$, die $\text{N} \equiv \text{C}$ -Streckschwingung von Nitrilen bei $\tilde{\nu} = (2260\sim 2230) \text{ cm}^{-1}$ oder die C = O-Streckschwingung von Amiden bei $\tilde{\nu} = (1700\sim 1610) \text{ cm}^{-1}$.^[57, 146-147] Die geringe Absorption von Si in diesem Spektralbereich ist in Abbildung 3.6 B zu sehen. Typische Absorptionsbanden des Prismas sind bei 1299 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} , 1444 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} zu finden, unterhalb von 1130 cm^{-1} zeigt das Material größtenteils Totalabsorption. Somit besteht wenig bis kein Überlapp der Absorptionsbanden des Prismas und der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen. Ein Teil des Fingerprint-

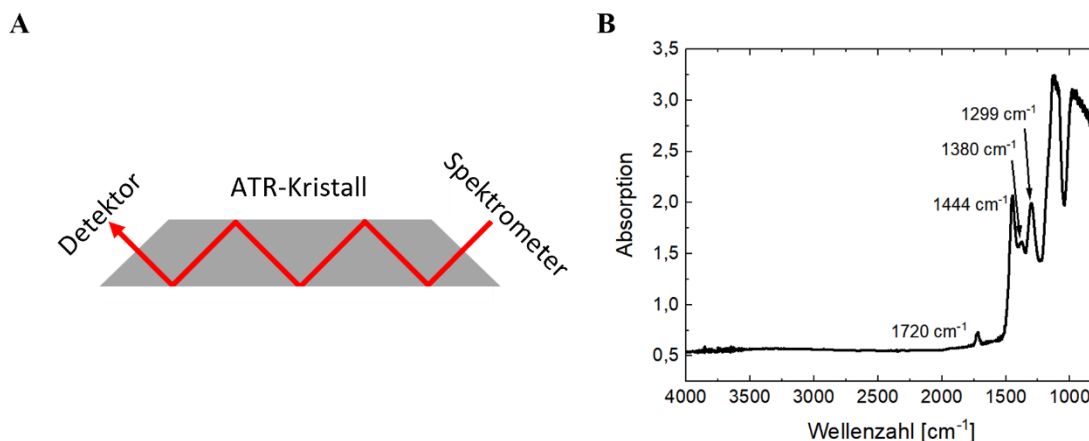


Abbildung 3.6: *A* Reflexionen des IR-Strahls innerhalb der verwendeten Si-Kristalle. *B* Absorptionsspektrum eines Si-Kristalls in ATR-Konfiguration. Ein Hintergrundspektrum wurde mittels direktem Durchschuss des IR-Strahles ohne Interaktion mit einem Substrat verwendet. Hierfür wurde der in Abschnitt 4.2 beschriebene Aufbau so eingestellt, dass alle Reflexionen in einer Ebene stattfanden.

Bereichs von $\tilde{\nu} = (1500 \sim 1130) \text{ cm}^{-1}$ ist auch zugänglich, jedoch muss hier besondere Vorsicht gewahrt werden, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Absorptionsbanden des Kristalls zu vermeiden, deren Intensität sich durch Änderungen der Weglänge des IR-Strahls im Kristall ändern kann. Dies ist durch Schwankungen im Einfallswinkel des Strahls oder durch thermische Ausdehnung des Kristalls möglich. Andere Materialien wie Zinkselenid zeigen noch bessere IR-Transmission, jedoch sind sie aufgrund bedeutend schlechterer Neutronen-Transmission weniger für NR-Messungen geeignet.^[140] Si stellt somit einen guten Kompromiss hinsichtlich der Eignung für beide Techniken dar.

Im Gegensatz zu Transmissions-Experimenten ist ein einfacher Zusammenhang der auf dem Substrat gebundenen Probenmenge über das Lambert-Beer'sche Gesetz nicht möglich. Grund hierfür ist der exponentielle Abfall der elektrischen Feldstärke im angrenzenden, optisch dünneren Medium bei Totalreflexion. Die nachfolgenden Abschnitte zeigen dagegen die Möglichkeit, dessen Verhalten zu simulieren, um so quantitative Aussagen anhand von ATR-Experimenten tätigen zu können.

3.7.1. Simulation von Absorptionsbanden in ATR-FTIR

In IR-Transmission-Messungen kann die Intensität A der gemessenen Absorptionsbanden über das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben werden (siehe Gleichung (2.23)). Die Absorption ist dabei linear von der Konzentration c des absorbierenden Stoffs in der Probe und der Probendicke d abhängig. Da jedoch in ATR-FTIR-Messungen die Interaktion der Absorbanden mit einem evaneszenten Feld stattfindet, dessen Intensität abhängig von der Entfernung z zur Grenzfläche ist, ist diese simple Abhängigkeit nicht mehr gegeben. Insbesondere da es sich bei den für die vorliegende Arbeit untersuchten Lipid-Oligobilagen nicht um homogen in Lösung befindliche Moleküle handelt, ergibt sich ein komplexer Zusammenhang zwischen der Probenbeschaffenheit, wie Lagenabstand und -dicke, und der gemessenen Absorption. Für ein tiefes Verständnis der gemessenen IR-Spektren sind deshalb Vorkenntnisse über den Probenaufbau von Nöten, mit welchen eine theoretische Absorption der Probe berechnet werden kann. Diese kann dann mit reell gemessenen Werten verglichen werden, um eine Interpretation der beobachteten Änderungen zu ermöglichen. Hierzu wurden bereits in vorherigen

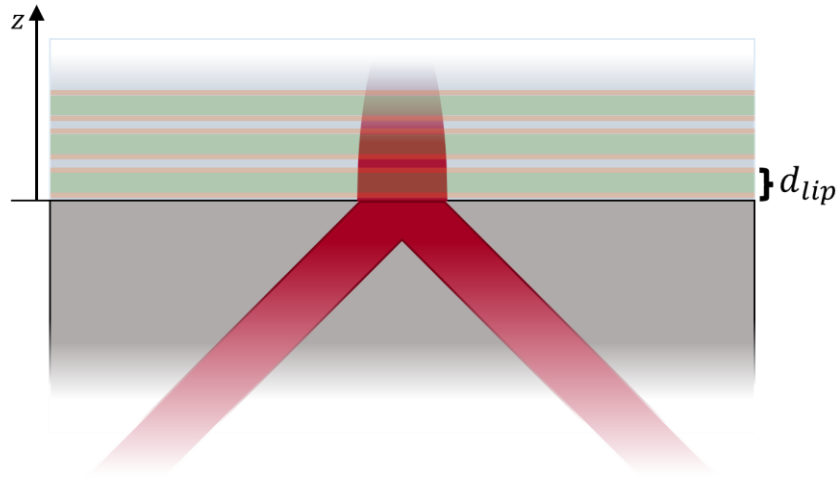


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der ATR-FTIR-Messung an einer mit Lipid-Oligobilagen der Dicke d_{lip} beschichteten Oberfläche. Die Absorption durch die Probe findet mit einem bei der Reflexion an der Grenzfläche entstehenden evaneszenten Feld statt (rote Ellipse), welches in Abhängigkeit des Abstands z zu dieser exponentiell abfällt. Die äußeren Lipid-Bilagen tragen demnach bedeutend weniger zur gesamten Absorption der Probe bei als die inneren.

Arbeiten in der Arbeitsgruppe Dahint Bandenintensitäten von Lipiden simuliert. Die Vorgehensweise wurde für die vorliegende Arbeit abgewandelt und wird nachfolgend hergeleitet.^[14] Die Interaktion des evaneszenten Feldes mit Lipid-Oligobilagen auf einem geeigneten Substrat ist in Abbildung 3.7 schematisch dargestellt.

Die Intensität des evaneszenten Feldes in Abhängigkeit des Abstands zur Grenzfläche $I(z)$ ist gegeben durch

$$I(z) = E_0^2 \cdot e^{-2\frac{z}{d_p}} \quad (3.1)$$

Hierbei beschreibt E_0 die elektrische Feldstärke an der Grenzfläche. Die Eindringtiefe d_p ist definiert als die Distanz zur Grenzfläche, an der die elektrische Feldstärke auf einen Wert von $E_{d_p} = E_0/e$ abgesunken ist. Sie ist abhängig von der Vakuumwellenlänge λ_0 , dem Einfallswinkel ϕ des Lichtstrahls zur Oberflächennormale und den Brechungsindizes des optisch dichteren (n_1) und dünneren Mediums (n_2).^[66]

$$d_p = \frac{\lambda_0}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2(\phi) - n_2^2}} \quad (3.2)$$

Für die vorliegende Arbeit werden die CH_2 -Banden von Lipid-Bilagen betrachtet. Abhängig von der Orientierung der Kettengruppen im hydrophoben Inneren der Bilagen, werden verschiedene Phasenzustände definiert, welche sich auch in der Lage der CH_2 -Absorptionsbanden der Kettengruppen unterscheiden. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur von DMPC kann zum Beispiel die asymmetrische Streckschwingung bei etwa $\nu_{asym} = 2918 \text{ cm}^{-1}$ detektiert werden, die symmetrische Streckschwingung bei $\nu_{sym} = 2850 \text{ cm}^{-1}$. Die berechneten Eindringtiefen bei diesen Wellenzahlen sind in Tabelle 3.4 beschrieben.

Tabelle 3.4: Berechnung der Eindringtiefen des evaneszenten Feldes von IR-Strahlung bei der Anregungswellenzahl der CH₂-Valenzschwingungen unter einem Einfallswinkel von 45°.

Schwingungsbande	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹]	n_{Si} ^[148]	$n_{\text{D}_2\text{O}}$ ^[149]	d_p [nm]
$\nu_{\text{CH}_2, \text{asym}}$	2918	3,4699	1,4148	258,8
$\nu_{\text{CH}_2, \text{sym}}$	2850	3,4699	1,3984	263,8

Um die entsprechende Extinktion, die durch eine Lipid-Bilage verursacht wird, zu beschreiben, kann nun angenommen werden, dass eine Interaktion der CH₂-Gruppen mit dem evaneszenten Feld stattfindet. Mit der Probenausleuchtung f , der Dichte von CH₂-Gruppen in den Lipid-Molekülen $\rho_{\text{CH}_2}^{\text{lip}}$ und einem Proportionalitätsfaktor K gilt dann für die Absorption der n-ten Bilage

$$A_n^{\text{lip}} = K \cdot E_0^2 \cdot \rho_{\text{CH}_2}^{\text{lip}} \cdot f \int_{z_n}^{z_n+d_{\text{lip}}} e^{-2\frac{z}{d_p}} dz = -C \cdot \rho_{\text{CH}_2}^{\text{lip}} \left(e^{-2\frac{z_n+d_{\text{lip}}}{d_p}} - e^{-2\frac{z_n}{d_p}} \right) \quad (3.3)$$

$$\text{mit } C = K \cdot E_0^2 \cdot f \quad (3.4)$$

Die Integrationsgrenzen sind definiert über die Dicke der Bilage d_{lip} und deren jeweiligen Abstand z_n zur Grenzschicht. Diese Informationen können aus der Modellierung von Reflektometriedaten erhalten werden. Für die gesamte Extinktion der Probe gilt dann

$$A_{\text{theo}}^{\text{lip}} = \sum_{n=0}^{N-1} A_n^{\text{lip}} = -C \cdot \sum_{n=0}^{N-1} \rho_{\text{CH}_2}^{\text{lip}} \left(e^{-2\frac{z_n+d_{\text{lip}}}{d_p}} - e^{-2\frac{z_n}{d_p}} \right) \quad (3.5)$$

mit der Gesamtzahl der Bilagen N . Die Konstante C ist inhärent unbekannt. Wird jedoch auf einen entsprechenden Referenzwert normiert, wie zum Beispiel dem Probenzustand vor einer beobachteten Veränderung durch äußere Einflüsse, kann die Konstante in den erhaltenen Gleichungen heraus gekürzt werden.

3.7.2. Simulation kinetischer Messungen in ATR-FTIR

Wie in Abschnitt 3.7.1 beschrieben, kann mithilfe von strukturellen Vorkenntnissen der untersuchten Probe die zu erwartende Absorption in ATR-FTIR-Spektren ermittelt werden, was eine tiefere Interpretation der gemessenen Absorptionsbanden erlaubt. In diesem Abschnitt wird dies explizit an einem Prozess beschrieben, bei welchem Lipid-Bilagen durch äußere Einflüsse abgetragen werden. Solche Prozesse sind mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie kinetisch verfolgbar, während NR aufgrund der schlechteren zeitlichen Auflösung nur bedingt dafür geeignet ist. NR kann jedoch initial genutzt werden, um vor Auftreten des Prozesses die Probe zu charakterisieren und so eine Simulation der IR-Absorptionsbanden zu ermöglichen. Das für die NR-Simulation genutzte Modell wird an den entsprechenden Stellen der vorliegenden Arbeit genau beschrieben. Um den Zusammenhang zur IR-Simulation zu verstehen, reicht eine rudimentäre Betrachtung des Aufbaus von Lipid-Oligobilagen aus.

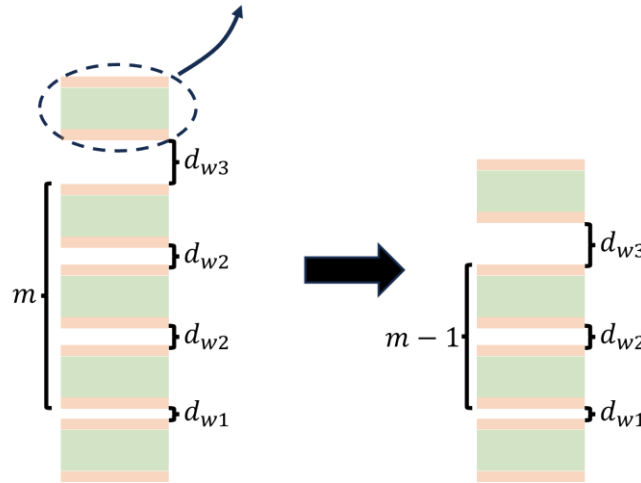


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung des Ablöseprozesses von Lipid-Oligobilagen. Beim Lösen der äußeren Bilage von der Probe wird die nächste Bilage zur äußeren mit der entsprechenden Wasserzwichenschicht der Dicke d_{w3} .

Es wird zunächst angenommen, dass alle Lipid-Bilagen in ihrem Aufbau, sowohl bezogen auf die Zusammensetzung als auch die Vollständigkeit, identisch sind und diese Eigenschaften sich während des untersuchten Prozesses nicht ändern. Gleichzeitig unterscheiden sich die Bilagen jedoch in ihren jeweiligen Abständen zueinander. Somit werden basierend auf den NR-Daten sowohl die Dicke d_{w1} der ersten Wasserzwichenschicht und die der äußersten Wasserzwichenschicht d_{w3} separat angepasst. Die Dicke d_{w2} der inneren Wasserzwichenschichten werden als gleich angenommen, um den Parameterraum möglichst klein zu halten. Hieraus ergeben sich die für die Simulation der IR-Absorptionsbanden benötigten Probeneigenschaften: Aus den ermittelten Wasserzwichenschichten können die Abstände z_i der einzelnen Lipid-Bilagen zur Grenzfläche berechnet werden.

$$\begin{aligned} z_0 &= 0 \\ z_m &= d_{w1} + m \cdot d_{w2} + (m + 1) \cdot d_{lip} \\ z_l &= d_{w1} + (N - 3) \cdot d_{w2} + d_{w3} + (N - 1) \cdot d_{lip} \end{aligned} \quad (3.6)$$

Hierbei beschreibt z_0 den Abstand der ersten Bilage zur Oberfläche, z_m den der inneren Bilagen und z_l den der äußeren Bilage. Diese können nun in die Exponentialfunktionen von Gleichung (3.5) eingesetzt werden. Der Ablöseprozess wird nun so interpretiert, dass sich die äußere Bilage von der Probe löst und die nächste Bilage nun zur äußeren mit der Wasserzwichenschicht d_{w3} wird. Damit wird faktisch die Zahl m der inneren Bilagen um eins reduziert. Dieser Prozess wird in Abbildung 3.8 zur Verdeutlichung schematisch dargestellt. Nun kann nach Gleichung (3.5) die IR-Absorption der Oligobilagen für eine beliebige Anzahl an Bilagen berechnet werden. Da die Zahl N der Bilagen zu Beginn des untersuchten Prozesses durch NR-Simulation bekannt ist, können die erhaltenen Werte auf den für N Bilagen normiert werden, wodurch die simulierte Absorption unabhängig von C und $\rho_{CH_2}^{lip}$ wird. Auf diese Weise kann anhand der gemessenen Absorption relativ zum Anfangswert auf die Zahl der verbliebenen Bilagen geschlossen werden.

3.8. Elektronenmikroskopie

Zur Charakterisierung von NPs wurden diese mithilfe von Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Hierzu wurde ein JSM-7610F Rasterelektronenmikroskop (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) verwendet, welches Eigentum des Arbeitskreises Zaumseil (Universität Heidelberg) war und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt wurde. Es handelt sich hierbei um ein Schottky-Feldelektronenmikroskop mit einer Vergrößerung von bis zu einer Million, was eine Auflösung bis hin zu 1 nm zulässt. Proben wurden wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben hergestellt und mit Graphit-Klebeband auf dem Probenhalter befestigt. Dieser wurde bei einem Druck von 10^{-8} mbar in das Mikroskop eingeschleust. So konnten bis zu drei Proben auf einmal zur Untersuchung vorbereitet

werden. Die erhaltenen Bilder wurden anschließend mithilfe von ImageJ analysiert. Hierfür wurde ein passender Ausschnitt des Gesamtbildes gewählt, in dem ausreichend isolierte Partikel zu erkennen waren. Die Kontraste wurden über einen FFT-Bandpassfilter verstärkt und anschließend über einen Hochpassfilter die Partikel isoliert. Die erhaltene Partikelgrößen wurden exportiert und in OriginPro statistisch ausgewertet. Eine beispielhafte Auswertung der erhaltenen Bilder ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

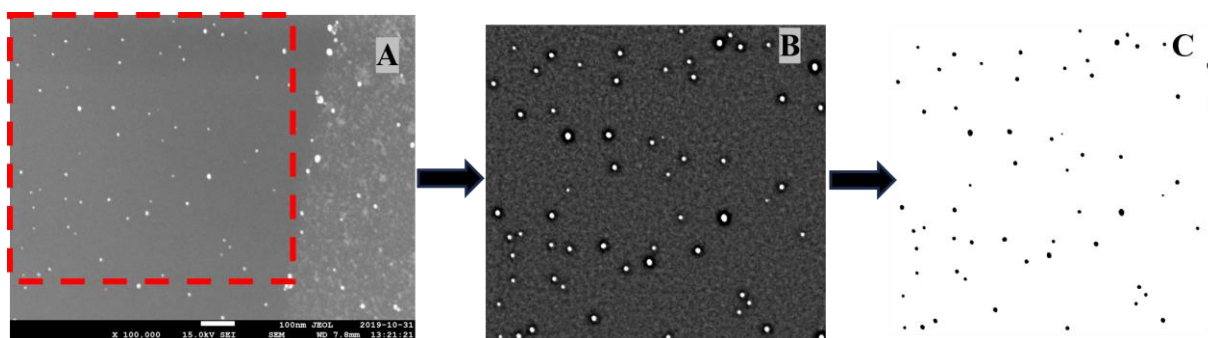


Abbildung 3.9: Beispielhafte Auswertung einer Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme von NPs. **A** Gesamtbild und gewählter Bildausschnitt zur Auswertung. **B** Bildausschnitt nach Anwendung des FFT-Bandpassfilters. **C** Isolierte Partikel nach Anwendung eines Hochpassfilters.

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

Für aktuelle Forschung spielen oberflächenbezogene Prozesse eine große Rolle. Sie umfassen eine Vielzahl an Systemen, sowohl biologischer als auch synthetischer Natur, die für verschiedenste wissenschaftliche Themen relevant sind. So sind zum Beispiel die Oberflächen von Zellen, die Zellmembranen, als erster Kontaktpunkt mit Fremdstoffen ein wichtiges Forschungsobjekt für die Entwicklung medizinischer Produkte, wie Antibiotika.^[150] Oberflächenbeschichtungen sind von Interesse für Materialwissenschaften, da sie deren chemische und physikalische Eigenschaften modifizieren oder diese passivieren können.^[151] Unter anderem kann somit die Langlebigkeit und Osseointegration, also der Verbund von Knochengewebe und -implantat, künstlicher Gelenke verbessert werden.^[152] Auch für chemische Industrie und Forschung sind Oberflächen wichtig, beispielsweise beim Thema der heterogenen Katalyse.^[153] Ein tiefgründiges Verständnis der physikalischen und chemischen Eigenschaften von Oberflächen ist somit von außerordentlicher Wichtigkeit.

Als eine besonders leistungsfähige Untersuchungsmethode von Oberflächen hat sich die NR erwiesen. Bei dieser Methode wird ein Neutronenstrahl von der zu untersuchenden Oberfläche reflektiert, wobei die Reflexionseigenschaften sowohl von den Wellenvektoren der Neutronen als auch der Oberflächenbeschaffenheit abhängig sind. Somit können zum Beispiel die chemische Zusammensetzung und die Dicke von Adsorbaten bestimmt werden. Aus den erhaltenen NR-Profilen lassen sich diese Eigenschaften jedoch nicht direkt ablesen, sondern müssen über eine geeignete Simulation modelliert werden. Dies macht eine Vorkenntnis der Probenbeschaffenheit notwendig und kann bei falschen Annahmen zu Fehlinterpretationen führen. Oft lassen Datensätze auch mehrere Kombinationen aus Parameterwerten zu, die zu sehr ähnlichen NR-Profilen führen, vor allem wenn typische Merkmale, wie Bragg-Peaks und Kiessig-Oszillationen nur schwach ausgeprägt sind.^[18] Eine bewährte Möglichkeit, den Parameterraum einzugrenzen, ist die komplementäre Charakterisierung der Probe mit zusätzlichen Messmethoden. Dies ermöglicht eine sorgfältige Wahl des zur Anpassung der Messdaten verwendeten Modells. Typische komplementäre Techniken sind zum Beispiel XRR,^[7, 38] IR-Spektroskopie,^[5] Raster-Kraft-Mikroskopie,^[37-38] Quarzkristall-Mikrowaage mit Schwingungsdämpfung^[6] oder SE.^[7-8] Solche Methoden können entweder eine Vorcharakterisierung bieten oder aber simultan zur Messung mit NR stattfinden. Gerade letzteres birgt den Vorteil, dass die Messungen unter denselben Rahmenbedingungen und an derselben Probe stattfinden und somit Abweichungen minimiert werden. Die Implementierung solcher Methoden an vorhandenen Neutronenreflektometern ist jedoch kein triviales Unterfangen, wodurch die Zahl entsprechender Aufbauten begrenzt ist. NREX (Heinz Maier-Leibnitz Institut, Garching, Deutschland) bietet zum Beispiel die simultane Probencharakterisierung mit XRR.^[154] Spatz (ANSTO, Sydney, Australien), welches vormals unter dem Namen BioRef (Helmholtz-Zentrum, HZB, Berlin, Deutschland) bekannt war,^[5] bietet simultane ATR-FTIR-Spektroskopie. Oft werden kombinierte Aufbauten von den Instrumentennutzern selbst erstellt. Sebastiani *et al.* führten zum Beispiel simultane Messungen mit monochromatischer Ellipsometrie und NR an FIGARO (Institut Laue-Langevin, ILL, Grenoble, Frankreich) mit einem eigens konstruierten Aufbau durch.^[8]

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

Basierend auf dem ehemals am HZB installierten Instrument BioRef^[5] sollte in deutsch-schwedischer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Ederth (Lund University, Schweden) ein neuer Messaufbau konstruiert werden. Die Anforderung an dieses neue Instrument war, ähnlich wie am Vorbild die simultane Anwendung von ATR-FTIR und NR zu ermöglichen. Zusätzlich sollte die Option gewährleistet werden, simultan Aufnahmen mit spektraler Ellipsometrie an der Probe durchzuführen. Im Gegensatz zu BioRef war hier keine feste Installation vorgesehen, sondern zwei Messaufbauten, welche mit möglichst wenig Aufwand an den NR-Instrumenten FIGARO^[26] (horizontale Probengeometrie) und D17^[138] (vertikale Probengeometrie) am ILL auf- und abgebaut werden können.

Aufgabe der deutschen Kooperationspartner war es, die Plattformen zu entwerfen und verwirklichen, mit welchen ATR-FTIR und NR ermöglicht wurden, wohingegen die schwedischen Kooperationspartner eine Probenzelle entwerfen sollten, mit welcher zeitgleich, durch Installation eines Ellipsometers, auch ellipsometrische Messungen ermöglicht werden. Dementsprechend galt es, in den Entwürfen der Plattformen den nötigen Platz für das Ellipsometer einzuplanen.

4.1. Vorüberlegungen

Für BioRef wurde das FTIR-Spektrometer Vertex 70 (Bruker, Billerica, USA) verwendet. Es handelt sich hierbei um ein leistungsstarkes Instrument, welches Schwingungsbanden in den für biologische Prozesse relevanten Wellenzahlenbereichen von $\tilde{\nu} = (4000 \sim 1450) \text{ cm}^{-1}$ mit guter spektraler und zeitlicher Auflösung aufnehmen kann. Der Detektor kann aus dem Hauptgehäuse entfernt und extern verbunden werden, was eine flexible Installation für die gewünschte Anwendung ermöglicht. Ein besonderer Vorteil des Spektrometers besteht in seinem Interferometer, welches nicht nur in horizontaler Ausrichtung betrieben werden kann, sondern auch bei Verkippung in beliebiger Richtung verwendet werden kann.¹ Dies war hinsichtlich der simultanen Nutzung von NR nützlich, um Proben in unterschiedlichen Winkeln messen zu können und somit den Bereich messbarer Streuvektoren zu erweitern. Jedoch besitzt es auch ein hohes Gewicht, weshalb es für einen transportablen Aufbau, wie er für die vorliegende Arbeit vorgesehen war, nicht geeignet ist. Es musste somit ein möglichst leichtes Spektrometer verwendet werden, welches jedoch über hinreichend gute Empfindlichkeit für dünne Proben verfügte. Weiter musste auch bei diesem die Möglichkeit bestehen, Spektrometer und Detektor voneinander getrennt zu platzieren, da nur so ein flexibler Aufbau ermöglicht wird, der eine Kombination von IR- und NR-Messungen erlaubt.

Die Wahl fiel auf das Nicolet iG50 FTIR-Spektralphotometer (Thermo Fisher, Massachusetts, USA). Das Spektrometer selbst hat ein Gewicht von 30 kg, Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektor (mercury cadmium telluride, MCT) und Gehäuse wiegen zusammen etwa 5 kg. Somit kann es problemlos von zwei Personen angehoben und transportiert werden. Der Strahlteiler des Interferometers, sowie alle optischen Fenster bestehen aus Zinkselenid. Dieses Material ist, im Gegenteil zu vielen anderen für IR-Spektroskopie üblichen Materialien, unempfindlich gegenüber Luftfeuchtigkeit, was den sicheren Transport des Spektrometers ohne konstante Spülung mit Trockengas ermöglicht. In Kombination mit dem Detektor steht somit ein spektraler Bereich von $\tilde{\nu} = (4000 \sim 750) \text{ cm}^{-1}$ zur Verfügung. Die

¹ Diese Information ist nicht über die Hersteller-Webseite erhältlich und wurde in einem Verkaufsgespräch erhalten.

Auflösung des Spektrometers kann zwischen $0,125\text{ cm}^{-1}$ und 32 cm^{-1} variiert werden, wobei die Aufnahme eines einzelnen Spektrums zwischen 5,7 s und 0,3 s beträgt.

Im Folgenden wird die Entwicklung der kombinierten Messaufbauten vom ersten Prototypen bis hin zu den finalen Setups beschrieben. Hierbei werden auch zu allen relevanten Stadien Beispielerperimente gezeigt und auf die vorgegebenen Ziele hin evaluiert.

4.2. Erster Prototyp für horizontale Probengeometrien und Test an FIGARO

Der erste Prototyp des kombinierten Messaufbaus wurde nach Erhalt des Spektrometers im Juni 2019 entwickelt. Hierfür sollte die geplante IR-Strahlführung auf einer Holzplatte montiert werden, die vor Ort auf den Probentisch des Instruments fixiert werden konnte. Die Wahl, eine Holzplatte zu verwenden, wurde aufgrund der einfachen Modifizierbarkeit getroffen. Dies erlaubt einen flexiblen Aufbau und einfache Modifikationsmöglichkeiten vor Ort, wodurch sie für einen Prototypen bestens geeignet ist. Da es sich bei FIGARO um ein Neutronenreflektometer mit horizontaler Probenposition handelt, kann der Großteil des optischen Aufbaus in einer Ebene stattfinden (siehe Abbildung 4.1). Die verwendeten optomechanischen Komponenten und Spiegel stammten von Thorlabs (Newton, USA), Zinkselenid-Linsen von Thorlabs und Edmund Optics (Barrington, USA). Es wurden vor und nach der Probe jeweils zwei Spiegel benötigt, um den IR-Strahl zu den Fenstern des ATR-Kristalls hin, beziehungsweise von diesem zum Detektor zu leiten. Um H_2O -Rotationsschwingungsbanden durch Luftfeuchtigkeit zu reduzieren, wurden zusätzlich Spülgas-Adapter (Thorlabs, CPPC/M) an mehreren Stellen der Strahlführung verbaut. Diese konnten an einen Verteiler angeschlossen werden, welcher auch das

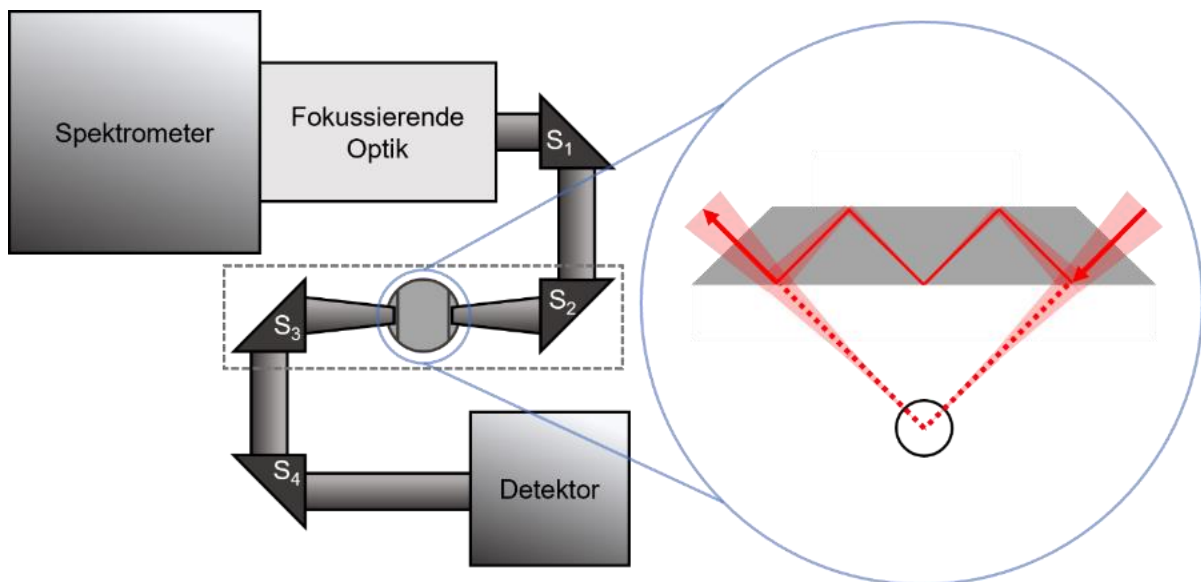


Abbildung 4.1: Skizze des für den FIGARO-Prototypen geplanten Strahlengangs (links). Der Wechsel zwischen Detektor- und Probenebene ist durch den gestrichelten Kasten markiert. Innerhalb des ATR-Kristalls wird der IR-Strahl fünfmal reflektiert (rechts). Eine mögliche Fokussierung des Strahls, dargestellt durch rote Konusse, mithilfe von Parabolspiegeln an den Stellen S_2 und S_3 müsste diesen deshalb auf einen gedachten Punkt unterhalb des Kristalls ausrichten.

Spektrometer und den Detektor mit Trockengas versorgte. Der Durchmesser des Strahls wird vom Hersteller mit 4 cm angegeben, wohingegen die Ein- und Austrittsfenster des ATR-Kristalls lediglich eine Breite von 1,41 cm bieten. Daher wurde entschieden, den Strahl mithilfe fokussierender Optiken zu verkleinern. Hierzu sind unterschiedliche Konstruktionen möglich, welche nachfolgend beschrieben werden.

4.2.1. Reduktion des Strahldurchmessers mit fokussierender Optik

Eine Methode zur Reduktion des Strahldurchmessers wäre eine Fokussierung des Strahls auf die Fenster des ATR-Kristalls. Hierfür wären Parabolspiegel geeignet, welche an den Positionen S_2 und S_3 platziert werden und konfokal auf einen gedachten Punkt unterhalb dessen fokussieren (siehe Detailansicht in Abbildung 4.1). Diese Konstruktion ähnelt somit der Strahlführung, die für BioRef verwendet wurde, wobei hier jedoch die Fokussierung durch plankonvexe Linsen erfolgte. Ein solcher Aufbau benötigt jedoch eine flexible Konstruktion, um die Spiegel so justieren zu können, dass nach beiden Reflexionen erneut ein Parallelstrahl erhalten wird. Da aufgrund der unterschiedlichen Brechungsindizes von Luft und Si der Brennpunkt verschoben wird, gestaltet sich eine entsprechende Konstruktion schwierig. Somit wären Parabolspiegel mit einer passenden Brennweite nötig, um eine komplexe Justage des Aufbaus zu vermeiden. Da zum Zeitpunkt der Planung der Strahlführung jedoch noch keine genauen Angaben zur Geometrie des Aufbaus gemacht werden konnten, war eine entsprechende Auswahl nicht möglich.

Somit wurde von dieser Option abgesehen und entschieden, den Strahldurchmesser am Anfang der Strahlführung zu verkleinern. Dies ist mithilfe eines zwei-Linsen-Systems möglich. Hierbei wird eine plankonvexe Linse mit der Brennweite f_1 auf der Seite des einfallenden, breiten Strahls platziert. Die Linse 2 kann entweder plankonvex oder plankonkav sein (siehe Abbildung 4.2 A/B). Da nach der Verkleinerung erneut ein Parallelstrahl erwünscht ist müssen die Fokalfpunkte beider Linsen aufeinanderliegen, wodurch sich zwei verschiedene Platzierungen der Linse 2 relativ zu Linse 1 ergeben. Im Falle einer plankonkaven Linse erreicht der von Linse 1 fokussierte Strahl Linse 2 vor dem Brennpunkt (Abbildung 4.2 A), im Falle einer plankonvexen wird der Brennpunkt zuerst erreicht (Abbildung 4.2 B). Letzteres hat somit einen erhöhten Platzaufwand zur Folge. Die erreichte Strahlverkleinerung ergibt sich in beiden Fällen aus dem Verhältnis der Brennweiten der verwendeten Linsen:

$$d_2 = d_1 \cdot \left| \frac{f_2}{f_1} \right| \quad (4.1)$$

mit den Strahldurchmessern vor (d_1) und nach (d_2) Durchschreiten beider Linsen und den Brennweiten der Linse 1 (f_1) und 2 (f_2). Es wird der Betrag des Quotienten verwendet, da die Brennweite einer plankonkaven Linse definitionsgemäß negativ ist und sich somit ein negativer Strahldurchmesser d_2 ergäbe. Da das Platzangebot an den Neutronenreflektometern begrenzt ist, wurde eine Kombination von plankonvexer und plankonkaver Linse gewählt. Um das Risiko einer Beschädigung der Optik durch Luftfeuchtigkeit während des Transports zu vermeiden, wurden Linsen aus Zinkselenid eingekauft. Da zum Zeitpunkt der Beschaffung verfügbare Antireflexionsbeschichtungen den nutzbaren spektralen Bereich einschränkten, wurde auf diese zulasten der transmittierten Intensität des IR-Strahls verzichtet.

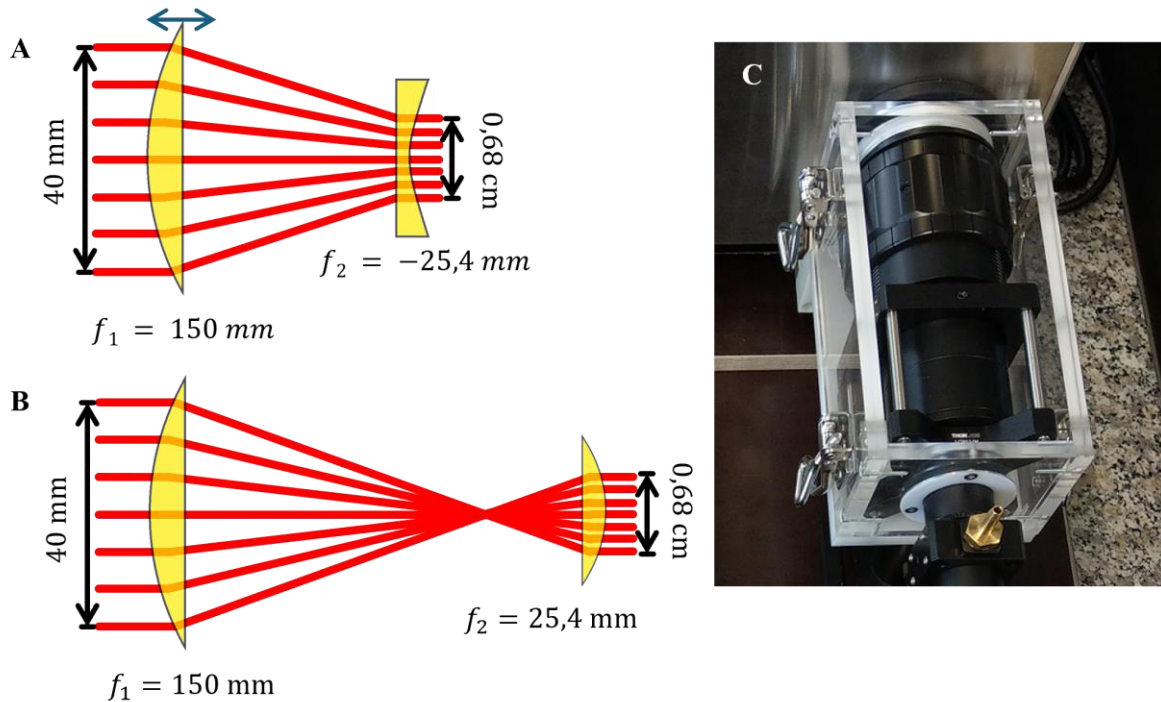


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Reduktion des Strahldurchmessers des Spektrometers mithilfe einer plankonvexen und einer plankonkaven (A), beziehungsweise zweier plankonvexen (B) Linsen. Der Aufbau kann durch Verschiebung der plankonvexen Linse (blauer Pfeil) konfokal eingestellt werden. C Aufbau zur Reduktion des Strahldurchmessers im Prototyp des kombinierten Messaufbaus. Die plankonvexe Linse ist in den Kollimationsadapter eingesetzt, welcher am oberen Ende des Gehäuses zu sehen ist. Das Gehäuse kann zur Spülung mit Trockengas verschlossen werden.

Es wird aufgrund der vom Hersteller angegebenen Transmission von Linse 1 geschätzt, dass durch Absorptions- und Reflexionseffekte bis zu 51% der Intensität verloren werden. Für Linse 1 wurde eine Ø 2" plankonvexe Linse (Edmund Optics, 39540, $f_1 = 150$ mm) und für Linse 2 eine Ø 1" plankonkave Linse (Thorlabs, LC7759-UC-SP, $f_2 = -25,4$ mm) gewählt. Ausgehend von dem vom Hersteller angegebenen Strahldurchmesser des Spektrometers ist somit nach Gleichung (4.1) eine Reduktion auf 6,8 mm zu erwarten. Um eine Justage der Linsenabstände und somit Konfokalität zu ermöglichen, wurde Linse 1 in einen verstellbaren Kollimationsadapter (Thorlabs, SM2F) eingebaut, wohingegen Linse 2 unbeweglich in einen Ø 1" Tubus (Thorlabs, SM1-Reihe) eingebaut wurde. Da Luftfeuchtigkeit zwar keine Beschädigung der Optik verursacht, jedoch H_2O -Rotationsschwingungsbanden in IR-Spektren verursacht musste neben dem übrigen Strahlengang auch die Fokussiereinheit mit Trockengas gespült werden. Hierzu wurde in Zusammenarbeit mit der feinmechanischen Werkstatt des Physikalisch-Chemischen Instituts (PCI) Heidelberg ein entsprechendes Gehäuse gefertigt (siehe Abbildung 4.2 C). Dieses konnte zugunsten der mechanischen Stabilität über Aluminium-Stäbe am Gehäuse des Spektrometers befestigt werden.

4.2.2. Strahlführung des FIGARO-Prototyps

Durch die in Abschnitt 4.2.1 beschriebene Reduktion des Strahldurchmessers konnte die weitere Strahlführung über Ø 1" Optomechanik durchgeführt werden. Für die benötigten Reflexionen wurden runde Gold-Spiegel (Thorlabs, PF10-03-M02) verwendet, welche in kinematische Spiegelhalter

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

(Thorlabs, KCB1C/M, S₁ bis S₄ in Abbildung 4.1) eingesetzt wurden. Die gewählten Spiegel verfügen über eine Beschichtung, welche für den spektralen Bereich von $\lambda = 2 - 20 \mu\text{m}$ ($\tilde{\nu} = (5000 - 500) \text{ cm}^{-1}$) optimiert ist. Diese war für elliptische Spiegel nicht erhältlich, weshalb diese nicht verwendet wurden, obwohl sie für Reflexionen unter 45° aufgrund des elliptischen Fußabdrucks eines runden Strahls vorteilhaft wären. Dieser Vorteil tritt jedoch erst auf, sobald der Spiegel durch den eintreffenden Strahl vollständig ausgeleuchtet wird. Bei $\varnothing 1''$ -Spiegeln ist dies ab einem Strahldurchmesser von 18 mm gegeben, was durch die beschriebene Strahlverkleinerung deutlich unterschritten wird. Die Spiegelhalter waren über $\varnothing 1''$ -Tuben (Thorlabs, SM1-Reihe) verbunden. Um die Reflexion des IR-Strahls aus der Spektrometer-Ebene hin zum ATR-Kristall und zurück zu ermöglichen, wurden zwischen den Spiegelhaltern rotierbare Adapterplatten (Thorlabs, SPR1/M) verbaut. Hinter diesen wurden ausfahrbare $\varnothing 0,5''$ Tuben (Thorlabs, SM05-Reihe) verwendet, womit das Tubus-System bis zum Eintrittsfenster des Kristalls ausgefahren und für einen unkomplizierten Probenwechsel wieder eingefahren werden konnte. Die Spülung des Strahlengangs mit Trockengas wurde durch entsprechende Adapter (Thorlabs, CPPC/M) ermöglicht, die Befestigung an der Grundplatte erfolgte über $\varnothing 0,5''$ Edelstahlpfosten (Thorlabs, TR/M-Reihe) und Universal-Pfostenhalter (Thorlabs, UPH30/M). Zusätzlich sollte die mechanische Stabilität durch Benutzen eines Käfigsystems erhöht werden, bei welchem die Spiegelhalter über $\varnothing 6 \text{ mm}$ Edelstahl-Stäbe (Thorlabs, ER-Reihe) verbunden werden. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten einiger Bauteile musste jedoch für den Prototypen auf dieses System größtenteils verzichtet werden. In späteren Versionen wurde ein Großteil der Strahlführung auf diese Weise stabilisiert.

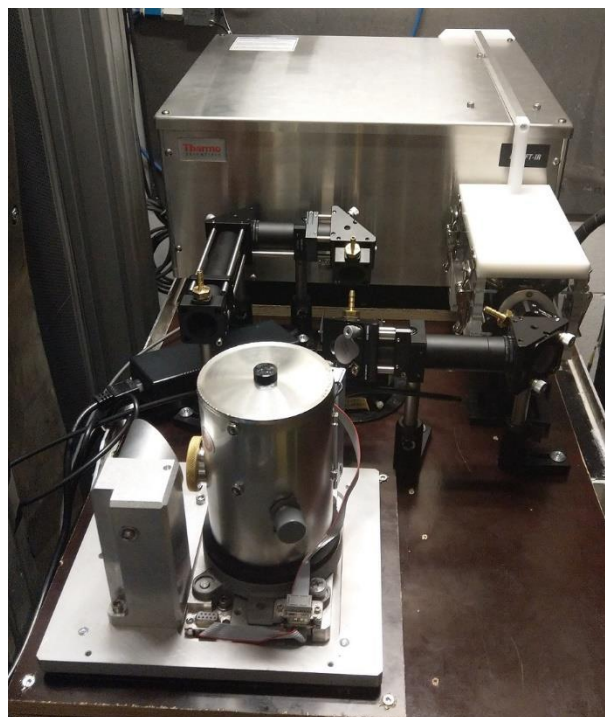


Abbildung 4.3: Der Prototyp des ATR-FTIR-Aufbaus an FIGARO im August 2019 war auf einer Holzplatte montiert, welche auf dem Probenstisch des NR-Instruments installiert werden konnte. Der Durchmesser IR-Strahl wurde mithilfe fokussierender Optik, welche in dem rechts im Bild zu sehenden Gehäuse untergebracht war, reduziert (siehe hierzu auch Abbildung 4.2 C). Das Gehäuse des Detektors (vorne links) wurde aufgrund fehlerhafter Fenster entfernt.

In ersten Tests konnte der Prototyp noch nicht in ATR-Konfiguration verwendet werden, da nach Durchgang des IR-Strahls durch der ATR-Kristall keine Intensität mehr gemessen wurde. Grund hierfür war ein fehlerhafter Kristall, dieser Umstand wurde jedoch erst nach den ersten Tests des Prototyps entdeckt. Als Alternative wurde entschieden, die Reflexion an einem mit Gold bedampften Si-Wafer zu messen. Weiter musste aufgrund fehlerhaft gelieferter Detektorfenster für erste Tests auf das Detektorgehäuse verzichtet werden, weshalb ein Trocknen des Strahlengangs nicht möglich war. Da das primäre Ziel des Prototypen-Tests jedoch war, etwaige Probleme mit dem am Instrument verfügbaren freien Raum zu identifizieren, insbesondere um Kollisionen beim Verfahren des Messaufbaus während einer NR-Messung zu vermeiden, wurden diese Umstände als keine wesentliche Einschränkung angesehen. Im August 2019 wurde der Test des Prototyps während eines Reaktor-Shutdowns am ILL durchgeführt. Ein Bild, welches in diesem Zeitraum entstand, ist in Abbildung 4.3 zu sehen. Die Grundplatte des Prototyps musste gekürzt werden, jedoch zeigte ein Test, dass bei einem Verfahren des Probenstisches, wie es während einer NR-Messung üblich wäre, keine Kollisionsgefahr mit fest installierten Teilen des Instruments zu befürchten ist. Weiter wurde getestet, ob die Kippung des Messtischs, die bei einer typischen NR-Messung benötigt wird, einen Einfluss auf die erhaltenen IR-Spektren haben wird. Hierbei wurde festgestellt, dass bei maximaler Verkippung des Probenstisches zwar eine Änderung der Form der CH_2 -Valenzschwingungsbanden beobachtet werden kann, diese jedoch so gering ausfallen, dass für die geplanten Experimente keine Probleme zu erwarten sind. Die entsprechenden Spektren sind im Anhang 12.1 zu finden.

Die Justage des IR-Strahls erwies sich aufgrund der Fokussiereinheit als schwierig. Trotz großer Bemühungen war die am Detektor gemessene Intensität gering, selbst in der vereinfachten Konfiguration, welche bei den Tests zum Einsatz kam. In weiteren Tests mit Lochblenden in den eigenen Laboren in Heidelberg wurde festgestellt, dass die Strahlintensität nicht wie angenommen gleichmäßig über den vom Hersteller angegebenen Durchmesser von 4 cm verteilt ist, sondern > 95% der Intensität innerhalb von $\varnothing 1''$ im Zentrum des Spektrometerfensters enthalten ist. Eine Lochblende von $\varnothing 0,5''$, was in etwa dem Eingangsfenster der ATR-Kristalle entspricht, zeigte noch immer eine Durchlässigkeit von > 60% der Anfangsintensität. Aus diesem Grund wurde für weitere Arbeiten auf die Fokussiereinheit verzichtet und der Strahldurchmesser mit einer verstellbaren Lochblende (Thorlabs, SM1D25) reduziert, um etwaige Reflexionen an den Wänden der Tuben zu vermeiden.

4.3. Kombierter Messaufbau für NR und ATR-FTIR

In Zusammenarbeit mit Reinhold Jehle und der feinmechanischen Werkstatt des PCI Heidelberg wurde ein vorläufiger Messaufbau entworfen, der kombinierte NR- und ATR-FTIR-Messungen ermöglichte. Da zu diesem Zeitpunkt genaue Abmessungen für den Aufbau des Ellipsometers und der von unserem Kooperationspartner neu zu entwickelnden Flüssigkeitszelle noch nicht verfügbar waren, musste auf das Einplanen dieser vorerst verzichtet werden. Es wurde eine stabilere Plattform aus Aluminium anstelle der Holzplatte des Prototyps gefertigt. Um den Aufbau vor Ort zu erleichtern, bestand diese aus einer großen Grundplatte, auf welcher die einzelnen Komponenten mit kleineren Platten befestigt wurden. Dies wurde realisiert, indem für das Spektrometer, die Optik und den Detektor je eine eigene Platte gefertigt wurde. In der Platte der Optik befand sich mittig eine Aussparung, in welcher die Probenhalterung platziert wurde. Über Langlöcher und eine Hebebühne (Thorlabs, L200/M) konnte die Probe zur Justage in drei Raumrichtungen verschoben werden (siehe Abbildung 4.4 A). Im Vergleich zum Prototypen wurden außerdem alle Komponenten höher platziert, um eine Aktivierung der Plattform durch Neutronenstrahlung zu vermeiden. Ein Teil der verwendeten Tuben wurden von der feinmechanischen Werkstatt des PCI auf das gewünschte Maß gekürzt. Die Spülung des Strahlengangs erfolgte am PCI über getrocknete Druckluft, am ILL über eine Stickstoff-Hausleitung. In beiden Fällen wurde das Trockengas über eine Druckminderungseinheit auf die benötigten Drücke und Durchflussvolumina reduziert und somit der gesamte Aufbau versorgt.

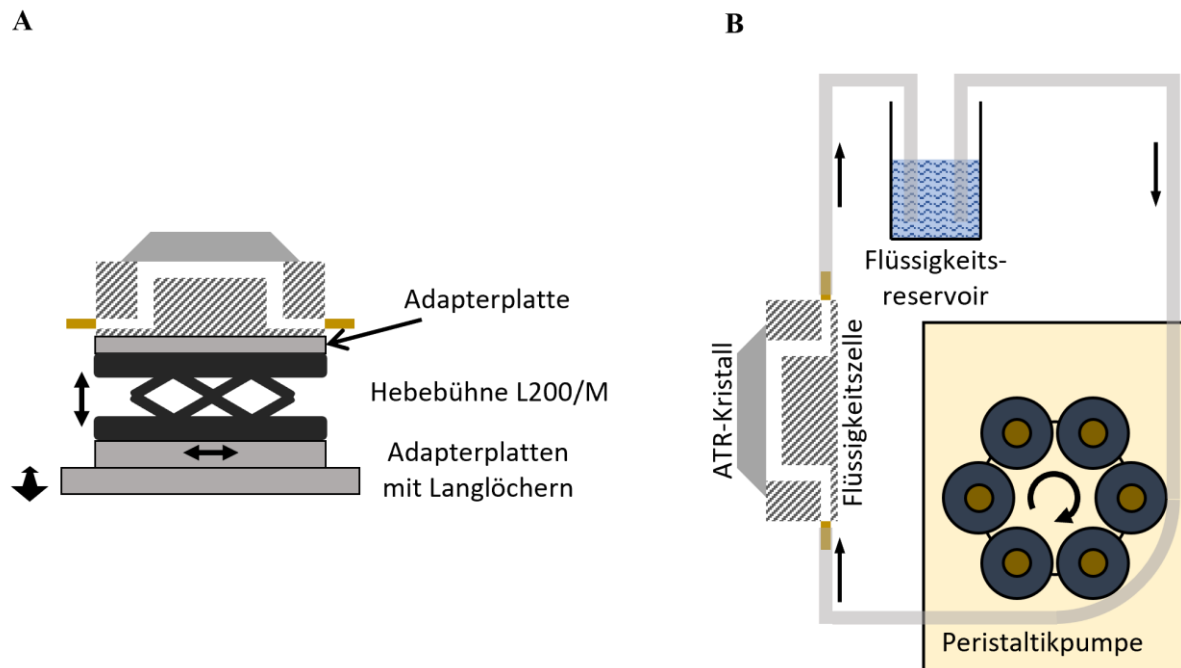


Abbildung 4.4: **A** Die Halterung der Flüssigkeitszelle. Die Kombination aus zwei Adapterplatten mit Langlöchern und einer kommerziell erhältlichen Hebebühne erlaubt die Justage der Probe in drei Achsen. Die Flüssigkeitszelle selbst stammt aus den Arbeiten von Martin Kreutzer und Felicitas Schwörer ^[14, 155] und erlaubt die gleichmäßige Temperierung der Probe durch einen externen Kryostaten (nicht dargestellt). **B** Mithilfe einer Peristaltikpumpe und einem Tygon-Schlauchsystem wurde ein konstanter Durchfluss in der Flüssigkeitszelle gewährleistet.

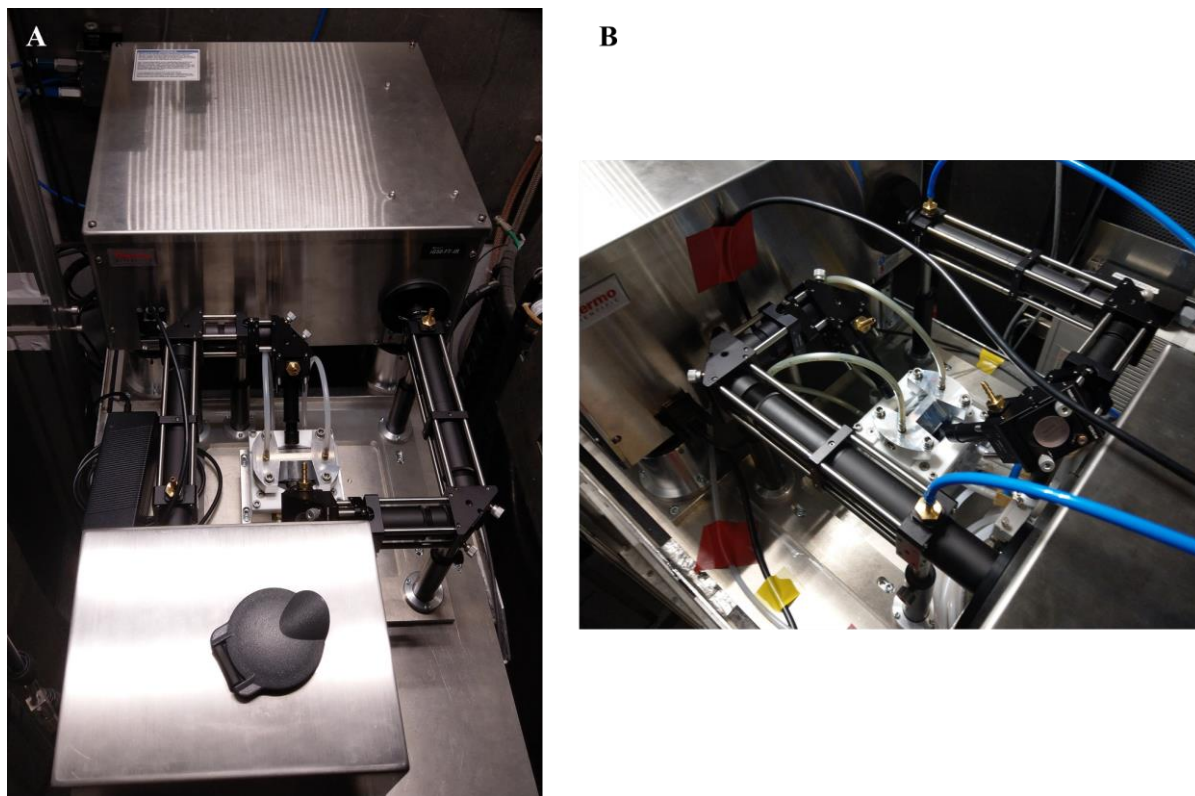


Abbildung 4.5: Der vorläufige Aufbau zur Kombination von NR und ATR-FTIR an FIGARO bei Tests an FIGARO im Januar 2020 (A) und ersten Messungen im Februar 2020 (B).

Da bei den getesteten Einstellungen des Probentisches des Reflektometers keine Kollisionsgefahr mit dem IR-Spektrometer bestand und durch die Verkippung auch keine Probleme am Spektrometer selbst entstanden, wurde geschlussfolgert, dass es für die simultane Messung von ATR-FTIR und NR an FIGARO keiner weiteren Änderungen bedurfte. Dieser Aufbau wurde erneut während eines Reaktor-Shutdowns am ILL im Januar 2020 getestet. Abbildung 4.5 zeigt Bilder, welche während dieser Testphase und den ersten Messungen mit dem kombinierten Aufbau entstanden.

4.3.1. Erste kombinierte Messungen von ATR-FTIR und NR an FIGARO

Die ersten kombinierten Messungen von ATR-FTIR und NR erfolgten im Februar 2020. Ziel war es, die Interaktion von AuNPs mit Oligobilagen von DMPC und Chol nachzuweisen. Hierfür wurden Lösungen der Lipide in Chloroform angesetzt und wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben per Rotationsbeschichtung auf ATR-Kristalle aufgebracht. Die eingewogenen Stoffmengen waren so gewählt, dass sich bei einer Lösung von reinem DMPC eine Konzentration von 10 mg/ml ergeben würde. In den hier beschriebenen Experimenten betrug der Anteil an Chol in Lösung 20%. Der beschichtete Kristall wurde in eine Flüssigkeitszelle eingebaut, welche anschließend über ein Schlauchsystem mit D₂O befüllt wurde. Eine Schlauchpumpe (Ismatec Vario 7337-00, Cole Parmer, Vernon Hills, USA) sorgte für einen konstanten Fluss von 0,6 ml/min. Teil des Systems war auch ein Flüssigkeitsreservoir, über welches der Flüssigphase im Verlaufe des Experiments Salze und AuNPs zugegeben wurden (vergleiche Abbildung 4.4 B). Die Temperatur der Flüssigkeitszelle und des

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

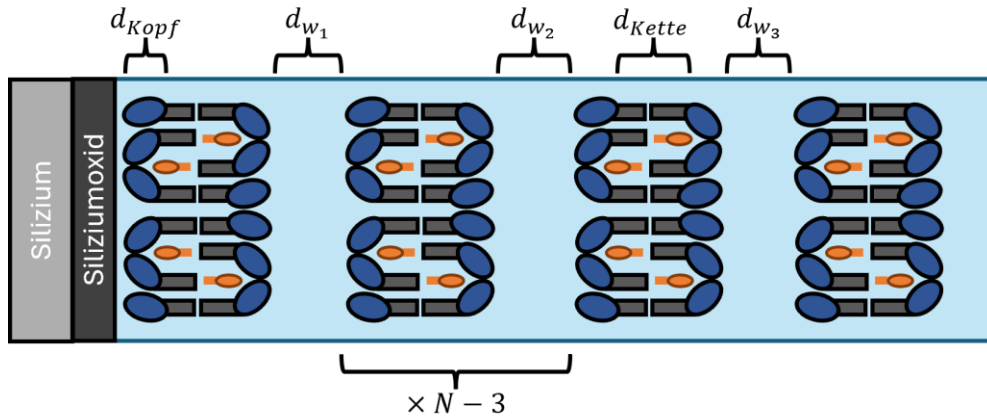


Abbildung 4.6: Skizze des zur Modellierung der NR-Profile von DMPC-Oligobilagen mit 20% Chol-Anteil verwendeten Modells. Alle N Bilagen sind in ihrem Aufbau gleich, das heißt, dass alle äquivalenten Dicken d_{Kopf} und d_{Kette} , die SLDs ρ_{Kopf} und ρ_{Kette} und die Lösungsmittelanteile $\phi_{w, lip}$ identisch sind. Die Dicke der inneren Wasserzweischenschichten d_{w2} wird als gleich angenommen, die Dicken d_{w1} der ersten und letzten Wasserzweischenschicht d_{w3} werden separat angepasst. Alle Rauigkeiten σ zwischen den einzelnen Schichten werden als identisch betrachtet.

Flüssigkeitsreservoir wurde über einen Kryostaten auf 20 °C reguliert. Nach jeder Änderung an der Flüssigphase wurde das System mithilfe der Peristaltikpumpe mehrere Stunden durchspült, sodass dieses den Gleichgewichtszustand erreichen konnte. Erst dann wurde die Probenzelle in den Messaufbau eingebaut und vermessen.

Die Anpassung der NR-Profile erfolgte über ein Modell, welches in der Arbeitsgruppe Dahint von Andreas Stöcklin entwickelt und für die vorliegende Arbeit angepasst wurde.^[156] Dieses wird in Abschnitt 5.3 genauer beschrieben. Eine Skizze des Modells ist in Abbildung 4.6 gegeben. Grob wird angenommen, dass alle N Lipid-Bilagen gleich aufgebaut sind. Somit sind die Dicke d_{Kopf} und SLD ρ_{Kopf} aller Kopfgruppen identisch, ebenso die entsprechenden Parameter der Kettengruppen d_{Kette} und ρ_{Kette} . Um die teilweise Unvollständigkeit der Bilagen zu berücksichtigen wird der Lösungsmittelanteil $\phi_{w, lip}$ in allen mit den Bilagen assoziierten Schichten als identisch angenommen und mit angepasst. Die SLD der Wasserzweischichten sind identisch mit der des Lösungsmittels ρ_{D_2O} , die Dicken werden mit drei Parametern beschrieben. Die Dicke der ersten d_{w1} und der letzten Wasserzweischenschicht d_{w3} werden separat angepasst, um die unterschiedliche chemische Umgebung aufgrund der Nähe zu Substrat und Lösungsmittelphase zu berücksichtigen, während die Dicke d_{w2} der $N - 1$ inneren Schichten identisch angepasst werden. Die Rauigkeiten σ aller Schichten des Modells werden als identisch angenommen und ebenso angepasst. Die gemessene Totalreflexionskanten zeigten eine Reflektivität, welche deutlich unter eins lag. Dies ist auf off-spekulare Streueffekte zurück zu führen und ist durch eine erhöhte iSLD zu simulieren,^[46] wobei diese als gleich in allen mit den Lipiden assoziierten Schichten, und Null in allen anderen Schichten angenommen wurde. ρ_{Kopf} kann aus Literaturwerten für DMPC und der Annahme vollständiger Hydratisierung mit acht D_2O -Molekülen berechnet werden.^[15, 34] Auch ρ_{Kette} kann aus Literaturwerten berechnet werden. Es wird angenommen, dass Chol vollständig in den mit den Kettengruppen assoziierten Schichten lokalisiert und homogen verteilt ist. Weiter wird angenommen, dass der Anteil x_{Chol} des Chol in den Bilagen gleich dem Anteil von Chol in der zur Rotationsbeschichtung verwendeten Lösung ist. Das heißt, dass bei einem Ansatz mit einem

Chol-Anteil von 20% dieses auch 20% in den Bilagen ausmacht, während DMPC einen Anteil von 80% hat. Um nun die SLD der Ketten-Lagen zu bestimmen, können über die Verhältnisse der Komponenten sowohl das durchschnittliche molare Volumen des Films $V_{Kette,Mischfilm}^M$, als auch die durchschnittliche Streulänge $b_{Kette,Mischfilm}$ über Literaturwerte der molaren Volumina der Komponenten V_i^M und deren SLD ρ_i berechnet werden.^[34-35]

$$V_{Kette,Mischfilm}^M = x_{Chol} \cdot V_{Chol}^M + (1 - x_{Chol}) \cdot V_{DMPC,Kette}^M \quad (4.2)$$

$$\begin{aligned} b_{Kette,Mischfilm} &= x_{Chol} \cdot b_{Chol} + (1 - x_{Chol}) \cdot b_{DMPC,Kette} \\ &= x_{Chol} \cdot V_{Chol}^M \cdot \rho_{Chol} + (1 - x_{Chol}) \cdot V_{DMPC,Kette}^M \cdot \rho_{DMPC,Kette} \end{aligned} \quad (4.3)$$

$$\begin{aligned} \rho_{Kette,Mischfilm} &= \frac{b_{Kette,Mischfilm}}{V_{Kette,Mischfilm}^M} \\ &= \frac{x_{Chol} \cdot V_{Chol}^M \cdot \rho_{Chol} + (1 - x_{Chol}) \cdot V_{DMPC,Kette}^M \cdot \rho_{DMPC,Kette}}{x_{Chol} \cdot V_{Chol}^M + (1 - x_{Chol}) \cdot V_{DMPC,Kette}^M} \end{aligned} \quad (4.4)$$

Durch die Einlagerung von Chol in die Bilage nehmen DMPC-Moleküle finden strukturelle Änderungen der DMPC-Moleküle statt.^[79, 157] Die Kettengruppen werden dabei gestreckt und nehmen eine geringere Grundfläche ein. Somit kann eine Zunahme der Kettengruppenschichten beobachtet werden, welche bei hohen Chol-Konzentrationen wieder abnimmt.^[157] Um einen direkten Kontakt zwischen Flüssigphase und den hydrophoben Kettengruppen zu vermeiden findet auch eine strukturelle Änderung der Kopfgruppen statt, die so umlagern, dass die Kettengruppen abgeschirmt werden. Dabei ist eine Abnahme der Dicke d_{Kopf} der Kopfgruppenschicht zu erwarten.^[79] Eine Skizze der erwarteten strukturellen Änderungen ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Um beide Effekte zu berücksichtigen, wurde d_{Kette} in Voruntersuchungen bestimmt (siehe Abschnitt 5.1) und d_{Kopf} für die Simulation der NR-Profile angepasst. Ein simultanes Anpassen beider Größen führte zu unrealistischen Parametern, weshalb die berechneten oder zuvor bestimmten Werte bei der Simulation fixiert wurden. Die so erhalte

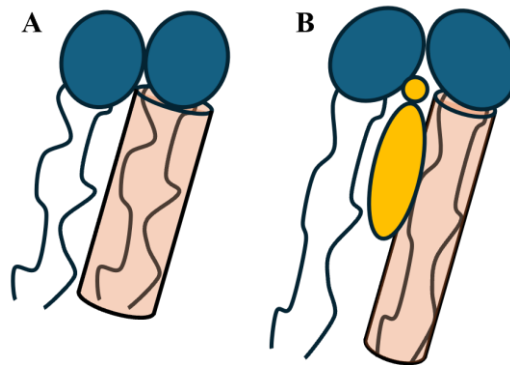


Abbildung 4.7: Skizze der durch Chol-Einlagerung erwarteten strukturellen Änderungen der DMPC-Struktur. **A** zeigt die Monolage vor Einlagerung von Chol. Die Kopfgruppen sind gleichgerichtet, die Kettengruppen liegen teilweise ungeordnet vor. In Gegenwart von Chol (**B**) lagern die Kopfgruppen um, um den hydrophoben Bereich abzuschirmen. Die Kettengruppen werden gestreckt und nehmen so eine geringere Grundfläche ein.^[157]

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

Anpassung ist in Abbildung 4.8 zu sehen (Linien). Eine detaillierte Beschreibung der Experimente und Anpassungen ist in Abschnitt 5.3 zu finden.

Im Anschluss an die Messung der Probe in D₂O wurden 50 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) zugegeben. In vorangegangenen Experimenten zeigten Lipid-Oligobilagen ein starkes Quellverhalten nach Zugabe dieses Salzes. Bei der gewählten Konzentration erreichte die Ionenstärke der Lösung einen Wert nahe dem, der in Säugetier-Mitochondrien vorliegt.^[158-159] Somit sollte eine simple Umgebung für die Proben erzeugt werden, welche jedoch noch immer möglichst nahe die natürlichen Begebenheiten der Zellmembranen widerspiegelt. Das Quellen der Oligobilagen wird über das Wachstum der inneren Wasserzwichenschicht d_{w_2} im Vergleich zur Messung unter D₂O definiert.

$$S_{w_2,i} = \frac{d_{w_2,i}}{d_{w_2,D_2O}} \quad (4.5)$$

Für die Zugabe von MgCl₂ betrug dieser Quellfaktor $S_{w_2,MgCl_2} = 4,17 \pm 0,06$. Dieser Effekt kommt durch die Anlagerung von Mg²⁺-Ionen und die damit verbundene Coulomb-Repulsion zwischen den Bilagen zustande. In ersten Anpassungen konnten keine signifikanten Änderungen von d_{Kopf} und ρ_{Kopf} festgestellt werden, für weitere Anpassungen wurde deshalb auf die Anpassung von d_{Kopf} verzichtet und die Einflüsse der Änderungen der Flüssigphase auf die Kopfgruppen nur über den Parameter ρ_{Kopf} betrachtet. Es wurde eine Zunahme von $\phi_{w,lip}$ in den übrigen Bilagen festgestellt, sowie die Zunahme von σ . Auch nahm die Zahl der Bilagen N um drei ab, was einen zu erwartenden Ablöseprozess durch die Quellung darstellt. Ein Verschieben der Totalreflexionskante konnte nicht beobachtet werden, sodass die SLD der Flüssigphase mit derjenigen der vorherigen Messung gleichgesetzt wurde.

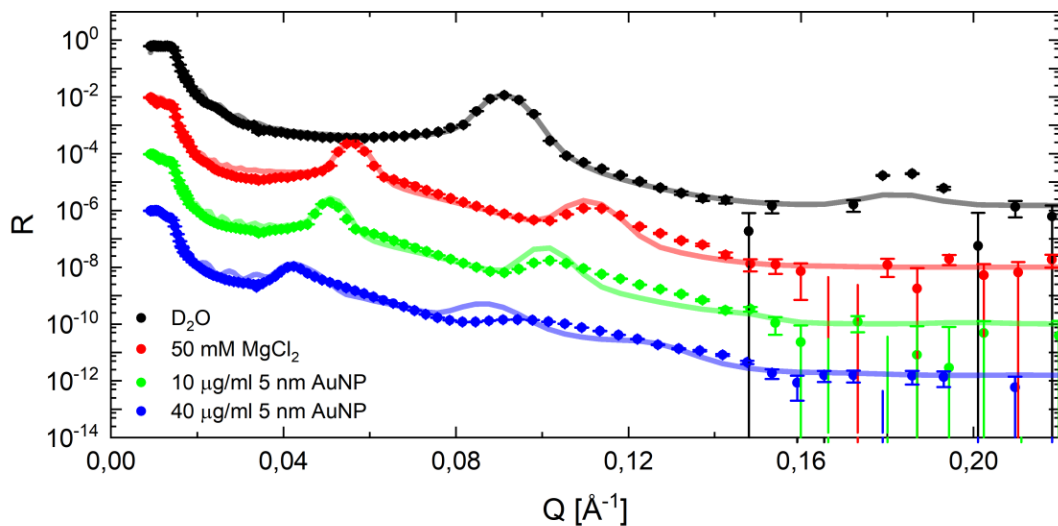


Abbildung 4.8: NR-Profil eines DMPC-Oligobilagensystems mit 20% Chol-Anteil unter D₂O, MgCl₂ und zweier AuNP-Konzentrationen. Die gemessenen Daten sind als Punkte dargestellt, die nach Simulation des Systems erhaltenen Anpassungen als Linien.

Anschließend wurden 10 µg/ml kationische AuNP mit einer Größe von 2 nm zugegeben. Die Synthese dieser ist im Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Der Quellfaktor stieg dabei auf $S_{w2,10 \mu\text{g/ml AuNP}} = 4,98 \pm 0,07$, was durch eine zusätzliche elektrische Repulsion der Bilagen durch eingelagerte AuNP begründet werden kann. Eine deutliche Änderung von σ oder $\phi_{w,tip}$ konnte nicht beobachtet werden, ebenso war keine Änderung von ρ_{Kopf} festzustellen. Jedoch wurde eine deutliche Zunahme der iSLD erhalten. Es ist denkbar, dass die somit implizierte Zunahme off-spekularer Streuung durch inhomogene Einlagerung der AuNP auftritt. Darüber hinaus wurde erneut ein Verlust dreier Bilagen beobachtet. Eine weitere Erhöhung der AuNP-Konzentration auf 40 µg/ml führte zu weiteren Bilagen-Verlusten, während die übrigen auf einen Faktor von $S_{40 \mu\text{g/ml AuNP}} = 6,43 \pm 0,09$ quollen. Auch hier blieben σ und $\phi_{w,tip}$ der übrigen Bilagen weitestgehend unverändert und die iSLD nahm weiter zu, was in Einklang mit den vorherigen Messungen steht.

Abbildung 4.9 zeigt die simultan gemessenen IR-Absorptionsspektren der Probe im Bereich der CH₂-Valenzschwingungsbanden. Wie in Abschnitt 2.3 beschrieben zeigt diese funktionelle Gruppe der Fettsäureketten eine symmetrische Valenzschwingungsbande $\nu_{\text{CH}_2, \text{sym}}$ bei 2850 cm⁻¹ und eine asymmetrische Valenzschwingungsbande $\nu_{\text{CH}_2, \text{asym}}$ bei 2919 cm⁻¹, wobei die Position vom Phasenzustand der Lipid-Bilagen ist. Weitere Banden bei 2955 cm⁻¹ und 2872 cm⁻¹ sind Methyl-Valenzschwingungsbanden zuzuordnen, spielen für die hier beschriebene Auswertung jedoch keine nähere Rolle. Als Hintergrund diente ein Spektrum des unbeschichteten Kristalls in einer mit D₂O befüllten Flüssigkeitszelle, die Basislinienkorrektur erfolgte durch eine gerade Linie zwischen 3000 cm⁻¹ und 2800 cm⁻¹. Es ist eine deutliche Abnahme von $\nu_{\text{CH}_2, \text{sym}}$ und $\nu_{\text{CH}_2, \text{asym}}$ zu erkennen. Da in ATR-FTIR-Messungen die untersuchten Proben mit dem evaneszenten Feld des reflektierten IR-

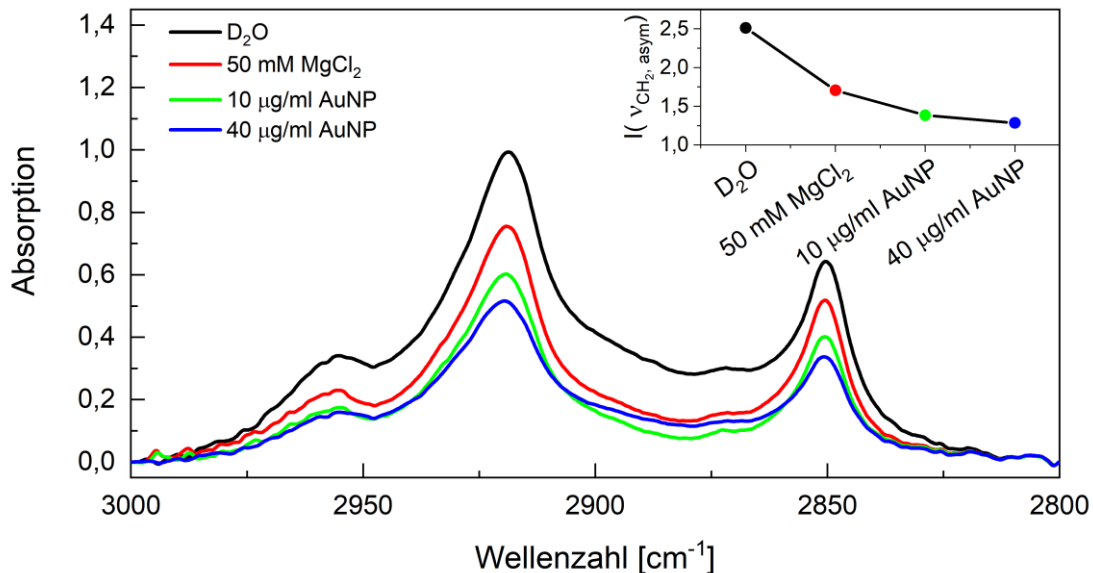


Abbildung 4.9: IR-Absorptionsspektren der untersuchten Probe eines DMPC-Oligobilagensystems mit 20% Chol-Anteil. Der Einzug zeigt das Integral der asymmetrischen CH₂-Valenzschwingungsbande bei 2919 cm⁻¹. Es wurden jeweils 512 Spektren bei einer Auflösung von 4 cm⁻¹ gemittelt, was in einem Zeitbedarf von 3,23 min je Messung resultierte.

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

Strahls wechselwirken, welches exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche abnimmt, führen sowohl ein Lagenverlust als auch eine Quellung zu einer verringerten Absorption. Da zur effektiven Nutzung der Messzeit mehrere Proben parallel in Benutzung waren und diese, während sich das neue Gleichgewicht nach Änderungen an der Flüssigphase einstellte, gewechselt wurden, war eine Simulation der Bandenintensitäten, wie es im Abschnitt 3.7.1 beschrieben ist, nur bedingt möglich. In der Beschreibung des Experiments in Abschnitt 5.3 wird auf diesen Umstand detaillierter eingegangen. Zusätzlich wurde festgestellt, dass durch Probenwechsel periodische Banden auftreten können, welche eine quantitative Betrachtung der Ergebnisse erschweren. Diese Banden, auch Etalons genannt, werden durch teilweise Reflexion und Interferenz des IR-Strahls an den Fenstern des Spektrometers, des Detektors oder des ATR-Kristalls in den Einkanalspektren verursacht.^[160-162] Ändert sich der Strahlengang zwischen der Messung des Hintergrund- und Probenspektrums, so ändert sich auch die Periodizität der Etalons, was sich im Absorptionsspektrum anhand der genannten Banden bemerkbar macht. Vor allem bei schwachen Absorptionsbanden kann dies die Auswertung der Spektren erschweren oder sogar ganz unmöglich machen. Gerade bei Betrachtung der AuNP-Messungen fällt auf, dass trotz der niedrigeren Intensität der Valenzschwingungsbanden der CH₂-Gruppen, die Absorption zwischen 2905 cm⁻¹ und 2860 cm⁻¹ bei der Messung der hohen NP-Konzentration höher ist als bei der Messung bei niedriger Konzentration. Obwohl in diesem Bereich auch die symmetrische Methyl-Valenzschwingungsbande zu finden ist, kann die Einlagerung der AuNP, die auch Methyl-Gruppen tragen, diesen Effekt nicht erklären, da die asymmetrische Methyl-Valenzschwingungsbande bei 2955 cm⁻¹ dem Trend der CH₂-Schwingungsbanden folgt. Somit ist die Abweichung aufgrund von Etalons wahrscheinlich.

Das Ziel der Instrumententests, die simultane Durchführung von NR und ATR-FTIR zu ermöglichen, war somit erfolgreich. Die Ergebnisse aus beiden Methoden sind größtenteils übereinstimmend und die Unterschiede können durch experimentelle Fehler erklärt werden. Nicht zuletzt konnten die periodischen Störsignale in einem Minimaxperiment in den eigenen Laboren in Heidelberg reproduziert werden. Hierfür wurde der IR-Strahl, anstatt durch einen ATR-Kristall geleitet zu werden, an einem Gold-bedampften Si-Wafer reflektiert. Schon bei leichten Änderungen am Wafer, wie zum Beispiel Rotation um wenige Grad, waren Etalons in den Absorptionsspektren deutlich zu erkennen. Ein Beispielexperiment hierzu ist im Anhang 12.2 zu finden. Um diese zu vermeiden, sollte der Strahlengang zwischen den Messungen möglichst nicht verändert werden. Für Untersuchungen von Systemen im Gleichgewichtszustand ist dies jedoch nicht mit einer effizienten Nutzung der zur Verfügung stehenden Messzeit vereinbar, solange das Erreichen dieses Zustandes mehrere Stunden benötigt. Kinetische Untersuchungen, wie sie zum Beispiel in Abschnitt 4.4.1 gezeigt werden, können ohne Probenwechsel vollzogen werden und sind deshalb besser geeignet, um diese Problematik zu vermeiden. Weiter sollten Anstrengungen unternommen werden, um die beobachteten Etalons zu unterdrücken. In der Literatur können hierzu hauptsächlich Methoden für die Transmissionsspektroskopie gefunden werden.^[160-162] Auch numerische Methoden sind bekannt, welche jedoch aufgrund ihrer potentiellen Einflüsse auf die erhaltenen Ergebnisse mit Vorsicht zu benutzen sind.^[163] Für den hier beschriebenen Aufbau müsste der genaue Ursprung des Etalons ausfindig gemacht und bekannte Unterdrückungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit für diesen getestet werden. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Es wurde jedoch in weiteren Experimenten festgestellt, dass der Effekt in ATR-Konfiguration seltener und schwächer

auftritt. Dies wird auch in der Literatur beschrieben.^[161] Somit stellten sie für die meisten beschriebenen Messungen kein Problem dar.

Aufgrund der Erkenntnisse aus den Tests wurden einige Änderungen an der Strahlleitung des IR-Aufbaus vorgenommen. Die rotierbaren Adapterplatten wurden gegen eine feste Konstruktion ausgetauscht. Hierzu wurden runde Platten des Käfigsystems (Thorlabs, CP38) modifiziert, sodass die gekippten Spiegelhalter mit den Käfig-Stäben fixiert werden konnten. Mit dieser Modifikation wurde eine größere mechanische Stabilität, sowie ein besser reproduzierbarer Strahlengang erhofft. Zusätzlich wurde die Lochblende gegen einen Einsatz im Strahlengang getauscht, welcher den Strahldurchmesser fest auf $\varnothing$ 1 cm reduzierte. Somit sollten ungewollte Reflexionen an den Innenwänden des Tubus-Systems vermieden werden. Weiter wurden in Zusammenarbeit mit der feinmechanischen Werkstatt des PCI zwei Teleskop-Systeme, welche die $\varnothing$ 0,5"-Tuben zwischen dem ATR-Kristall und den Positionen S_2 beziehungsweise S_3 in Abbildung 4.1 ersetzen, und ein Kühlwasserverteiler mit selbstdichtenden Schnellkupplungen gefertigt. In Kombination sollten diese Modifikationen den Probenwechsel vereinfachen, welcher sich aufgrund der großen Zahl an festen Anschlüssen an der Flüssigkeitszelle bei ersten Experimenten als umständlich erwies.

4.4. Erweiterung des Messaufbaus für horizontale Probengeometrien um spektrale Ellipsometrie

Ziel des Projektes war es, neben ATR-FTIR und NR auch die simultane Datenaufnahme mit SE zu ermöglichen. Diese Messtechnik ermöglicht zusätzlich zu den bereits implementierten Techniken eine schnelle Bestimmung der Gesamtschichtdicke der Probe. Besonders für Prozesse auf kurzen Zeitskalen ist die überlegene zeitliche Auflösung der Ellipsometrie von Vorteil. Die Bestimmung der Brechungsindizes der Probe erlauben außerdem Rückschlüsse auf ihre chemische Zusammensetzung. Die von der Messung erhaltenen ellipsometrischen Winkel Δ und Ψ werden dabei anhand eines geeigneten Modells angepasst, wodurch Schichtdicke beziehungsweise Brechungsindizes erhalten werden. Jedoch ist dies gerade dann, wenn die Brechungsindizes der Probe und der umgebenden Bulk-Phase ähnlich sind, schwierig und die Modellierung wird weniger verlässlich. In diesem Fall ist es vorteilhaft, anhand anderer zur Verfügung stehenden Messmethoden, einige Parameter vorab zu bestimmen, welche dann während der Modellierung als fest angenommen werden.

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

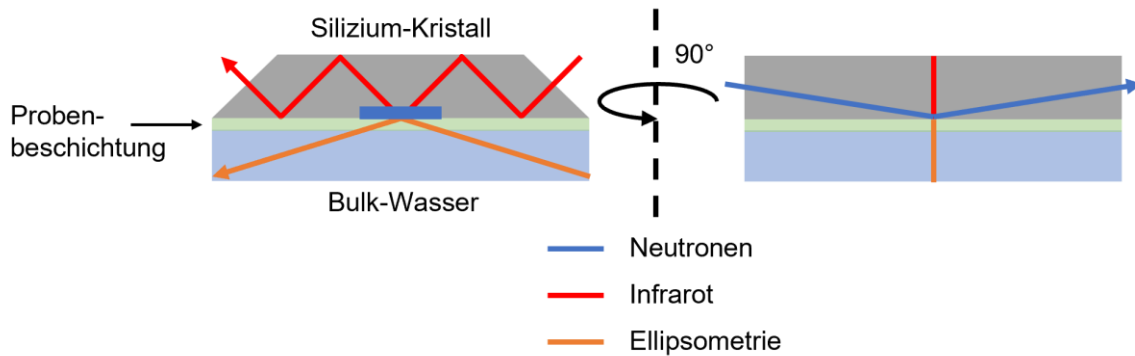


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung der Strahlengänge innerhalb des ATR-Kristalls. ATR-FTIR und SE teilen sich eine Einfallsebene, erreichen die beschichtete Oberfläche jedoch von unterschiedlichen Seiten des Kristalls. Die Einfallsebene des Neutronenstrahls ist orthogonal zu Einfallsebene der übrigen Messmethoden.

Die für die Entwicklung des kombinierten Systems benötigte Flüssigkeitszelle und einer geeigneten Halterung des Ellipsometers wurde von den schwedischen Projektpartnern übernommen (siehe Abbildung 4.11 A und B), während von deutscher Seite dafür Sorge getragen wurde, dass im Gesamtsystem genügend Platz hierfür zur Verfügung stand. Die Strahlführungen wurden dergestalt geplant, dass die Einfallsebene des für SE verwendeten Lichts gleich derer der IR-Strahlung ist, die Oberfläche des ATR-Kristalls jedoch von gegenüberliegenden Seiten erreicht. Die Einfallsebene der Neutronen ist dabei orthogonal zu derer der anderen Messmethoden (siehe Abbildung 4.10). Für den Aufbau wurde das spektrale Ellipsometer iSE (J. A. Woollam, Lincoln, USA) gewählt, welches in der Lage ist, die ellipsometrischen Winkel von 190 Wellenlängen zwischen 400 nm und 1000 nm mit einer zeitlichen Auflösung bis hin zu 0,3 s aufzunehmen. Es wird dafür über das Programm CompleteEASE (J. A. Woollam) angesteuert, welches auch für die Modellierung der erhaltenen Daten verwendet werden kann. Das Ellipsometer wurde für den kombinierten Aufbau an einer Halterung montiert, in welche die Flüssigkeitszelle mithilfe von Magnetplatten (Thorlabs, KB75/M) eingesetzt wurde (siehe Abbildung 4.11 A). Diese Konstruktion konnte daraufhin auf der Hebebühne der Probenhalterung befestigt werden (vergleiche Abbildung 2.4 A). Die Quarzglasfenster der Flüssigkeitszelle waren so installiert, dass der Einfallswinkel des polarisierten Lichts unter rechtem Winkel stattfindet, um den Einfluss der Fenster auf die Messungen zu minimieren, wobei der Winkel zum Lot der Si-Oberfläche 70° betrug. Das Befüllen und Leeren der Zelle erfolgte über $\varnothing 0,5$ mm Bohrungen, welche über UNF 1/4 – 28-Flansche mit einem externen Schlauchsystem verbunden werden konnten, wie es auch in Abschnitt 4.3.1 beschrieben ist.

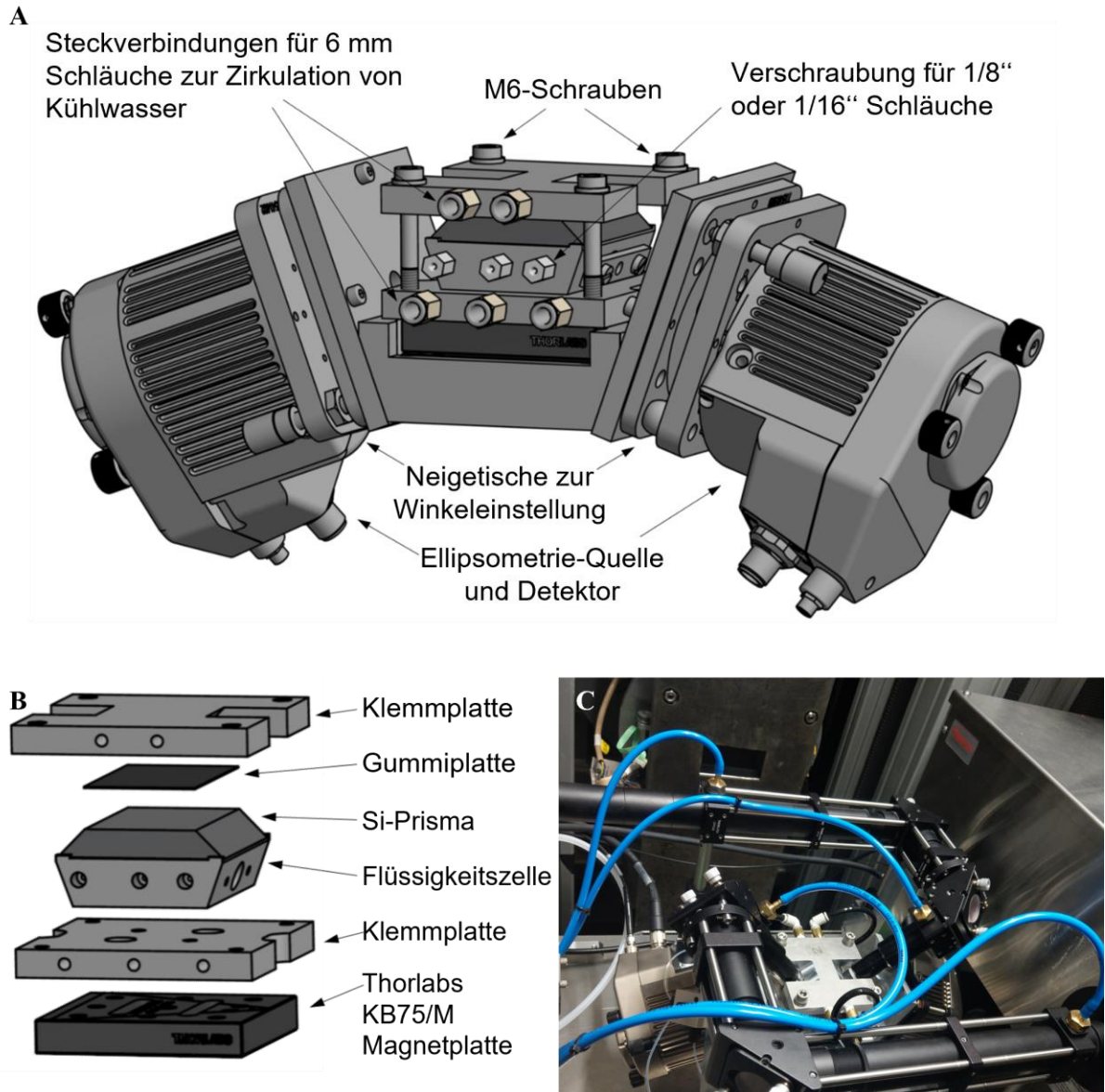


Abbildung 4.11: A Technische Zeichnung der SE-Einheit des kombinierten Messaufbaus mit eingebauter Flüssigkeitszelle. Reproduziert mit Genehmigung.^[16] B Explosionszeichnung der Flüssigkeitszelle, entwickelt von T. Ederth. Reproduziert mit Genehmigung.^[16] C Kombierter Messaufbau im Juni 2021 an FIGARO.

4.4.1. Kombinierte Messungen von NR, ATR-FTIR und SE an FIGARO

Mithilfe des kombinierten Messaufbaus fanden erste Experimente mit simultaner Messung von NR, ATR-FTIR und SE im Juni 2021 am FIGARO-Instrument des ILL statt. Ziel der Arbeitsgruppe Dahint war es, die Interaktion von DMPC-Oligobilagen mit im September 2019 synthetisierten AuNPs zu untersuchen. Die hier gezeigten Experimente wurden 2022 publiziert.^[16] Die Auswertung der NR- und SE-Messungen erfolgte durch Andreas Stöcklin.

Die Präparation der Oligobilagen und AuNP erfolgte wie in den Abschnitten 3.4.2, beziehungsweise 3.3.2 beschrieben. Die verwendete AuNP-Lösung in D₂O wurde wenige Tage vor den Experimenten

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

Tabelle 4.1: Durch Anpassung der NR-Profile von DMPC-Oligobilagen in Kontakt mit D₂O erhaltene Parameter. Die Werte der iSLD $i\rho_{lip}$ wurden zur Berücksichtigung off-spekularer Streuung genutzt, weshalb sie höher als in der Literatur beschriebene Werte liegen. Das genutzte Modell entspricht dabei der in Abbildung 4.6 Vorstellung des Aufbaus der Oligobilagen, jedoch ohne eingelagertes Chol. Reproduziert mit Genehmigung.^[16]

Parameter	18 °C	26 °C
$\chi^2 [10^2]$	1,02	81,1
N	15	16
$d_{w_1} [\text{\AA}]$	$8,58 \pm 0,07$	$14,31 \pm 0,06$
$d_{w_2} [\text{\AA}]$	$9,199 \pm 0,004$	$18,588 \pm 0,003$
$d_{w_3} [\text{\AA}]$	$17,71 \pm 0,04$	$27,73 \pm 0,03$
$d_{Kopf} [\text{\AA}]$	$12,7^{[34]}$	$9,7^{[34, 164]}$
$d_{SiO_x} [\text{\AA}]$	$19,0 \pm 0,2$	$19,0 \pm 0,3$
$d_{Kette} [\text{\AA}]$	$30,3^{[34]}$	$25,7^{[164]}$
$\rho_{Kopf} [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]$	$3,58 \pm 0,01$	$3,05 \pm 0,01$
$\rho_{Kette} [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]$	$-0,40^{[40]}$	$-0,40^{[40]}$
$i\rho_{lip} [10^{-8} \text{\AA}^{-2}]$	$5,22 \pm 0,08$	$5,34 \pm 0,08$
$\rho_w [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]$	$6,087 \pm 0,003$	$6,380 \pm 0,004$
$\sigma [\text{\AA}]$	8	8
$\phi_{w,lip} [\%]$	$22,66 \pm 0,07$	$2,20 \pm 0,08$
Fläche je Lipid [$\text{\AA}^2$]	$46,5^{[34]}$	$59,8^{[164]}$

aus dem vorhandenen Feststoff frisch angesetzt. Vorexperimente mit dynamischer Lichtstreuung an der Lösung zeigten eine Partikelgröße von (59 ± 10) nm, deutlich über den nach Synthese bestimmten $(4,1 \pm 1,2)$ nm (gemessen mit REM an hydrophoben AuNP). Die Proben wurden in die in Abschnitt 4.4 beschriebene Flüssigkeitszelle eingebaut, welche daraufhin mit D₂O befüllt und ein konstanter Durchfluss der Flüssigkeitsphase von 0,6 ml/min eingestellt wurde. Hierbei wurde besondere Vorsicht getroffen, um Luftblasen in der Flüssigkeitszelle zu vermeiden. Über einen externen Kryostaten wurden sowohl die Zelle als auch das Flüssigkeitsreservoir auf die gewünschte Temperatur eingestellt. Die Probe wurde vor der Messung mehrere Stunden ruhen gelassen. Es erfolgten zunächst Messungen der Probe unter D₂O, wodurch sichergestellt werden sollte, dass sie ihre Gleichgewichtsstruktur erreicht hatte. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µg/ml AuNP. Bei Proben, welche ausschließlich aus DMPC bestanden, zeigte sich eine sukzessive Zerstörung der Filme, wohingegen sich Mischungen von DMPC und Chol, wie sie auch in den in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Experimenten verwendet wurden, als stabil erwiesen. Der Verlust der Lipid-Oligobilagen ließ sich komplementär mit Hilfe der drei verwendeten Methoden belegen. Die Experimente an reinen DMPC-Filmen wurden bei verschiedenen Temperaturen unterhalb des Phasenübergangs von der gewellten Gel-Phase $P_{\beta'}$ in die flüssigkristalline Phase L_{α} , sowie einer Temperatur oberhalb des Phasenübergangs durchgeführt. Explizit wird hier auf

die Ergebnisse der Experimente mit DMPC-Oligobilagen bei 18 °C und 26 °C eingegangen, welche auch in der Publikation thematisiert wurden. Diese lagen deutlich unter- beziehungsweise oberhalb der Phasenübergangstemperatur von DMPC von $T_M = 23,6 \pm 1,4$ °C,^[165] welche im Vorfeld durch Messungen mit dynamischer Differenzkalorimetrie von Andreas Stöcklin bestätigt wurde.

Die Charakterisierung der Proben anhand der NR-Messungen unter D₂O zeigte die erwarteten Parameter für Schichtdicken und SLD der Lipide, welche in Tabelle 4.1 gezeigt sind. Nach Zugabe der AuNP zum Flüssigkeitsreservoir wurde die zeitliche Auflösung der NR-Messungen erhöht, indem ein kleinerer Q-Bereich betrachtet wurde und die Messzeiten auf 1 min reduziert wurden. Hiermit steigt jedoch auch der statistische Fehler der einzelnen Messpunkte deutlich an, was eine exakte Auswertung in Form von Anpassungen des NR-Profiles erschwert. Die Interaktion der AuNP mit der Probe äußerte sich in einer Abnahme der Bragg-Peak-Intensität, wobei deren Lage unverändert blieb. Abbildung 4.12 zeigt die NR-Profile der Messungen unter D₂O bei beiden Temperaturen sowie in der Ausschnittvergrößerung die zeitliche Änderung des Bragg-Peaks bei Interaktion mit den AuNP. Anstelle einer Anpassung der einzelnen Messungen wurde ausgehend von der Anpassung der Messung unter D₂O die Zerstörung der Proben anhand einer Reduktion der Bilagen im Modell, unter Beibehalt aller anderen Parameter, simuliert. Hierzu wurde zunächst die $N - 3$ inneren Bilagen sukzessive reduziert (vergleiche Abbildung 4.6 und Abbildung 3.8). Nachdem diese vollständig entfernt waren, wurden die restlichen Bilagen ausgehend von der am weitesten vom Substrat entfernten bis zur direkt an dieses adsorbierten schrittweise entfernt. Die Bragg-Peaks der so simulierten NR-Profile wurden mit Gauß-Funktionen angepasst, und aus deren Amplitude, aufgetragen gegen die Bilagenzahl, eine Kalibrationskurve erstellt. Durch Vergleich mit der Amplitude der Bragg-Peaks der Messungen konnte hieran die aktuelle Bilagenzahl der Probe bestimmt werden. Die erhaltenen Verläufe sind in Abbildung 4.14 dargestellt, wobei hier anhand der ursprünglich bestimmten Probenparameter und der erhaltenen Bilagenzahl die Gesamtschichtdicke der Probe bestimmt wurde.

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

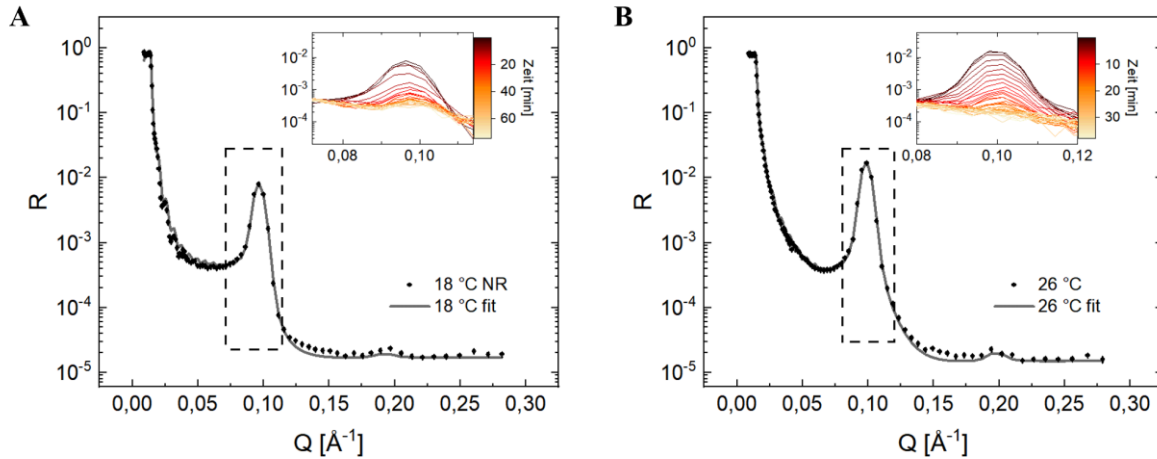


Abbildung 4.12: NR-Messdaten und Anpassungen von DMPC-Oligobilagen unter D_2O (schwarz), sowie Änderung der Bragg-Peaks bei Interaktion mit AuNP (Ausschnittvergrößerungen). Die in den Vergrößerungen dargestellten Bereiche sind mit gestrichelten Kästen markiert. Aufgrund der längeren Messung wurde bei der Darstellung bei 18 °C (A) ein zeitlicher Abstand der Profile von 3 min gewählt, wohingegen bei 26 °C (B) alle Profile aufgetragen sind. Je Messung der in den Vergrößerungen dargestellten Auftragungen wurde die Reflektivität über 1 min gemittelt. Reproduziert mit Genehmigung.^[16]

Die Untersuchung der Probe mit ATR-FTIR gewährt zusätzliche Informationen und kann gleichzeitig genutzt werden, um Annahmen bei der Auswertung der NR-Messungen zu bestätigen. Eine Abnahme der Bragg-Peakintensität kann neben dem vermuteten Verlust von Lipidbilagen auch durch einen Verlust der Ordnung in den Bilagen auftreten. Da IR-Spektroskopie jedoch unabhängig von der Ordnung des untersuchten Materials ist, wäre in diesem Fall keine Änderung der Absorptionsbanden zu erwarten. Um ein paralleles Auftreten beider Effekte auszuschließen kann weiter die zu erwartende Absorption der CH_2 -Valenzschwingungsbanden von DMPC anhand der aus NR bestimmten Parameter für verschiedene Bilagenzahlen berechnet werden. Die Herleitung der hierfür verwendeten Gleichungen ist in Abschnitt 3.7.1 beschrieben. Analog zur Auswertung der NR-Messungen kann so eine Kalibrationskurve erstellt werden, anhand derer aus der Bandenintensität der IR-Messungen auf die Bilagenzahl und somit auch auf die Gesamtdicke der Probe rückgeschlossen werden kann. Die CH_2 -Valenzschwingungsbanden der durch ATR-FTIR erhaltenen Spektren und deren zeitliche Änderung sind in Abbildung 4.13 A und B dargestellt. Es ist eine klare Abnahme der Bandenintensitäten zu erkennen. Wie an Abbildung 4.14 zu sehen ist, stimmen die erhaltenen Gesamtschichtdicken der Probe mit den aus der NR-Auswertung erhaltenen Ergebnissen überein. Somit ist anzunehmen, dass die Verluste der Bragg-Peaks in NR-Messungen nicht auf Ordnungsverluste zurückzuführen sind. Zusätzlich kann anhand der Lage der CH_2 -Valenzschwingungsbanden auf die Phase der Lipide rückgeschlossen werden (siehe Tabelle 4.2). Durch die Anpassung der Schwingungsbanden mit Lorentz-Peaks kann deren Position in den Messungen bestimmt werden, was Hinweise auf die Struktur der Lipide gibt. Der zeitliche Verlauf der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingungsbanden-Position ist in Abbildung 4.13 C dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Bande bei den Messungen in der $P_{\beta'}$ -Phase zu größeren Wellenzahlen wandert, wohingegen bei Messungen in der L_{α} -Phase eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen beobachtet wurde. Dies weist auf eine strukturelle Änderung der DMPC-

Tabelle 4.2: Lage der CH_2 -Valenzschwingungsbanden. Erhalten aus den IR-Spektren der Proben bei 18 °C ($P_{\beta'}$ -DMPC) und 26 °C (L_{α} -DMPC) unter D_2O .

	$\nu_{\text{CH}_2, \text{asy}} [\text{cm}^{-1}]$	$\nu_{\text{CH}_2, \text{sym}} [\text{cm}^{-1}]$
$P_{\beta'}$ -DMPC	2850	2918
L_{α} -DMPC	2851	2921

Kettengruppen innerhalb der Bilagen hin. Die asymmetrische Valenzschwingungsbande, dargestellt in Abbildung 4.13 D zeigt einen ähnlichen Verlauf.

Zusätzlich kann SE verwendet werden, um die Gesamtschichtdicke zu bestimmen. Hierzu wurden die Brechungsindizes des Lipid-Filmes, wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, mit einem Cauchy-Dispersions-Modell beschrieben.

Verglichen mit NR und ATR-FTIR liefert SE eine bedeutend bessere zeitliche Auflösung im Sekundenbereich. Für verlässliche Ergebnisse muss jedoch der Kontrast des Filmes zur umgebenden Flüssigkeit ausreichend groß sein, was gerade bei Untersuchungen an weicher Materie nicht selbstverständlich ist.^[166] Um die Verlässlichkeit zu verbessern, können jedoch Annahmen aufgrund komplementärer Messungen gemacht werden. Weiter sind Informationen zur inneren Struktur einer regelmäßig aufgebauten Probe mit SE nicht zugänglich, weshalb Änderungen der Dicke durch mehrere

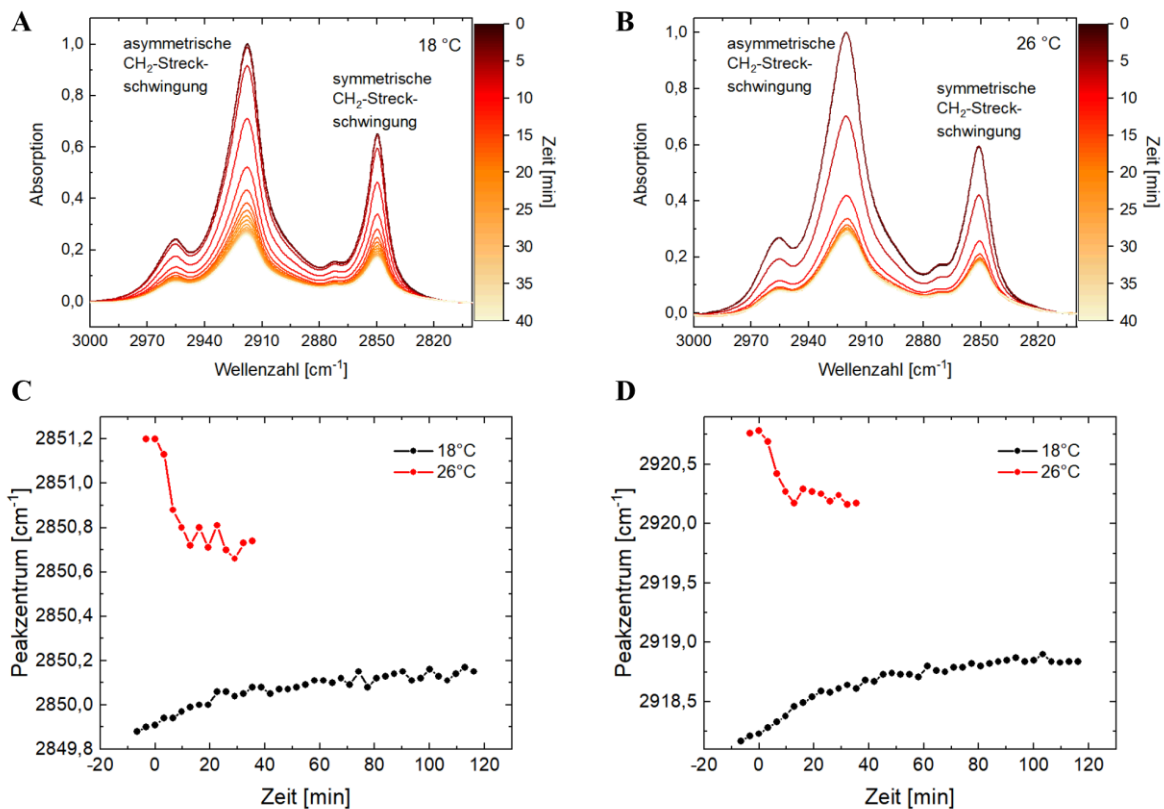


Abbildung 4.13: Änderung der CH_2 -Valenzschwingungsbanden bei Interaktion der DMPC-Filme mit AuNP bei 18 °C (A) und 26 °C (B). Für jede Messung wurden 512 Spektren bei einer Auflösung von 4 cm^{-1} gemittelt, was in einem Zeitbedarf von 3,23 min resultierte. C/D Verlauf der Position der symmetrischen (C) und asymmetrischen (D) CH_2 -Valenzschwingungsbande beider Messungen. Reproduziert mit Genehmigung^[16].

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

Umstände erklärt werden können. Eine Zunahme der erhaltenen Probendicke, kann zum Beispiel durch ein Quellen, aber auch durch Anlagerung von Fremdkörpern, welche die Brechungsindizes nicht relevant ändern, erklärt werden.

Für die hier diskutierten Messungen wurden zunächst die Brechungsindizes der Flüssigphase mithilfe eines unbeschichteten ATR-Kristalls in der mit D₂O befüllten Flüssigkeitszelle bestimmt. Die Cauchy-Parameter des Films wurden dann anhand der Messung unter D₂O erhalten und für nachfolgende Anpassungen als unverändert angenommen. Somit wurde eine Abnahme der Schichtdicke nach AuNP-Zugabe beobachtet, was in Übereinstimmung mit den aus den anderen Messmethoden erhaltenen Ergebnissen ist.

Die aus den drei Messmethoden bestimmten Gesamtdicken der Proben sind in Abbildung 4.14 dargestellt und zeigen einstimmend eine Zerstörung der DMPC-Oligobilagen durch die verwendeten AuNP. Um die Filmstabilität zu beurteilen, wurden die Zeiten Δt_{50} bestimmt, zu denen die Hälfte der Gesamtdicke verloren gegangen war. Zur Vergleichbarkeit wurden die drei Verläufe so verschoben, dass der Beginn des Filmverlusts bei $t = 0$ min stattfand. Hier zeigte sich, dass die Zerstörung oberhalb von T_M deutlich schneller vonstattenging, was als verringerte Stabilität der Probe in der L_α -Phase interpretiert werden kann. Bei Messungen an DMPC in der $P_{\beta'}$ -Phase zeigten die bestimmten Werte gute Übereinstimmung, in der L_α -Phase ergab SE jedoch eine deutlich geringere Stabilität als NR und ATR-FTIR. Weiter ist zu sehen, dass die Dicke im Gegensatz zu den anderen Methoden auf null abfällt, was ein vollständiges Abtragen des Filmes andeutet. Dies widerspricht jedoch insbesondere den Ergebnissen aus ATR-FTIR, da hier die Lipid-Schwingungsbanden auch zum Ende des Experiments noch nachgewiesen werden konnten. Als Grund für die Abweichung werden die ähnlichen Brechungsindizes von Probe und Flüssigphase und damit verbundene Unsicherheiten in der Schichtdickenbestimmung vermutet.

Das Ziel der Konstruktion eines kombinierten Messaufbaus für NR, ATR-FTIR und SE in horizontaler Probengeometrie war somit erreicht. Anhand der Pilotexperimente konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Methoden ähnliche Ergebnisse liefern und sich gleichzeitig ergänzen, womit

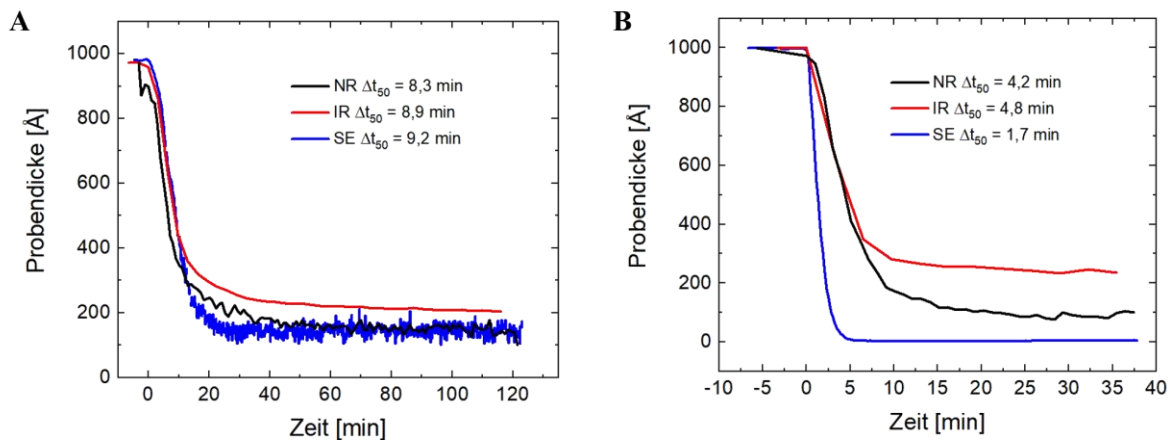


Abbildung 4.14: Verläufe der Probendicke nach den Auswertungen von NR, ATR-FTIR und SE bei 18 °C (A) und 26 °C (B). Die Zeiten Δt_{50} , bei der die Hälfte der Probendicke verloren war, ist in den Legenden eingetragen. Reproduziert mit Genehmigung.^[16]

Unsicherheiten bei der Auswertung der einzelnen Messungen ausgeglichen und Fehlinterpretationen vermieden werden können. So kann zum Beispiel die Struktur von Proben mithilfe von NR bestimmt werden, wobei grundlegende Annahmen anhand von ATR-FTIR getroffen werden können. Kinetische Messungen bei Änderungen der Probe können mit allen drei Methoden stattfinden, wobei jedoch die gerade bei schnellen Prozessen die zeitliche Auflösung von SE von Vorteil ist.

4.5. Kombierter Messaufbau für vertikale Probengeometrie und Tests an D17

Neben Reflektometern mit horizontaler Probengeometrie wie FIGARO, sind auch solche mit vertikaler Probengeometrie verbreitet. Je nach Beschaffenheit der Probe, beziehungsweise der genutzten Probenzelle, bieten beide Geometrien Vor- und Nachteile. Beispielsweise können offene Systeme unter Flüssigkeit aus offensichtlichen Gründen nicht in vertikaler Geometrie verwendet werden. Bei geschlossenen Systemen hingegen erlaubt ein solches Reflektometer jedoch ein Befüllen der Probenzellen, beziehungsweise den gesicherten Austausch der entsprechenden Flüssigkeiten, ohne dass die Zelle vom Probentisch genommen und gekippt werden müsste. Somit können etwaige Messfehler durch unterschiedliche Justage der Messungen vermieden werden. Außerdem würden Luftblasen, die zum Beispiel aufgrund des Entgasens der Flüssigphase in die Flüssigkeitszelle gelangen können in dieser von der Probenmitte zum Schlauch des Peristaltik-Systems aufsteigen und würden somit die Messungen weniger stark beeinflussen, als das bei horizontaler Probengeometrie der Fall wäre. Für ein entsprechendes Reflektometer, das am ILL befindliche Instrument D17, sollte ein weiterer kombinierter Messaufbau für NR, ATR-FTIR und SE konstruiert werden. Die Geometrie barg hierfür verglichen mit dem Aufbau für FIGARO zusätzliche Herausforderungen, da aufgrund des eingeschränkten Platzangebots die Strahlleitung des IR-Aufbaus nicht in einer Ebene realisiert werden konnte, ohne die Gefahr einer Kollision des Aufbaus mit dem Neutronen-Detektor beziehungsweise dem Neutronenleiter während der Messung in Kauf zu nehmen. Dies ist in Abbildung 4.15 A zu erkennen. Es wurde deshalb entschieden, das Spektrometer unterhalb und vor der Grundplatte der Probenaufnahme des Reflektometers zu platzieren, wohingegen der Detektor oberhalb und hinter der Probenzelle platziert wurde.

Die Planung des optischen Aufbaus erfolgte mit bei Thorlabs erhältlichen optomechanischen Komponenten und Spiegeln (vergleiche Abschnitt 4.3). Ähnlich wie im Aufbau für FIGARO konnte auch hier die Spülung der Strahlführung mit Trockengas über Spülgas-Adapter gewährleistet werden, wobei aufgrund des deutlich längeren Weges vor der Probe zwei zusätzliche Adapter verwendet wurden. Die Grundplatte des Aufbaus, sowie die Probenhalterung wurde in Zusammenarbeit mit der feinmechanischen Werkstatt des PCI entwickelt. Die Befestigung der optomechanischen Komponenten erfolgte durch Klemmverbinder (Thorlabs, CPMA4/M), welche über Universal-Pfostenhalter (Thorlabs, UPH30/M) mit der Grundplatte verbunden wurden. Dies ermöglicht einen flexiblen Aufbau vor Ort. Für die Befestigung der Flüssigkeitszelle wurde eine Halterung gefertigt, bei der eine Einstellung der Höhe durch eine Verschraubung an Leichtbauprofilen aus Aluminium erfolgte. Diese wiederum wurden über eine Platte mit Langlöchern an der Grundplatte befestigt, worüber eine seitliche Translation der Probe ermöglicht wurde. Eine eingebaute Hebebühne sorgte für die Justage in der dritten Raumrichtung. Eine

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

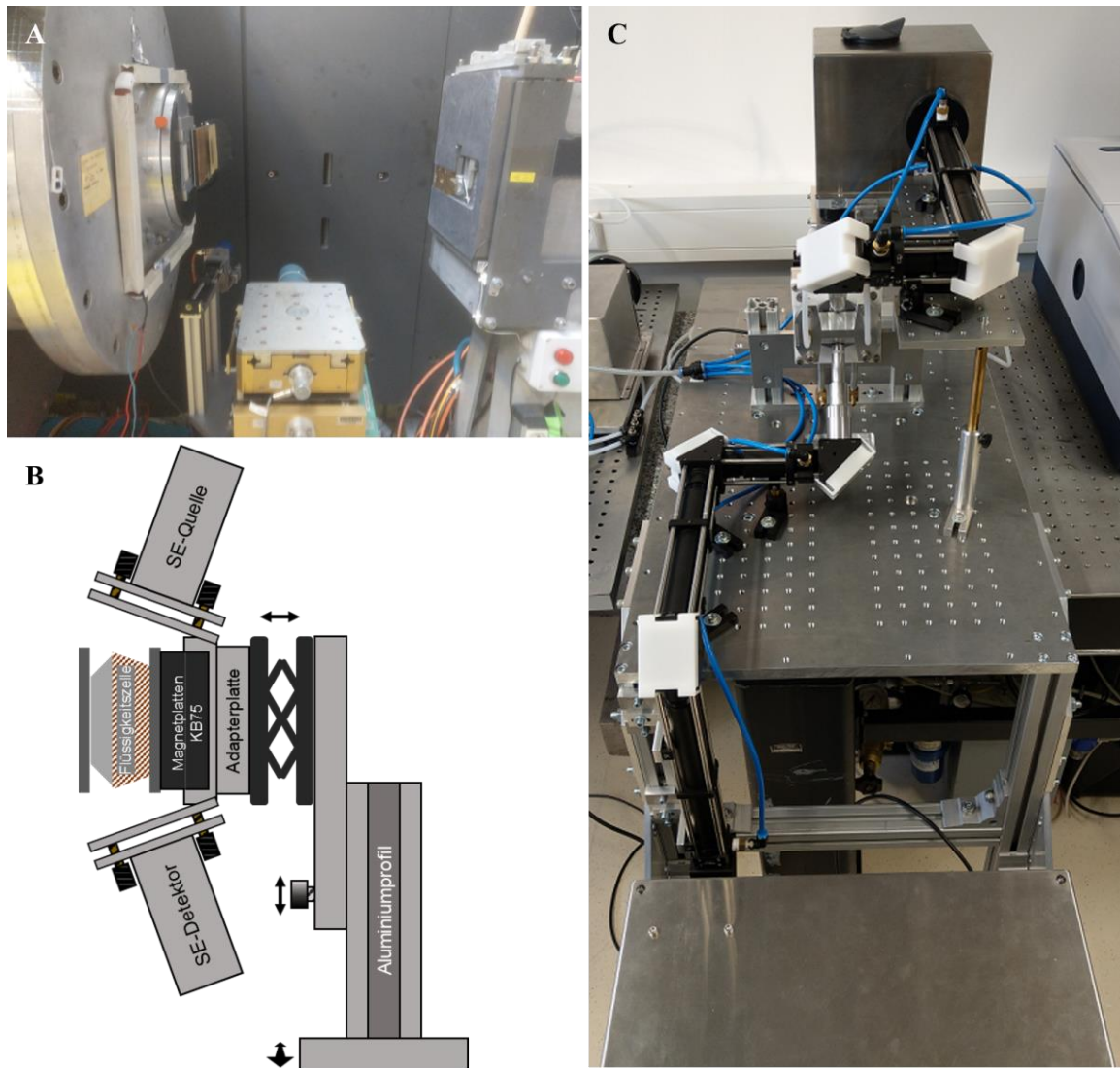


Abbildung 4.15: **A** Neutronenreflektometer D17. Der Probenhalter befindet sich mittig zwischen dem Neutronen-Detektor (links) und dem Neutronenleiter (rechts), welche etwa 53 cm voneinander entfernt sind. **B** Skizze der Probenhalterung für vertikale Probengeometrie. **C** Kombiniertes Messaufbau für D17 ohne SE in den Laboren der Arbeitsgruppe Dahint.

Skizze der Probenhalterung ist in Abbildung 4.15 B zu sehen, und der fertige Aufbau ohne SE in den Laboren der Arbeitsgruppe Dahint in Abbildung 4.15 C.

Erste Tests mit ATR-FTIR zeigten, dass am MCT-Detektor des IR-Aufbaus in etwa die halbe Intensität verglichen mit dem Aufbau für FIGARO erreicht wurde. Dies verringert die Empfindlichkeit der Messungen und fordert eine größere Zahl gemittelter Spektren, um rauscharme Spektren zu erhalten. Somit ist die zeitliche Auflösung unter Umständen geringer als dies beim Aufbau mit horizontaler Probengeometrie möglich ist. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente erwies sich dies jedoch als nicht problematisch.

Der Aufbau wurde im Juni 2021 anhand von Experimenten der Arbeitsgruppe Ederth getestet. Hierbei stellte sich heraus, dass das hohe Gewicht des Ellipsometers ein seitliches Drehmoment auf die Hebebühne ausübte und diese verbog. Hierdurch wurde die Justage des IR-Strahlengangs stark beeinträchtigt. Aufgrund sehr guter Reproduzierbarkeit der Probenposition durch die Magnetplatten

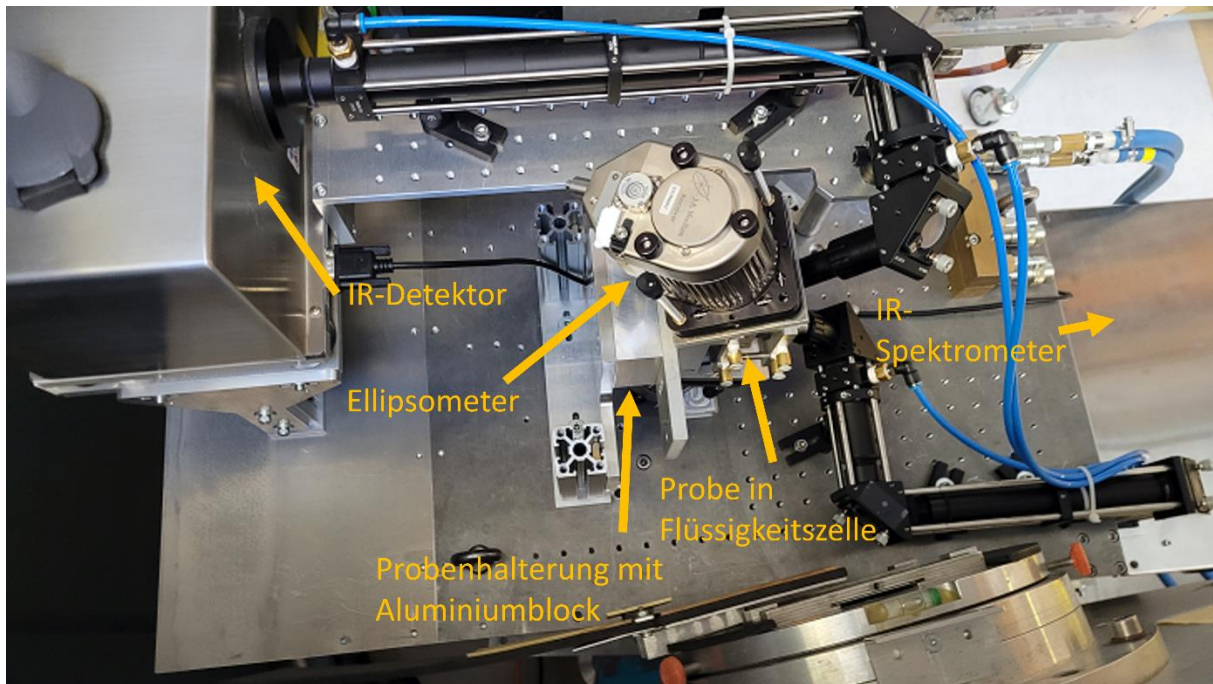


Abbildung 4.16: Aufsicht des kombinierten Messaufbaus an D17. Die Hebebühne zur Justage der Probenhöhe wurde durch einen Aluminiumblock ersetzt, welcher hier mittig zu sehen ist.

konnte die Hebebühne jedoch durch einen Aluminiumblock ersetzt werden, wodurch die Stabilität der Probenhalterung bedeutend verbessert wurde. Der so modifizierte Aufbau ist in Abbildung 2.4 zu sehen.

4.5.1. Kombinierte Messungen von NR, ATR-FTIR und SE an D17

Erste Pilotexperimente der Arbeitsgruppe Dahint fanden im September 2021 statt. Hierbei sollte die Interaktion von AuNP mit integralen und peripheren Membranproteinen untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der vorliegenden Arbeit im Kapitel 7 ausführlich thematisiert. An dieser Stelle werden die Untersuchungen an einer Probe kurz beschrieben, um die Eignung des kombinierten Messaufbaus für Experimente dieser Art zu demonstrieren.

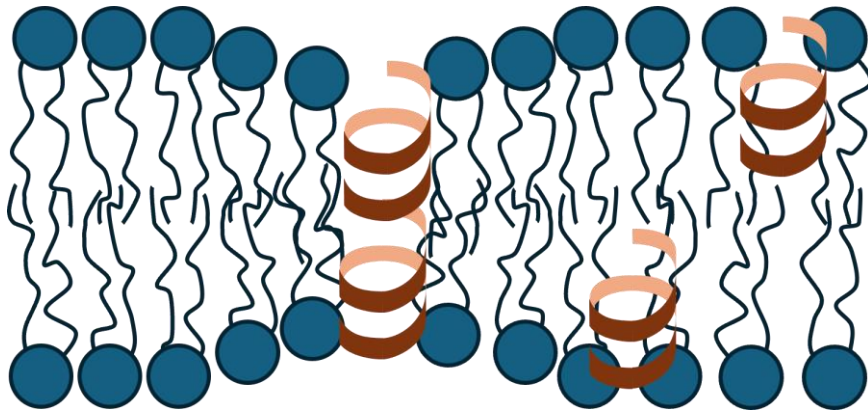


Abbildung 4.17: Skizze der strukturellen Änderung einer Lipid-Bilage durch die Einlagerung von Gramicidin. Das Protein ist aufgrund der hydrophoben Seitenketten am Äußeren der Helix in den Kettengruppen eingebettet, das hydrophile Peptidrückgrat befindet sich im Inneren. Durch Dimerisierung an den N-Termini der Proteine können Ionenkanäle ausgebildet werden, wobei aufgrund der kürzeren Länge des Dimers verglichen mit dem hydrophoben Lipid-Kettenbereich eine Verformung der Bilage stattfindet (links). Auch die Einlagerung ohne Dimerisierung ist möglich (rechts).^[103]

Es wurden zwei Ansätze von AuNP verwendet. Bei den als „2 nm AuNP“ beschriebenen NPs handelt es sich um solche, welche aus einer kommerziell erhältlichen Lösung von Octanthiol-geschützten AuNP mit einer vom Hersteller angegebenen Größe von 2 – 4 nm und gekauften *N,N,N*-trimethyl-(11-mercaptoundecyl)ammoniumbromid (MABr) nach der in 3.3.1 beschriebenen Methode hergestellt wurden. Untersuchungen mit REM zeigten für die so erhaltenen NPs einen Durchmesser von $(3,3 \pm 0,5)$ nm. Die als „50 nm AuNP“ bezeichneten NPs entsprachen denjenigen, die auch in den in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Experimenten verwendet wurden.

Für die beschriebenen Untersuchung wurde das integrale Membranprotein GramD verwendet. Dieses zeigt eine helikale Sekundärstruktur, wobei die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren am Äußeren der Helix positioniert sind. Somit lagert es im Kettenbereich der Bilage ein. Bei räumlicher Nähe zweier Gramicidine in gegenüberliegenden Monolagen kann es zur Dimerisierung an den N-Termini der Proteine kommen, wodurch die Bilagenstruktur verzerrt wird (siehe Abbildung 4.17). Ein solches Gramicidin-Dimer kann als Ionenkanal für monovalente Kationen über eine Lipid-Membran wirken, was das Gleichgewicht der Ionenkonzentrationen im Inneren einer Zelle stören kann und somit eine zytotoxische Wirkung hat.^[103, 167]

Die Präparation der proteinhaltigen Proben erfolgte über Rotationsbeschichtung wie im Abschnitt 3.4.2 beschrieben. Zum Ansetzen der zur Beschichtung verwendeten Lösung wurde eine gesamte Stoffmengenkonzentration von $14,8 \mu\text{mol/ml}$ verwendet, was einer 10 mg/ml DMPC-Lösung entspricht. Somit sollte eine bessere Vergleichbarkeit zu vorherigen Messungen ohne Proteine erreicht werden. Als Verhältnis von Protein zu Lipiden wurde 1:9 gewählt, wobei der Lipid-Anteil zu 20% aus Chol und zu 80% aus DMPC bestand. Somit wurde in einem typischen Ansatz von 5 mL Lösung $7,4 \mu\text{mol}$ (10%) GramD, $13,32 \mu\text{mol}$ (18%) Chol und $53,28 \mu\text{mol}$ (72%) DMPC eingewogen.

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

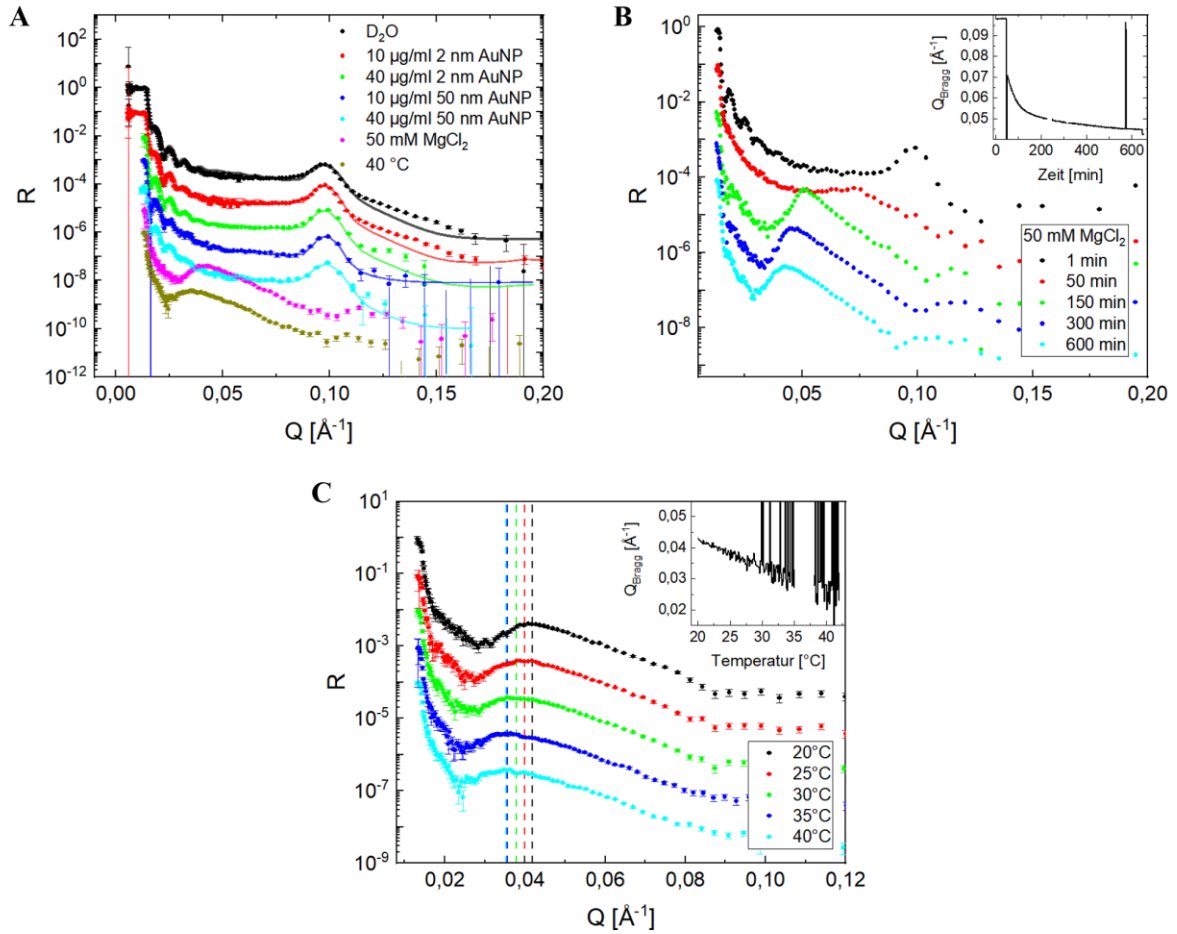


Abbildung 4.18: NR-Profil der Probe aus 10% GramD und 90% Lipidgemisch (4: 1 DMPC/Chol). **A** Erhaltene Profile und beste Anpassungen. Für Messungen unter 50 mM MgCl_2 konnten keine guten Anpassungen erhalten werden. Bei Zugabe von MgCl_2 (**B**) und Temperaturerhöhung (**C**) wurden kontinuierliche Verschiebungen des Bragg-Peaks zu kleineren Streuvektoren beobachtet, was einem Quellprozess aufgrund des Wachstums der mittleren Bilagenabstände entspricht. Es wurden ausgewählte Reflexionsprofile aufgetragen, die Einsätze zeigen die Lage des Bragg-Peaks in Abhängigkeit der Zeit, beziehungsweise Temperatur, welche nach Gauß-Anpassungen aller Reflexionsprofile erhalten wurden. Aufgrund der kleinen Unterschiede wurde die Lage des Maximums in **C** durch gestrichelte Linien markiert.

Zur Anpassung der erhaltenen NR-Profile aus Abbildung 4.18 wurde die SLD der Kettengruppen unter der Annahme einer idealen Mischung der Filmbestandteile berechnet, während die Dicken der einzelnen Lagen unbekannt waren und somit angepasst werden mussten. Es wurde ein Modell verwendet, in dem die Probe über eine Summe von zwei Lipid-Oligobilagen unterschiedlicher Lagenzahl dargestellt wird. Beide Stapel waren dabei gleich gewichtet. Somit wird davon ausgegangen, dass die Probe Domänen unterschiedlicher Dicke zeigte, die in ihrer Ausdehnung groß genug waren, dass sie bei Reflexion nicht mehr als gemittelt Gesamtsystem zu betrachten sind. Dies ist der Fall, wenn die Ausdehnung dieser Domänen größer ist als die Kohärenzlänge des Reflektometers, das heißt der Distanz, auf der ein reflektiertes Neutron kohärent mit sich selbst interferieren kann.^[18] Wäre die Ausdehnung der Domäne kleiner, so wäre eine gemittelte Probendicke zu beobachten.^[168] Für das Instrument D17 beträgt die Kohärenzlänge etwa 70 μm .^[169] Das verwendete Modell und die erhaltenen Ergebnisse sind in Abschnitt 6.1.2 noch einmal detailliert beschrieben. Genauere Überlegungen zur Verwendung eines inkohärenten

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

Modells zur Anpassung von NR-Profilen können der Dissertation von Andreas Stöcklin entnommen werden.^[156] Die Verwendung des beschriebenen Modells mit einer Kombination aus zwölf und dreizehn Bilagen lieferte zufriedenstellende Anpassungen der Reflexionsprofile. Nach Zugabe der AuNP waren nur vernachlässigbar kleine Änderungen dieser zu beobachten. Durch Zugabe von MgCl_2 wurden starke Änderungen der Probe in Form eines Quellprozesses beobachtet, der sich in einer Verschiebung des Bragg-Peaks zu niedrigen Streuvektoren äußerte. Es konnte jedoch kein Modell gefunden werden, welches die strukturellen Änderungen gut beschreibt. Anhand der Lage des Bragg-Peaks ist es jedoch möglich, die Gesamtschichtdicke unter der Annahme, dass keine Bilagen verloren gegangen sind, abzuschätzen. Hierfür wurde der Bragg-Peak mithilfe einer Gauß-Funktion angepasst. Die erhaltenen Werte zeigen eine Verschiebung zu kleineren Streuvektoren nach 50 min, wobei in den NR-Profilen der Bragg-Peak für einige Messpunkte sehr schwach und breit war. Nach einigen Minuten war er wieder besser definiert und die Änderung der Position zeigte ein asymptotisches Verhalten. Der Kurvenverlauf in Abbildung 4.18 B lässt vermuten, dass zum Ende der Messreihe nach über 10 h das strukturelle Gleichgewicht noch nicht erreicht war, was zum Zeitpunkt des Experiments nicht eingeschätzt werden konnte. Eine anschließende Erhöhung der Temperatur zeigte eine weitere kontinuierliche Verschiebung des Bragg-Peaks zu kleineren Streuvektoren (Abbildung 4.18 C).

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

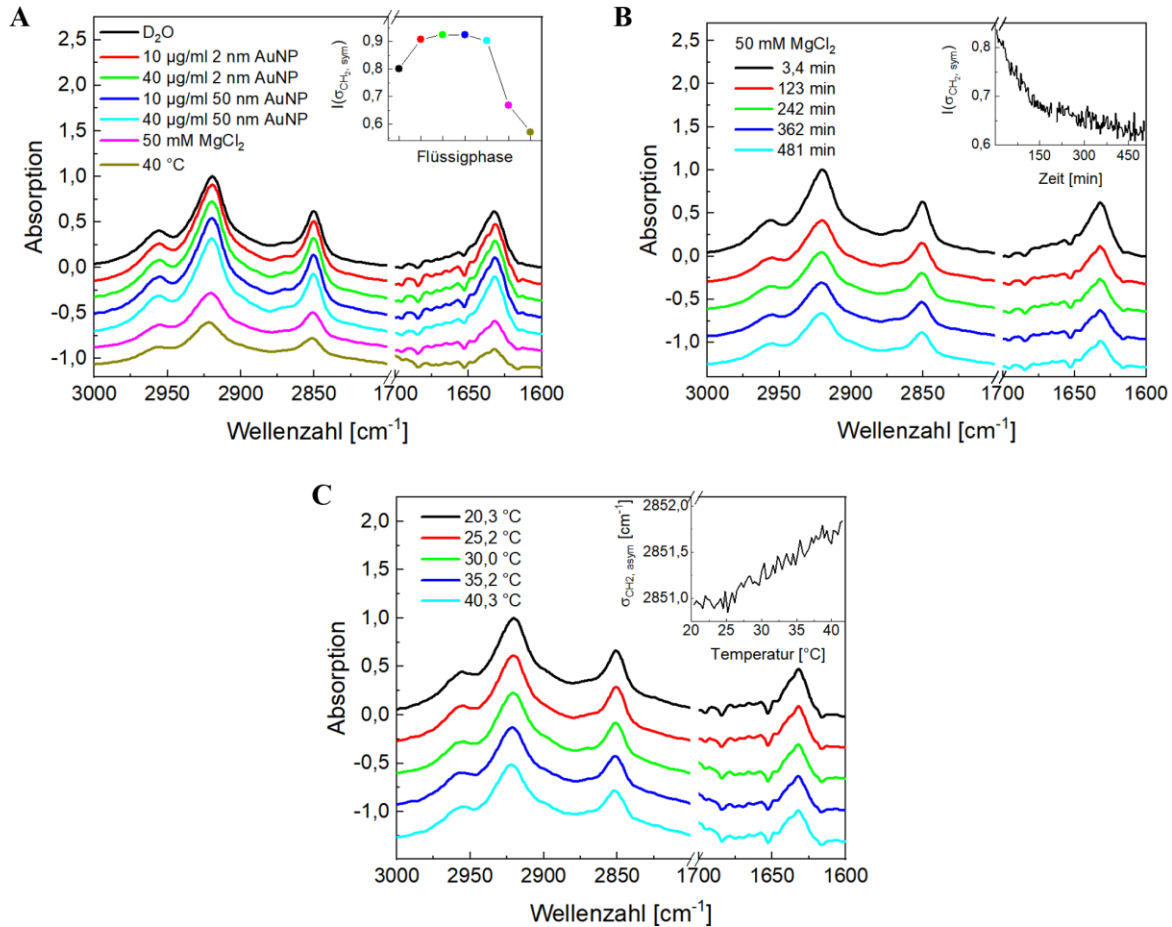


Abbildung 4.19: IR-Absorptionsspektren der Probe aus 10% GramD und 90% Lipidgemisch (4 : 1 DMPC/Chol). **A** Übersicht der IR-Absorptionsspektren aller untersuchten Flüssigphasen. Der Einzug zeigt die die Intensität der jeweiligen symmetrischen CH₂-Valenzschwingung. **B** Änderung der IR-Absorptionsspektren bei Zugabe von MgCl₂. Der Einzug zeigt den Verlauf der symmetrischen CH₂-Bandenintensität. **C** Änderung der IR-Absorptionsspektren bei Temperaturvariation. Der Einzug zeigt die Lage der symmetrischen CH₂-Bande.

In simultanen Messungen mit ATR-FTIR konnte die Präsenz des Proteins anhand der Amid-I-Bande bei 1632 cm⁻¹ nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.19 A). Deren Form ist beeinflusst durch die Sekundärstruktur des Proteins und kann prinzipiell zur Identifizierung derer genutzt werden. Aufgrund der zusätzlich vorhandenen H₂O-Rotationsbanden ist dies in den aufgenommenen Spektren jedoch nicht möglich. Bei Zugabe der AuNP wurde ein leichter Anstieg der symmetrischen CH₂-Bandenintensität beobachtet (siehe Abbildung 4.19 B). Da anhand der zugehörigen NR-Profile ein Schrumpfen der Bilagenabstände ausgeschlossen werden kann, könnte dies ein Hinweis auf eingelagerte AuNP sein. Jedoch sind keine anderen Änderungen der Spektren zu erkennen, die die Präsenz der Partikel und deren Einfluss auf die verwendete Probe belegen könnten. Insbesondere eine Änderung der Amid-I-Bandenstruktur kann nicht erkannt werden, was zeigt, dass die Sekundärstruktur des Proteins erhalten bleibt. Bei der anschließenden Temperaturvariation wurde beobachtet, dass die CH₂-Absorptionsbanden zu höheren Wellenzahlen verschoben wurden. Es wurde jedoch keine eindeutige Phasenübergangstemperatur, sondern ein kontinuierlicher Verlauf beobachtet. Dies zeigt, dass zwar eine Änderung der Bilagenstruktur stattfindet, jedoch kein scharfer Phasenübergang. Somit zeigt das System einen deutlichen Unterschied zu reinen DMPC-Proben (siehe Abschnitt 5.2.1). Ein ähnliches Verhalten

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

wurde jedoch von Redondo-Morata *et al.* für DPPC/Chol Mischfilme beobachtet. Untersuchungen mit Differenzkalorimetrie und Raster-Kraft-Mikroskopie zeigten ein Aufweichen der Phasenübergangstemperatur ab einem Chol-Gehalt von 20% und ein vollkommenes Verschwinden des Phasenübergangs ab 40%.^[170] Das beobachtete Verhalten der hier beschriebenen Proben kann somit nicht eindeutig von dem proteinfreier Mischfilme abgegrenzt werden. Ebenso konnte hier keine Änderung der Protein-Sekundärstruktur festgestellt werden.

Parallel zu den Messungen mit NR und ATR-FTIR wurde die Probe mithilfe von SE untersucht. Zuvor wurde ein ATR-Kristall gegen D₂O vermessen, womit mithilfe bekannter Brechungsindizes $n(\lambda)$ und Extinktionskoeffizienten $k(\lambda)$ des Substrats die Brechungsindizes der Flüssigphase bestimmt werden konnten, um diese für nachfolgende Messungen zu verwenden. Für diese wiederum wurde die Gesamtdicke der Proben mithilfe eines Cauchy-Modells bestimmt. Gerade schnelle Prozesse sollten mit SE aufgrund der hohen Zeitauflösung bedeutend besser sichtbar sein als mit den komplementär verwendeten Messmethoden. Jedoch traten unerwartete Schwierigkeiten bei den Messungen auf. Insbesondere bei starker Änderung der Probenstruktur, wie sie bei der Quellung durch Zugabe von MgCl₂ zu beobachten war, war eine Anpassung der ellipsometrischen Winkel kaum mehr möglich. Da

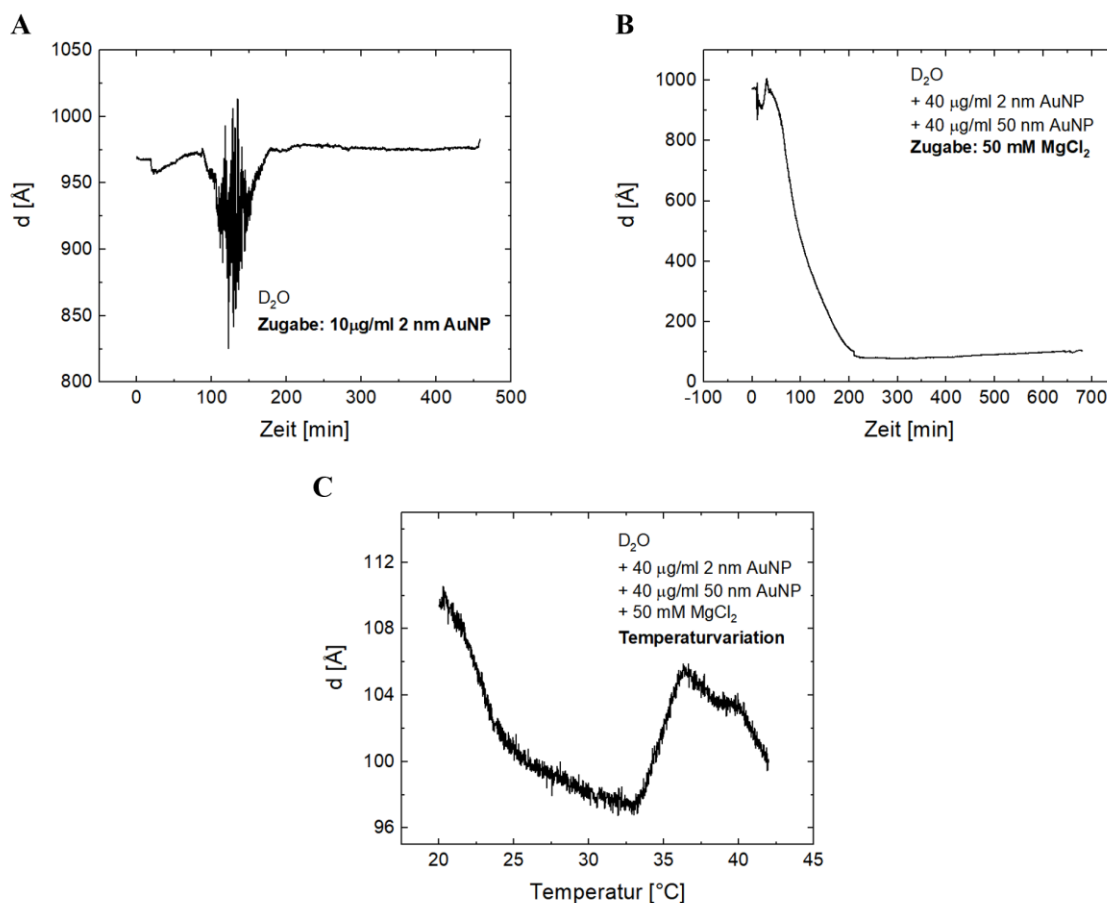


Abbildung 4.20: Nach Modellierung von SE-Messungen erhaltene Schichtdicken der Probe aus 10% GramD und 90% Lipidgemisch (4:1 DMPC/Chol). Die Änderung des Systems zum vorherigen Zustand ist jeweils durch fette Schrift markiert. **A** Verlauf der Schichtdicke bei Zugabe von 10 µg/ml 2 nm AuNP. **B** Verlauf der Schichtdicke bei Zugabe von 50 mM MgCl₂. **C** Verlauf der Schichtdicke bei Erhöhung der Proben temperatur.

das Quellen der Probe aufgrund größer werdender Wasserzwischenlagen verursacht wird, nähern sich die Cauchy-Parameter der gesamten Probe allmählich denen der Flüssigphase an. Somit sinkt der Kontrast, was das Bestimmen der ellipsometrischen Winkel und damit eine verlässliche Anpassung erschwert.

Für die Anpassung der Probe vor Zugabe von AuNP wurde die Schichtdicke $d \approx 970 \text{ \AA}$ mithilfe der NR-Messung bestimmt und im SE-Modell festgesetzt. Die Messungen starteten mit Zugabe von $10 \text{ \mu g/ml}$ der 2 nm AuNP. Zu Beginn wurde eine konstante Schichtdicke bestimmt (siehe Abbildung 4.20 A). Nach etwa 20 min wurde ein Einbruch der Schichtdicke um etwa $10 \text{ \AA}$ beobachtet, woraufhin sich diese in der folgenden Stunde langsam wieder erhöhte bis zu einem Wert von ungefähr $975 \text{ \AA}$. Der zeitliche Eintritt dieses Verhaltens lässt vermuten, dass dieses durch erste Interaktionen mit den AuNP und anschließender Equilibrierung des Gesamtsystems herbeigeführt wurde. Im Zeitraum von 90 – 160 min nach Beginn der Messungen konnten die ellipsometrischen Winkel nicht zufriedenstellend angepasst werden, was in einer nicht aussagekräftigen Auftragung der erhaltenen Probendicke resultierte. Es wird angenommen, dass es in diesem Zeitraum zu Verwirbelungen im Probenraum kaum, wodurch die Intensität des reflektierten Lichts stark abnahm. Nach diesem Zeitraum wurde eine Schichtdicke von etwa $950 \text{ \AA}$ gemessen, welche sich innerhalb von 20 min wieder auf den vor der Störung gemessenen Wert erhöhte, welcher bis zum Ende der Messungen weitgehend konstant blieb. Somit hatte die Zugabe der AuNPs eine Quellung um $5 \text{ \AA}$ zur Folge.

Eine weitere Erhöhung der AuNP-Konzentration, sowie die Zugabe anderer NPs konnte aufgrund eines technischen Fehlers nicht ausgewertet werden, da die gespeicherten Dateien zum Zeitpunkt der Auswertungen keine Messdaten zeigten. Die weitere Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Unterstützung von Andreas Stöcklin.

Um die Änderungen aufgrund der Zugabe von MgCl_2 zu evaluieren, wurden die aus dem NR-Profil der zuletzt gemessenen Probenumgebung von $10 \text{ \mu g/ml}$ 2 nm AuNP erhaltenen Parameter verwendet. Zwar entspricht dieser Zustand nicht der Umgebung zum Start der Messung, jedoch zeigten die Komplementärmessungen mit NR und ATR-FTIR kaum Änderungen durch die dazwischenliegenden Schritte, sodass der Einfluss auf die Parameter des zur Anpassung der ellipsometrischen Winkel verwendeten Modells als gering angenommen wurde. Die erhaltenen Schichtdicken sind in Abbildung 4.20 B dargestellt. Kurz nach Beginn der Messung wurde ein Einbruch der Probendicke beobachtet, welche sich jedoch schnell erholte. Dies ist wahrscheinlich auf die Störung des Systems durch die eine zunächst hohe Konzentration der MgCl_2 -Lösung zurückzuführen. Ein vollständige Durchmischung der Flüssigphase ist erst nach 15 min zu erwarten.^[16] Nach etwa 30 min wurde ein kontinuierlicher Verlust der Probendicke beobachtet, welche im Zeitraum von etwa 3 h auf $d \approx 90 \text{ \AA}$ fiel. Anschließend konnte ein schwacher Anstieg der Probendicke über die folgenden Stunden beobachtet werden. Dies steht im Widerspruch zu den Komplementärmessungen, da die geringe Probendicke darauf hindeutet, dass das diese nur noch aus einer Bilage besteht. Hierbei wären jedoch deutlich schwächere Signale in den NR-, als auch ATR-FTIR-Messungen zu erwarten gewesen. Zwar war bei diesen Methoden eine quantitative Aussage zu den verbleibenden Lipid-Bilagen nicht möglich, eine einzelne auf das Substrat adsorbierte Bilage würde jedoch nur nicht ein NR-Profil zeigen, wie es in Abbildung 4.18 C zu sehen ist. Diese spricht vielmehr für einige wenige verbliebene Bilagen bei unterschiedlich stark gequollenen Wasserzwichenschichten. Aufgrund der Lage des Peaks wäre ein durchschnittlicher Bilagenabstand

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

von ungefähr $110 \text{ \AA}$ zu erwarten. Ebenso wäre in den ATR-FTIR-Spektren eine Reduktion der Bandenintensitäten auf etwa 35% ihres Ursprungswertes zu erwarten gewesen (Wert nach der in Abschnitt 3.7.2 beschriebenen Methode und den aus der Anpassung des NR-Profiles der Messung vor Zugabe von MgCl_2 berechnet), wohingegen in Abbildung 4.19 B eine Reduktion auf etwa 60% zu sehen war, was für mindestens zwei verbleibende Bilagen auf dem Substrat spricht. Eine Interpretation der erhaltenen Ergebnisse gestaltet sich deshalb schwierig. Es wäre denkbar, dass sie auf Probleme bei der Simulation der ellipsometrischen Winkel zurückzuführen sind. Bei Serienmessungen werden angepassten Parameter sequenziell initialisiert, das heißt es werden die erhaltenen Parameter der jeweils vorherigen Messung als Ausgangspunkt verwendet. Da davon auszugehen ist, dass sich diese in der kurzen Zeit, die für eine Messung nötig ist, nicht dramatisch ändern, ist dies ein sinnvoller Ansatz, um den Rechenaufwand gering zu halten. Es ist jedoch möglich, dass somit physikalisch nicht sinnvolle Ergebnisse erhalten werden, von denen die nachfolgenden Messpunkte nicht mehr allzu stark abweichen werden. Die gesamte Auswertung ist somit ab diesem Punkt nicht mehr aussagekräftig. Um dies zu vermeiden, können in der Software sinnvolle Parametergrenzen eingegeben werden. Bei starken Probeänderungen, wie dem Quellen der Oligobilagen durch die Präsenz von MgCl_2 , ist dies jedoch schwierig, da hier auch eine mit einer erheblichen Änderung der angepassten Parameter zu rechnen ist. Ein Ansatz ist, die Ergebnisse komplementärer Messungen, wie zum Beispiel die Gesamtschichtdicke nach den erhaltenen NR-Profilen, zu verwenden. Hiermit können die Parameter unter Umständen sinnvoll eingegrenzt werden. Im hier beschriebenen Experiment war dies jedoch nicht erfolgreich. Die Auswertung der kinetischen SE-Messung beim Quellen der Probe mit MgCl_2 ist somit nicht belastbar.

Auch die Messung der Probe mit SE bei Temperaturvarianz gestaltete sich schwierig. Hierbei wurde bereits beim ersten Messpunkt eine Schichtdicke von $d \approx 110 \text{ \AA}$ erhalten (siehe Abbildung 4.20 C), wohingegen wie bei der vorangegangenen Messreihe bereits anhand der NR- und ATR-FTIR-Messung auf mehrere verbliebene Bilagen bei starken Quellprozessen geschlossen wurde, was einen mindestens doppelt so großen Wert ergeben müsste. Auch der weitere Verlauf der SE-Messung unterscheidet sich erheblich von den Ergebnissen von NR und ATR-FTIR. Während diese eine kontinuierliche Zunahme der Gesamtschichtdicke vermuten lassen, zeigen die erhaltenen Schichtdicken der SE-Messung ein nicht-monotones Verhalten. Bis zu $T = 34 \text{ °C}$ wurde eine Abnahme der Schichtdicke beobachtet, anschließend nahm diese wieder zu. Die Änderung betrug jedoch nur wenige Ångström. Eine zusätzliche Schwierigkeit bei der Anpassung der Messungen unter Temperaturvariation ist die Temperaturabhängigkeit der Brechungsindizes von Probe und Medium. Während bei vorherigen Messungen nur die Cauchy-Parameter der Probe angepasst werden mussten, müssten für eine vollständige Analyse hier auch Parameter der Flüssigphase angepasst werden, eine erhebliche Vergrößerung des Parameterraums. Versuche, dies bei der Analyse zu berücksichtigen führten jedoch zu keiner Verbesserung der erhaltenen Ergebnisse.

Die erhaltenen Ergebnisse des Pilotexperiments mit SE sind bei Vergleich mit den komplementären NR- und ATR-FTIR-Messungen wenig belastbar (siehe Abbildung 4.18 und Abbildung 4.19). Es ist anzunehmen, dass dies auf den geringen Kontrast der verwendeten Probe mit der Flüssigphase zurückzuführen ist. Das verwendete Modell nimmt eine homogene Probenschicht an. Durch die Quellung besteht diese mit zunehmendem Anteil aus der Flüssigphase, wodurch der Kontrast dementsprechend sinkt.

4.5.2. Kompatibilität des Aufbaus zu anderen Reflektometern

Neutronenreflektometer sind spezialisierte Messinstrumente, weshalb bestimmte Reflektometer für die Untersuchung einiger Proben besser geeignet sind als andere. Um eine möglichst große Flexibilität für die Anwender zu bieten ist es daher sinnvoll, die für die vorliegende Arbeit konstruierten Aufbauten auch an anderen Instrumenten als FIGARO und D17 nutzen zu können. Deren Mobilität würde die komplementären Probenuntersuchungen mit ATR-FTIR-Spektroskopie und SE ermöglichen, ohne dass diese Messmethoden fest an den Reflektometern verbaut werden müssten. Die Voraussetzung für die Kompatibilität ist ein baugleicher oder zumindest ähnlicher Probenstisch am Reflektometer, sodass ohne größere Modifikationen an der Grundplatte des Messaufbaus dieser installiert werden kann. Weiter muss auch das Platzangebot ausreichend sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass der in Abschnitt 4.5 beschriebene Aufbau auch für das SuperADAM Reflektometer des ILL verwendet werden kann.^[139] Es handelt sich hierbei um ein NR-Instrument mit vertikaler Probengeometrie, welches einen ähnlichen Probenstisch wie D17 besitzt. Somit waren nur kleine Modifikationen an der Grundplatte vonnöten, um den Aufbau hierauf anzupassen. Im Gegensatz zu D17 handelt es sich bei SuperADAM um ein monochromatisches anstelle eines Time-of-Flight-Reflektometers, weshalb der Winkel des Probenstisches relativ zu Neutronenquelle und Detektor während der Messung kontinuierlich variiert wird und nicht nur einige wenige Winkelpositionen eingestellt werden. Es wurde deshalb initial getestet, ob es bei einer typischen Messung zu Kollisionen mit Komponenten des Instruments kommen würde oder der Neutronenstrahl durch Teile des mobilen Aufbaus blockiert werden würde. Dabei wurde festgestellt, dass solche Probleme nicht zu erwarten sind und der Aufbau somit für die Nutzung an SuperADAM geeignet ist.

In Zusammenarbeit mit den Arbeitskreisen Tanaka (Universität Heidelberg, Deutschland) und Nylander (Lund University, Schweden) wurden somit Untersuchungen an Zellmembranen von Malaria-modifizierten Blutkörperchen durch komplementäre Messungen von NR und ATR-FTIR durchgeführt. Um eine gleichmäßige Oberflächenbeschichtung durch die Zellmembranen zu erhalten und deren Denaturierung zu vermeiden, wurden die ATR-Kristalle zuvor mit Cellulose beschichtet.^[171] Während mit NR eine Anlagerung der Zellmembranen auf die Oberfläche des Kristalls beobachtet wurde, waren jedoch keinerlei charakteristische IR-Absorptionsbanden zu erkennen. Dieser Umstand konnte zu einem späteren Zeitpunkt bei der Untersuchung von SR-Membranen mit ATR-FTIR-Spektroskopie ohne komplementäre Techniken reproduziert werden. Diese konnten nur auf unbeschichteten ATR-Kristallen nachgewiesen werden, während sie auf mit Cellulose beschichteten Kristallen keinerlei Absorptionsbanden zeigten. Der genaue Hintergrund hierfür ist bislang unklar. Da die Cellulose-Beschichtung mit der verwendeten Methode eine Dicke von etwa 10 nm haben, das evaneszente Feld im Bereich der CH₂-Valenzschwingungsbanden jedoch eine Eindringtiefe von etwa 260 nm aufweist, können die fehlenden Absorptionsbanden nicht anhand der Distanz der Membranen zur Substratoberfläche begründet werden. Cellulose zeigt zwar ebenso deutliche Absorption in den Bereichen der für Zellmembranen typischen Absorptionsbanden, jedoch sind diese nicht stark genug, um eine komplette Absorption der IR-Strahlung zu begründen.^[172]

Zwar war so eine direkte Beobachtung der adsorbierten Zellmembranen mit FTIR-Spektroskopie nicht möglich, jedoch zeigten weitere Messungen ein unterschiedliche spektrale Änderungen bei der

Interaktion gesunder und Malaria-modifizierter Zellmembranen mit Lipase. Bei Verwendung des Einkanalspektrums vor Zugabe des Enzyms als Hintergrundspektrum wurde bei Proben gesunder Zellen keine Änderung der IR-Spektren beobachtet, die über einen $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austausch der Flüssigphase hinausgingen. Dahingegen wurde bei Proben aus modifizierten Zellmembranen eine deutlich geringere Zunahme Absorptionsbanden im Bereich der D_2O -Valenzschwingungsbanden im Vergleich zur Abnahme der H_2O -Valenzschwingungsbanden beobachtet, was darauf hinweist, dass diese Änderung nicht allein aufgrund des $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ -Austauschs stattfand. Dies wurde als erhöhte Löchrigkeit der Probe interpretiert, wobei die Flüssigphase in diese eindringen konnte.

Mithilfe kleiner Modifikationen konnte der entwickelte Messaufbau an einem weiteren NR-Instrument verwendet werden. Dies ermöglicht interessierten Forschenden die Buchung eines alternativen Instruments zur Nutzung des Aufbaus und damit der komplementären Messungen. Aufgrund des eingeschränkten Platzes aufgrund von Bauteilen des Reflektometers ist dies jedoch nur in der Konfiguration ohne SE möglich.

4.6. Zusammenfassung und Ausblick zur Entwicklung der kombinierten Messaufbauten

Ziel des Projektes war es, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Ederth zwei Messaufbau zu konstruieren, mit welchen an den Neutronenreflektometern FIGARO und D17 des ILL Proben simultan mit NR, ATR-FTIR und SE charakterisiert werden können. Als Vorbild galt das Reflektometer Bioref, welches bereits simultane Messungen mit NR und ATR-FTIR ermöglichte. Im Gegensatz zu diesem Instrument sollte der neue Aufbau jedoch so gebaut werden, dass er ohne größeren Zeitaufwand vor Ort auf- und nach den Messungen wieder abgebaut werden konnte. Dies ermöglicht den Transport zwischen den Laboren am ILL und PCI, wodurch er auch außerhalb der zeitlich begrenzten NR-Messzeiten getestet und genutzt werden kann. Aufgabe der Arbeitsgruppe Dahint war es, die notwendigen Messaufbauten für die Kombination von NR und ATR-FTIR zu konstruieren und dafür Sorge zu tragen, dass diese mit dem von der Arbeitsgruppe Ederth konstruierten SE-Aufbau kompatibel waren. Anhand von Pilotprojekten sollte sowohl die Eignung der Aufbauten als auch die Vorteile der kombinierten Messungen demonstriert werden.

Anhand eines Prototyps konnten wichtige Erkenntnisse über die möglichen Maße des Aufbaus für FIGARO gewonnen werden. Auf Grundlage dessen wurde ein Aufbau für simultane Messungen von NR und ATR-FTIR gefertigt. Aufgrund der modularen Bauweise war der Aufbau am Reflektometer vor Ort unkompliziert und schnell, und erfüllt somit das Projektziel eines mobilen Systems. Anhand der in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Pilotexperimente, in denen der Einfluss von MgCl_2 und AuNP auf Lipid-Oligobilagensysteme untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass die Messmethoden übereinstimmende Ergebnisse bei Experimenten an weicher Materie liefern. Um die verfügbare Zeit optimal zu nutzen, wurden mehrere Proben parallel präpariert und vermessen, wodurch Wartezeiten bis zur Einstellung eines strukturellen Gleichgewichts minimiert werden sollten. Da die Probenwechsel auch mit kleinen Änderungen im Strahlengang einhergingen, entstanden jedoch periodische Störsignale in den erhaltenen Spektren, die zu Abweichungen in den erhaltenen Bandenintensitäten führen können. Weiter erwiesen sich die Probenwechsel anfangs als zeitaufwändig, weshalb im Anschluss an die

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

Pilotexperimente entsprechende Modifikationen am Aufbau vorgenommen wurden. Insbesondere wurden Teile der für die IR-Strahlführung verwendeten Tuben gegen Teleskop-Konstruktionen ersetzt und die Kühlwasserversorgung der Probenzellen mit Schnellverbindern über einen Verteiler geregelt. Weiter wurde die Strahlführung durch den Austausch und die Modifikation von Bauteilen stabilisiert, was für eine bessere Reproduzierbarkeit der Probenposition sorgt. Um den von der Arbeitsgruppe Ederth konstruierten SE-Aufbau zu implementieren, wurde außerdem der Abstand des Strahlengangs zur Grundplatte des Gesamtsystems vergrößert. Somit konnte in weiteren Pilotexperimenten die Möglichkeit der simultanen Probencharakterisierung anhand der drei eingangs genannten Messmethoden demonstriert werden. Hierfür wurde in zeitaufgelösten Messungen die Ablösung eines DMPC-Oligobilagensystems durch AuNP untersucht. Die jeweiligen Erkenntnisse waren im Einklang miteinander, mit Ausnahme der Ergebnisse von SE-Messungen oberhalb der Phasenübergangstemperatur. Bei dieser Messung wurde ein schneller vollständiger Verlust des präparierten Lipidfilms beobachtet, was den übrigen Messmethoden widersprach und wahrscheinlich auf die sehr kleinen Unterschiede der Brechungsindizes zwischen Film und Flüssigphase zurückzuführen war. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass die Methoden sowohl vergleichbare Ergebnisse liefern als auch untereinander die für die Auswertung nötigen Annahmen stützen. Das Ziel eines mobilen Messaufbaus für das Reflektometer FIGARO mit horizontaler Probengeometrie war somit erreicht.

Für die Planung des kombinierten Aufbaus in vertikaler Probengeometrie an D17 lagen die Maße des SE-Aufbaus bereits vor, wodurch dieser in den ersten Plänen mit einbezogen werden konnte. Aufgrund des eingeschränkten Platzangebots am Reflektometer wurde für die IR-Strahlführung ein mehrstöckiges System konstruiert, wobei das Spektrometer unter- und der Detektor oberhalb der Probe platziert wurde. Ein neuer Probenhalter wurde konstruiert, in dem die für den Aufbau für FIGARO verwendete Hebebühne vertikal eingebaut wurde. In ersten Tests des Gesamtsystems stellte sich dies als Problem heraus, da sie aufgrund des Gewichts des Ellipsometers ein zu hohes Drehmoment erfuhr und so instabil wurde. Aufgrund der sehr guten Reproduzierbarkeit der Probenposition durch den übrigen Probenhalter sowie der Möglichkeit, die IR-Strahlführung frei auf dem Aufbau zu platzieren, wurde die Hebebühne für nachfolgende Anwendungen durch einen Aluminiumblock ersetzt. Der so modifizierte Aufbau wurde dann in weiteren Pilotexperimenten getestet, in denen der Einfluss von AuNP auf Membranproteine nachgewiesen werden sollte. Während das gewählte periphere Protein nicht ausreichend auf den präparierten Lipid-Oligobilagen adsorbierte, um nachgewiesen zu werden, konnten die Amid-I-Absorptionsbanden eines integralen Proteins mit ATR-FTIR nachgewiesen werden. Diese zeigten jedoch auch deutliche H₂O-Rotationsbanden, was darauf hinweist, dass die Spülung der IR-Strahlführung nicht ausreichend ist. Auch NR zeigte die zu erwarteten Effekte des Proteins auf die Struktur der Bilagen, welche eine größere Rauigkeit, sowie kleinere Dicken der Kopf- und Kettenschichten aufwiesen. SE konnte dabei eingesetzt werden, um die mit NR bestimmte Probendicke unter Pufferlösung zu bestätigen. Bei Änderungen der Flüssigkeitsphase zeigten sich jedoch erhebliche Probleme bei der Simulation der gemessenen ellipsometrischen Winkel, weshalb wenig belastbare Ergebnisse für die Probendicken erhalten wurden.

Die zu Beginn gestellten Ziele, je einen mobilen Messaufbau für FIGARO und D17 zu konstruieren, mit denen NR, ATR-FTIR und SE als komplementäre Messmethoden genutzt werden können, wurden erreicht. Die Vorteile der simultanen Messungen konnte anhand mehrerer Pilotexperimente demonstriert

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

werden. Die so erhaltenen Ergebnisse sind nicht nur größtenteils übereinstimmend, sondern erlauben auch zuverlässigere Annahmen für die Auswertung der einzelnen Methoden. So kann zum Beispiel durch die Lage von CH_2 -Valenzschwingungsbanden in ATR-FTIR die Phase untersuchter Lipide bestimmt werden, was wiederum nützlich für eine verlässliche Auswertung der NR-Daten ist.

Nichtsdestoweniger besteht für die Aufbauten noch Verbesserungspotential, insbesondere im Hinblick auf die Konstruktion der IR-Strahlführungen. Gerade für die detaillierte Charakterisierung von Proteinen ist Spülung des Strahlengangs mit Trockengas noch unzureichend. Zwar stand für spätere Messungen eine an den Reflektometern fest installierte Stickstoff-Leitung zur Verfügung, wie aus den Pilotexperimenten hervorgeht, sind in den erhaltenen Absorptionsspektren im Bereich der Amid-I-Banden jedoch noch deutliche H_2O -Rotationsbanden zu erkennen, die eine Analyse der Proteinstruktur anhand der Absorptionsbande verhindern. Dies ist insbesondere bei Benutzung des D17-Aufbaus zu beobachten und wahrscheinlich auf den deutlich längeren Strahlengang zurückzuführen (für entsprechende Spektren, welche mithilfe des D17-Aufbaus entstanden, sei auf Kapitel 6 verwiesen). Um die Spülung der Strahlführung zu verbessern, kamen bereits Delrinkappen für die kinematischen Spiegelhalter zum Einsatz, welche von der feinmechanischen Werkstatt des PCI gefertigt waren und in Abbildung 4.15 C zu sehen sind. Die Luftfeuchtigkeit innerhalb des Strahlengangs kann weiter reduziert werden, indem das zu spülende Volumen verkleinert wird. Hierfür könnte entweder der Strahlengang gekürzt oder dessen Durchmesser reduziert werden. Ersteres ließe sich realisieren, indem das Spektrometer so hoch wie möglich gesetzt und damit einige Tuben entfernt würden. Dabei muss Sorge getragen werden, dass es bei den Experimenten nicht zu Kollisionen mit dem Neutronendetektor oder -leiter kommt, weshalb solche Modifikationen am besten vor Ort zu machen wären. Um das interne Volumen zu reduzieren, könnten dünnere Tuben oder Einsätze verwendet werden, wie sie auch als Ersatz für eine Lochblende im FIGARO-System verbaut wurden. Durch die Länge des Strahlengangs ist dies jedoch schwierig, weshalb der Einsatz dünnerer Tuben sinnvoller erscheint. In beiden Fällen muss jedoch besondere Vorsicht gelten, um ungewollte Reflexionen an den sich nun deutlich näher am Strahl befindlichen Wänden zu vermeiden, da dies das erhaltene Absorptionsspektrum beeinträchtigen kann. Auch der Strahlengang des FIGARO-Systems könnte gekürzt werden, um dessen Trocknung zu verbessern. Da die Grundplatte der Strahlführung unter Berücksichtigung des in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Systems zur Reduktion des Strahldurchmessers gefertigt wurde, wird der IR-Strahl im aktuellen Aufbau um den ATR-Kristall herum zu dessen Rückseite geleitet und muss nach Durchschreiten wieder um den Kristall herum zum Detektor geleitet werden (siehe Abbildung 4.1). Dieser Weg kann gekürzt werden, indem die erste Reflexion des IR-Strahls direkt nach dem Austritt aus dem Spektrometer stattfindet und dieser somit zur Vorderseite des Kristalls geleitet würde. Hierzu sind jedoch größere Modifikationen an der Halterung der Strahlführung nötig, auf die aufgrund der guten Ergebnisse in den Laboren des PCI bisher verzichtet wurde. Da neben der Strahlführung auch Spektrometer- und Detektorraum getrocknet werden müssen, welche beide nicht zu reduzieren sind, sollte weiter dafür Sorge getragen werden, dass diese vor Verwendung bereits für einen längeren Zeitraum gespült wurden. Aufgrund der mobilen Natur des Aufbaus und der begrenzten Messzeiten müsste hierfür das Spektrometer entweder per Spedition an das ILL geliefert werden, oder die Anreise mehrere Tage vor Beginn der Messzeit stattfinden und die Spülung bis zu den Messungen nicht unterbrochen werden.

4. Entwicklung eines kombinierten Messaufbaus für Neutronenreflektometrie, ATR-FTIR-Spektroskopie und spektrale Ellipsometrie

Ein weiteres Problem besteht in den periodischen Störsignalen, welche beim Probenwechsel auftreten können. Diese entstehen durch Interferenz des IR-Strahls bei Reflexion am ATR-Kristall oder den Fenstern des Spektrometers und Detektors und werden Etalons genannt. Wird der Strahlengang zwischen Hintergrund- und Probespektrum geändert, so sind die Etalons in den erhaltenen Absorptionsspektren zu sehen und können zu Fehlern in deren Auswertung führen. Zumindest Interferenzen, welche an den Fenstern des ATR-Kristalls entstehen, könnten möglicherweise durch eine Fokussierung des IR-Strahls vermieden werden, da die reflektierten Strahlen so dispergieren würden. Hierzu müssten die in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Umstände berücksichtigt und die Strahlführung entsprechend angepasst werden. Insbesondere wenn Parabolspiegel mit ungewöhnlichen Brennweiten benötigt würden, wäre diese Modifikation mit erheblichen Kosten verbunden. Solange die Etalons nicht vermieden werden können, sollte auf einen Probenwechsel zwischen den Messungen nach Möglichkeit verzichtet werden. Somit wäre der Aufbau insbesondere für Aufnahme von kinetischen Prozessen geeignet und weniger für Systeme, welche im strukturellen Gleichgewichtszustand vermessen werden sollen.

5. Untersuchung der Interaktion von kationischen Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Bilagen

Die industrielle Herstellung von Metall- und Metalloxid-NPs ist ein weltweit wachsender Markt, welcher Produkte für verschiedenste Branchen entwickelt. Die außergewöhnliche Bandbreite an Modifikationsmöglichkeiten ermöglicht es, NPs zu produzieren, welche speziell für den gewünschten Anwendungsbereich angepasst sind. Silber-NPs zeigen zum Beispiel antimikrobielle Eigenschaften,^[173-174] weswegen sie für entsprechende Beschichtungen von Polymeren Anwendung finden, wohingegen Titanoxid-NPs aufgrund starker Lichtbrechung für hochwertige Wandfarbe als auch für Sonnencremes verwendet werden.^[113] An der Partikeloberfläche adsorbierte Liganden modifizieren die inhärenten Eigenschaften der Partikel weiter und erschließen somit zusätzliche Anwendungsgebiete.^[175] AuNPs zeigen eine starke Affinität zu Thiolen, weswegen sie besonders einfach zu funktionalisieren sind und ihre Interaktion mit schwefelhaltigen Aminosäuren stark ist. Sie werden deshalb als mögliche Tumor-Marker oder Träger von medizinischen Wirkstoffen untersucht.^[110] Darüber hinaus spielt auch die Größe von NPs für ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften sowie ihre Interaktionen mit biologischen Zellen eine entscheidende Rolle. Kleinere Partikel haben ein größeres Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, weswegen sie in Relation mehr Liganden tragen als größere Partikel und somit ihre Interaktion mit Zellen verstärkt wird. Auch durch die Form der NPs können deren Eigenschaften, wie zum Beispiel die Zellinkorporation und Zytotoxizität beeinflusst werden.^[175]

Die große Verbreitung von Nanomaterialien birgt jedoch auch potenzielle Risiken für Mensch und Umwelt. Partikel, welche antibakterielle und antimikrobielle Eigenschaften haben, können neben den gewünschten Zielen auch für andere Zellen schädigend sein, zum Beispiel durch oxidativen Stress. Auch die direkte Interaktion mit Biomolekülen birgt große Risiken. Die bereits erwähnte Affinität von AuNPs zu schwefelhaltigen Aminosäuren kann zum Beispiel eine Bindung an diese in wichtigen Proteinen zur Folge haben. Das Protein kann somit in seiner Sekundärstruktur gestört werden und verliert seine Funktion.^[176] NPs in Feinstaub konnten in Zusammenhang mit einem erhöhten Lungenkrebs-Risiko gebracht werden.^[13] Aufgrund der durch COVID-19 ausgelösten weltweiten Pandemie stieg außerdem der Bedarf an Einweg-Atmenschutzmasken seit Ende des Jahres 2019 stark an. In deren Abbauprodukten konnten unter anderem Mikro- und Nanopartikel von Schwermetallen festgestellt werden, welche zu einer erheblichen lang andauernden Umweltbelastung führen können.^[177]

Somit ist die Interaktion von NPs mit Biomolekülen und Zellen Gegenstand aktueller Forschung. *In vivo* Studien können die Inkorporation und Akkumulation von NPs in Zellen verschiedener Organe.^[175, 178] Solche Untersuchungen finden jedoch üblicherweise in Systemen statt, welche für lange Zeit equilibrieren konnten, weshalb die direkte Beobachtung der Interaktionsmechanismen mit Zellmembranen oft nicht zu erkennen sind. *In vitro* Studien sind zwar gut zur Beobachtung direkter Interaktionen geeignet, lassen sich jedoch oft nur schwer auf biologische Begebenheiten übertragen. Somit sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Interaktion von NPs und Zellmembranen aktuell noch unzureichend verstanden.

Für die vorliegende Arbeit sollte daher die Interaktion von biomimetischen Membranen mit AuNPs untersucht werden. Hierfür stand der in Kapitel 4 beschriebene Versuchsaufbau zur Verfügung, welche

NR, ATR-FTIR-Spektroskopie und SE kombiniert. Diese Messungen wurden an den Instrumenten FIGARO und D17 des ILL in Grenoble durchgeführt. Der für FIGARO genutzte Aufbau wurde außerdem in den Laboren der Arbeitsgruppe Dahint in Heidelberg zur Untersuchung von Proben mit ATR-IR ohne komplementäre Messtechniken verwendet. Zusätzlich fanden Messungen mit NR ohne komplementäre Messtechniken am Instrument D6 des HZB in Berlin statt. Weitere Untersuchungen wurden mit XRR am KIT in Karlsruhe durchgeführt.

Die Synthese der AuNP ist im Abschnitt 3.3.2 beschrieben. Modellsysteme wurden aus den Lipiden DMPC, 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerin (DMPG) und Chol hergestellt. Die Präparationsmethode ist im Abschnitt 3.4.2 beschrieben. DMPC ist ein zwitterionisches Lipid, welches sich von 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC), ein Phospholipid, welches in den Membranen von Säugetierzellen weit verbreitet ist, nur in der Länge der Fettsäuren um zwei CH₂-Gruppen unterscheidet. Durch die verkürzte Kettenlänge ist die Phasenübergangstemperatur von DMPC deutlich reduziert, was vorteilhaft für Experimente ist, welche sowohl ober- und unterhalb dieser stattfinden sollen.^[179] Ein starkes Ausgasen der umgebenden Flüssigkeit bei hohen Temperaturen kann somit vermieden werden, was einen Verlust der Signalintensität in SE zur Folge hätte oder den untersuchten Lipid-Film zerstören könnte.

5.1. Vorpharakterisierungen trockener Lipid-Oligobilagen mit SE, ATR-IR-Spektroskopie und XRR

Die Auswertung von Reflektometrie an weicher Materie ist kein triviales Unterfangen. Da sich die erhaltenen Profile oft sehr ähneln, ist eine Vorkenntnis des Probenaufbaus für eine sinnvolle Modellierung besonders hilfreich. Hierfür kann zum Beispiel mit Ellipsometrie^[7] oder spektroskopischen Methoden^[180] die Dicke der Beschichtungen bestimmt werden. Die Topografie der Probe kann mit Rasterkraftmikroskopie^[38] untersucht werden, was Hinweise auf Parameter wie die Rauigkeit der einzelnen Schichten liefert. Die Masse der aufgetragenen Lipide kann über Quarzkristall-Mikrowaagen^[6] bestimmt werden.

5.2. Einfluss der DMPC-Konzentration auf die Probendicke von Oligobilagen-Proben bei Rotationsbeschichtung

Die bei der Beschichtung von Si-Substraten mit verschiedenen DMPC-Konzentrationen erhaltene Probendicke wurde mithilfe von Ellipsometrie untersucht. Es wurden ATR-Silizium-Kristalle nach dem in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen RCA-Protokoll gereinigt und anschließend mit einer Lösung von DMPC in Chloroform beschichtet. Um Fehler, welche beim getrennten Ansetzen einzelner Lösungen entstehen können zu minimieren, wurde eine Stammlösung mit hoher Konzentration angesetzt und diese anschließend auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Die Charakterisierung der so erhaltenen Proben erfolgte mithilfe des in Abschnitt 3.6 beschriebenen Ellipsometers M-44. Die erhaltenen Probendicken sind in Abbildung 5.1 A dargestellt. In ersten Experimenten wurde die Trocknung der Probe durch Lagerung im Vakuum erzielt. Eine vierte Probe mit der Konzentration von 1 mg/ml wurde

nicht aufgetragen, da keine verlässliche Anpassung der ellipsometrischen Winkel der Messung erzielt werden konnte. In einer Wiederholungsmessreihe wurde deshalb 2 mg/ml als kleinste Konzentration gewählt. Hier erfolgte die Trocknung über eine Lagerung bei 60 °C für 30 min. Vor der Messung wurden die Proben etwa eine halbe Stunde bei Raumtemperatur abkühlen gelassen. In beiden Messreihen konnte eine Zunahme der Probendicke mit der Konzentration der verwendeten Lipid-Lösung beobachtet werden. Anpassungen mit Ursprungsgeraden zeigten $R^2 > 99,8\%$, was für einen linearen Zusammenhang spricht. Auffällig ist vor allem die größere Steigung der ersten Messreihe gegenüber der der zweiten Messreihe.

Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung ist die in Abschnitt 2.4.2 beschriebene strukturelle Änderung der Probe bei der Hitzetrocknung. Ein Ausheilen der inneren Lipidbilagen würde mit einem Materialverlust in den äußeren Bilagen einher gehen, was sich in einer Abnahme der Probendicke bemerkbar machen würde. Die bei gleicher Präparation wären somit bei Hitzetrocknung insgesamt dünnere Proben als bei Vakuumtrocknung zu erwarten. Auch die Cauchy-Parameter lassen die Vermutung einer strukturellen Inhomogenität der nicht-getrockneten und vakuumgetrockneten Proben aufkommen, während die Ergebnisse der hitzegetrockneten Probe aufgrund der wesentlich kleineren Fehlerbalken eine verbesserte Homogenität vermuten lassen (siehe Abbildung 5.1 B). Zusätzlich liegen die erhaltenen Cauchy-Parameter für die hitzegetrockneten Proben bei verschiedenen Dicken wesentlich näher beieinander, als es bei den vakuumgetrockneten Proben der Fall ist. Eine Probentrocknung mit Hitze scheint somit zu besser reproduzierbaren Lipid-Strukturen zu führen. Da die beiden Messreihen an unterschiedlichen Zeitpunkten der Forschungsarbeit stattfanden und nicht wiederholt wurden, kann jedoch nicht garantiert werden, dass es sich hierbei nicht um rein zufällige Beobachtungen handelt. Die präparativen Unterschiede könnten die tatsächlichen Einflüsse der Trocknungsmethoden auch überlagern, weshalb eine Entscheidung zusätzlicher Informationen durch komplementäre

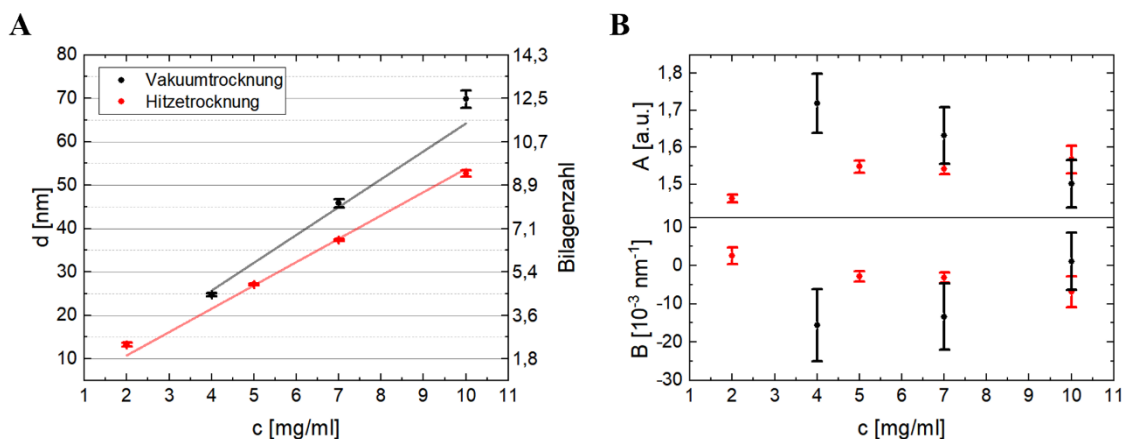


Abbildung 5.1: Einfluss der bei Rotationsbeschichtung gewählten DMPC-Konzentration und der Trocknungsmethode auf die Probendicke von DMPC-Oligobilagen, untersucht mit SE. **A** Die Dicke d nimmt mit der Konzentration des Lipids in der Beschichtungslösung zu. Die Bilagenzahl wurde unter Annahme einer Bilagendicke von 5,6 nm berechnet.^[34] Die linearen Anpassungen (graue und hellrote Linie) mit $R^2 > 99,8\%$ sprechen für eine gute Korrelation. **B** Cauchy-Parameter der zugehörigen Anpassungen.

Untersuchungsmethoden bedarf. Hierzu wurden die Proben auch mit ATR-IR-Spektroskopie untersucht, wie in Abschnitt 5.2.1 nachzulesen ist.

Da die Dicke einer DMPC-Bilage d_{DMPC} in der Fachliteratur gut dokumentiert ist, kann aus den erhaltenen Probendicken auf die Zahl der Bilagen N geschlossen werden.^[34] Hierbei wurde beobachtet, dass bei allen hier beschriebenen Proben die Gesamtdicke d_{ges} deutlich näher an $d_{ges} = (N + 0,5) \cdot d_{DMPC}$, als an einem ganzzahligen Vielfachen liegt. Dies weist darauf hin, dass bei der Rotationsbeschichtung eine Lipid-Monolage auf der Probenoberfläche zurückblieb.

Die lineare Anpassung der Schichtdicken hätte weiter verbessert werden können, indem der Ordinatenabschnitt mit angepasst worden wäre. Die hierfür erhaltene Werte zeigten jedoch deutliche Abweichungen vom Ursprung des Koordinatensystems in der Größenordnung einer Bilage. Da die einzelnen Proben auf unterschiedlichen Substraten aufgebracht waren, sind etwaige Rückstände vormaliger Beschichtungen auf den Oberflächen als Fehlerquelle auszuschließen. Es wäre denkbar, dass es sich bei dieser Beobachtung um ein systematisches Problem bei der Auswertung der ellipsometrischen Winkel handelt, beispielsweise durch eine unzureichende Beschreibung der Probe durch das verwendete Modell. Wahrscheinlich handelt es sich hier jedoch aufgrund der geringen Zahl von Datenpunkten um eine statistische Schwankung der erhaltenen Datenpunkte. Aus diesem Grund wurde auf die Verwendung des zusätzlichen Parameters verzichtet, und der Ordinatenabschnitt gleich Null gesetzt.

5.2.1. Einfluss der Probendicke auf die Intensität der Methylen-Valenzschwingungsbande in ATR-IR-Spektroskopie

Die aufgrund der unterschiedlichen Konzentration bei der Rotationsbeschichtung resultierende Probendicke wirkt sich auf die zu beobachtete Intensitäten der mit der Probe assoziierten Schwingungsbanden aus. Probenmoleküle interagieren während der Messung mit dem durch Reflexion an der Grenzfläche zwischen Substrat und Probe entstehenden evaneszenten Feld. Solange die Eindringtiefe d_p groß verglichen zur Probendicke ist, resultiert eine verringerte Probendicke in einer Abnahme der Bandenintensität. Aufgrund des exponentiellen Abfalls der Intensität des evaneszenten Feldes mit dem Abstand z zur Grenzfläche ist jedoch kein linearer Zusammenhang zu erwarten, da äußere Teile der Probe weniger stark mit dem evaneszenten Feld interagieren als solche, die nahe der Grenzfläche sind. Die Intensität der Absorptionsbanden ist neben der Einfallswinkel-abhängigen Eindringtiefe zusätzlich von Faktoren wie der Probenausleuchtung und der elektrischen Feldstärke des einfallenden Strahls abhängig. Diese sind in der Regel nicht exakt bekannt, weshalb eine exakte Bestimmung der Probendicke anhand der IR-Bandenintensität nur bedingt möglich ist.

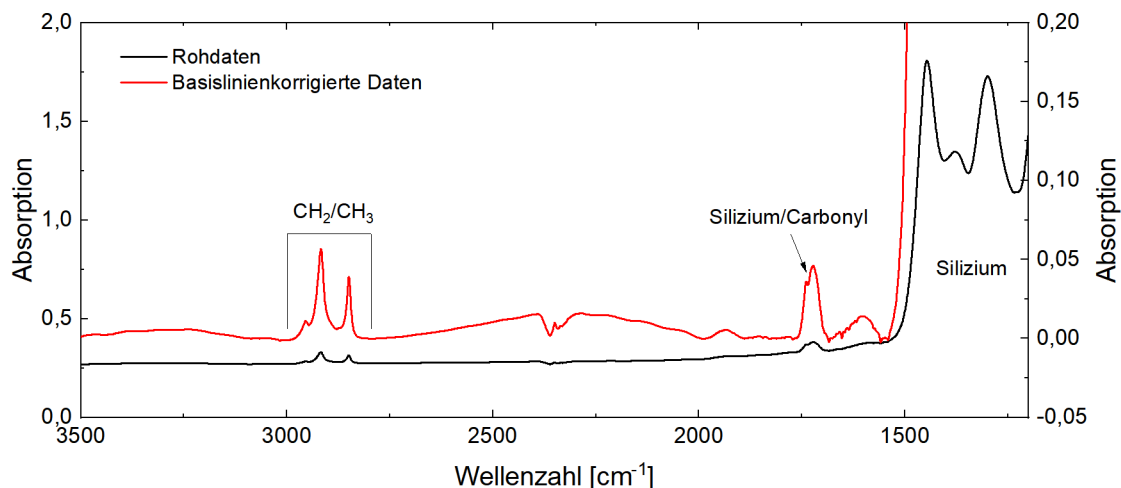


Abbildung 5.2: Demonstration der Basislinienkorrektur anhand der vakuumgetrockneten Probe nach Rotationsbeschichtung mit 7 mg/ml DMPC. Das Spektrum wird durch die starke Absorption der Silizium-Banden unter 1500 cm^{-1} dominiert. Außerdem fällt das Spektrum nicht auf eine Absorption von Null ab, was die Auswertung der Schwingungsbanden erschwert. Dies kann mithilfe der Basislinienkorrektur behoben werden.

Die Absorption der CH_2 -Valenzschwingungsbanden der im vorigen Abschnitt beschriebenen Proben wurden mithilfe des in Abschnitt 4.3 beschriebenen Aufbaus bestimmt. Obwohl die hier gezeigten Messungen im trockenen Zustand durchgeführt wurden, wurden die verwendeten ATR-Kristalle dabei in Flüssigkeitszellen eingebaut, da somit eine gute Reproduzierbarkeit der Probenposition ermöglicht wurde. Anhand einiger Proben wurde anschließend die Stabilität der Proben in wässriger Umgebung untersucht, indem die Flüssigkeitszelle mithilfe einer Peristaltikpumpe mit D_2O befüllt wurde. Das Einkanalsspektrum eines Gold-bedampften Si-Wafers mit einer perdeuterierten Octadecanthal-SAM wurde dabei als Hintergrund verwendet. Durch das Aufbringen von Thiolen können Gold-Oberflächen effektiv passiviert werden, wobei die Perdeuterierung den Vorteil bietet, dass Absorptionsbanden der Alkyl-Kette nicht mit denen der CH_2 -Valenzschwingungen der Proben überlagern.^[57, 181]

5. Untersuchung der Interaktion von kationischen Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Bilagen

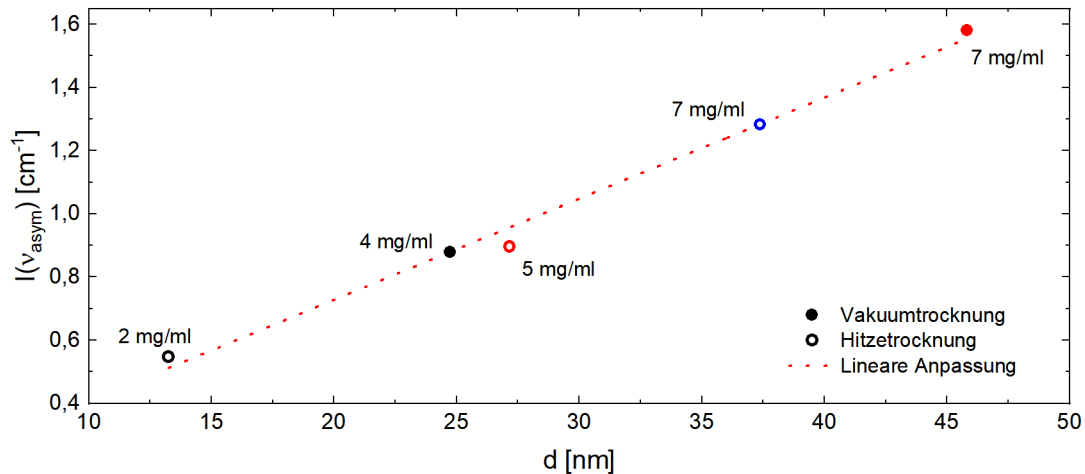


Abbildung 5.3: Intensität der asymmetrischen CH₂-Streckschwingungsbande in Abhängigkeit der mithilfe von SE bestimmten Probendicke. Es wurde ein in guter Näherung linearer Anstieg der Bandenintensität mit Zunahme der Probendicke beobachtet.

Um die Bandenintensitäten der Probe zu bestimmen, wurde eine Basislinienkorrektur vorgenommen. Hierfür wurden für die gemessenen Spektren mithilfe eines in LabVIEW selbst geschriebenen Programmes polynomielle Basislinien der Spektren generiert und von diesen abgezogen. Die Vorteile des Programmes gegenüber der Basislinienkorrektur in OriginPro bestand darin, dass der Einfluss der für die polynomielle Anpassung gewählten Ankerpunkte auf alle Spektren direkt beobachtet werden konnte. Somit konnten Fehler, die auf ungünstig gesetzten Ankerpunkten basierten, vermieden werden. Eine beispielhafte Basislinienkorrektur ist in Abbildung 5.2 zu sehen. Anschließend wurde die Bandenintensität mit Lorentz-Funktionen in Fityk bestimmt. Es wurden sowohl die asymmetrische CH₂-Streckschwingungsbande $\nu_{asym} = 2919 \text{ cm}^{-1}$ als auch die symmetrische $\nu_{sym} = 2850 \text{ cm}^{-1}$ angepasst, wobei aufgrund der besseren Anpassung die nachfolgende Auswertung anhand ν_{asym} erfolgte. Als Bandenintensität wurde die Fläche unter der so angepassten Kurve verwendet. Die erhaltenen Bandenintensitäten wurden in Abbildung 5.3 gegen die mithilfe von SE bestimmten Probendicken aufgetragen. Hierbei wurde ein in guter Näherung linearer Anstieg der Bandenintensität mit Zunahme der Probendicke beobachtet. Dies widerspricht dem zu erwarteten Verhalten, da aufgrund der Charakteristik des evaneszenten Feldes davon auszugehen ist, dass mit zunehmender Probendicke eine geringere Zunahme der Bandenintensität beobachtet wird. Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes beträgt jedoch bei der Lage von ν_{asym} nach Gleichung (2.25) $d_p = 243 \text{ nm}$, weshalb die Abweichung vom linearen Verhalten noch relativ gering ist. Weiter kann aufgrund der unterschiedlichen Justage der Proben nicht gewährleistet werden, dass diese bei allen Messungen gleich war. Bereits eine Abweichung des Einfallswinkels um 2° bewirkt eine Abweichung der Eindringtiefe von 10 nm . Somit ist der Widerspruch zum theoretischen Verlauf als nicht signifikant anzusehen. Weiter fällt auf, dass die Proben, welche mit einer DMPC-Lösung von 7 mg/ml beschichtet und mit unterschiedlichen Verfahren getrocknet wurden, auch eine unterschiedliche Bandenintensität zeigen, die sich in den linearen Verlauf einordnet. Somit kann die abweichende Probendicke nicht allein aufgrund von strukturellen Änderungen hervorgerufen werden. Da hierbei angenommen wird, dass durch das Erhitzen der Probe innere Fehlstellen ausheilen, wobei Lipide äußerer Lagen verwendet werden, würde dies mit einer Zunahme der Bandenintensität einher gehen (da diese Lipide somit näher an der Grenzfläche lägen und so stärker

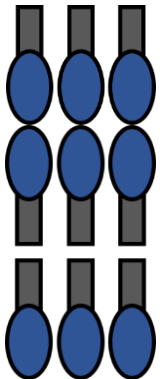
zu Absorption der Probe beitragen). Es ist daher wahrscheinlich, dass die beobachteten Unterschiede der Proben primär auf Unterschiede bei der Probenpräparation zurückzuführen sind, beziehungsweise diese einen deutlich stärkeren Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse haben als strukturelle Änderungen.

5.2.2. Einfluss von Cholesterol auf die Struktur von DMPC-Oligobilagen

Neben der Konzentration der für die Rotationsbeschichtung verwendeten Lösung kann auch ihre Zusammensetzung einen Einfluss auf die erhaltene Probendicke haben. Um diese Effekte zu untersuchen, wurden Proben von DMPC mit zwei Chol-Gehalten angesetzt und wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben auf gereinigte Si-Wafer per Rotationsbeschichtung aufgebracht. Hierbei wurde die Konzentration jeweils so gewählt, dass sie der Stoffmengenkonzentration einer 5 mg/ml Lösung reinen DMPCs entsprach.

Mithilfe von SE wurde der Einfluss der Zusammensetzung auf die Gesamtdicke der Beschichtung bestimmt. Hierfür wurde jeweils eine Probe mit 20% und 30% Chol-Gehalt präpariert und mit den oben beschriebenen Ergebnissen reiner DMPC-Oligobilagen aus äquivalenter Präparation verglichen. Zusätzlich wurde eine weitere Probe mit 10% Gramicidingehalt untersucht, wie sie auch für die in Kapitel 6 beschriebenen Untersuchungen verwendet wurden. Der Lipid-Anteil war hier eine 4:1-Mischung aus DMPC und Chol und somit äquivalent zur untersuchten Probe mit 20% Chol-Gehalt. Die Proben wurden zunächst wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben vakuumgetrocknet und nach der Bestimmung der Schichtdicke mit SE zusätzlich hitzegetrocknet und erneut vermessen. Hiermit sollte die vorherige Beobachtung einer verringerten Probendicke durch Ausheilen tieferliegender Bilagen

Tabelle 5.1: Verwendetes Modell zur Anpassung der XRR-Messungen von DMPC-Oligobilagen unter Luft. Eingetragene Zahlenwerte wurden der Literatur entnommen und bei Modellierung der XRR-Profile festgelegt, alle anderen Parameter wurden variiert. Gleichbenannte Parameter waren dabei verknüpft, sodass diese in allen äquivalenten Schichten identisch waren. Die Rauigkeit aller Grenzflächen wurde als identisch angenommen und angepasst, jedoch zugunsten der Übersichtlichkeit nicht eingetragen.

		Wiederholungen	$d \text{ [Å]}$	SLD $[10^{-6} \text{ Å}^{-2}]$
	Luft	—	—	0
	Kettengruppen	1	$d_{Kette}/2$	ρ_{Kette}
	Kopfgruppen		d_{Kopf}	ρ_{Kopf}
	Kopfgruppen	N	d_{Kopf}	ρ_{Kopf}
	Kettengruppen		d_{Kette}	ρ_{Kette}
	Kopfgruppen		d_{Kopf}	ρ_{Kopf}
SiO _x	Siliziumoxid	1	15 ^[182]	18,1 ^[140]
Si	Silizium	1	—	19,8 ^[140]

überprüft werden. Die erhaltenen Probendicken sind in Abbildung 5.4 dargestellt. Es war bei allen Proben eine geringere Dicke nach der Hitzetrocknung zu beobachten, was die obenstehende Interpretation stützt. Die Unterschiede waren bei zunehmendem Chol-Gehalt geringer, was auf einen verringerten Anteil von Fehlstellen in tieferliegenden Bilagen hindeuten könnte. Interessant ist auch, dass für die hitzegetrockneten Proben ein linearer Anstieg der Gesamtdicke bei Erhöhung des Chol-Gehalts festgestellt werden konnte, während diese bei Vakuumtrocknung keinen monotonen Verlauf zeigten. Auch hier könnte ein Ausheilen der Bilagen als Ursache angesehen werden, jedoch können auch andere Effekte die beobachteten Änderungen erklären. Die Einlagerung von Chol geht mit strukturellen Änderungen der Kopf- und Kettengruppen einher, die zu einer Erhöhung der Bilagendicke führen.^[81] Auch kann die Hygroskopie der Probe durch die Einlagerung des hydrophoben Sterols beeinflusst werden, was möglicherweise zu einer Abnahme der Probendicke führt.^[183-184] Die Effekte sind somit gegenläufig und könnten das beobachtete Verhalten bei Betrachtung der vakuumgetrockneten Proben erklären. Es ist außerdem vorstellbar, dass die Kopfgruppen durch Hitzetrocknung effektiver dehydratisiert wurden und somit diese eine untergeordnete Rolle bei der Betrachtung der Probendicken spielten. Eine sichere Interpretation der Beobachtungen war allein mit Ellipsometrie jedoch nicht möglich, da der interne Aufbau der Probe mit dieser Methode nicht bestimmt werden kann. Dieser kann jedoch mithilfe von XRR untersucht werden.

Zur Untersuchung der inneren Struktur von Oligobilagen unterschiedlicher Zusammensetzung wurden Messungen mithilfe von XRR am KIT durchgeführt. Die Probenpräparation erfolgte analog zu den Untersuchungen mit SE. Alle Proben wurden vakuumgetrocknet und bis zum Zeitpunkt der Untersuchungen unter Stickstoffatmosphäre gelagert. Auf eine Untersuchung hitzegetrockneter Proben wurde verzichtet. Die Messungen erfolgten in temperierbaren Probenkammern, welche mithilfe von

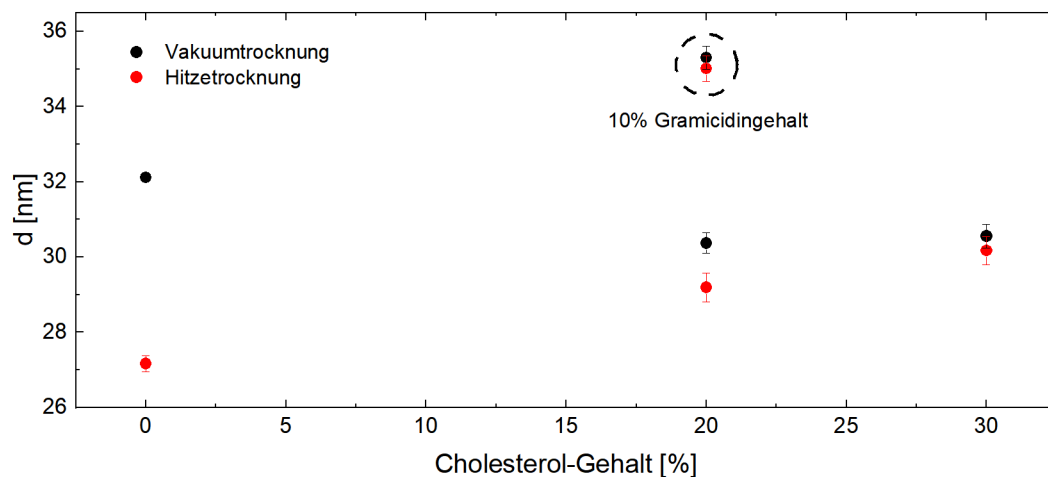


Abbildung 5.4: Ellipsometrische Bestimmung der Probendicke bei der Beschichtung mit 5 mg/ml Lipid-Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung. Dicken reiner DMPC-Oligobilagen wurden aus den in Abbildung 5.1 dargestellten Ergebnissen übernommen, wobei dies im Falle der Vakuumtrocknung aufgrund fehlender Messdaten anhand der Ausgleichsgerade berechnet wurde. Durch Hitzetrocknung ist eine Abnahme der Probendicke zu beobachten. Der Effekt wird durch Einlagerung von Chol und GramD verringert, was für weniger Fehlstellen in den tieferliegenden Bilagen spricht.

Peltier-Elementen konstant auf 20 °C eingestellt waren (siehe Abbildung 3.5). Es wurden die Reflexionsprofile im $\theta/2\theta$ -Modus bei Probenwinkeln von $\theta = (0 - 2,5)^\circ$ aufgenommen, was Streuvektoren im Bereich von $Q = (0 - 0,387) \text{ \AA}^{-1}$ entsprach. Für jede Probe wurden zugunsten einer guten Statistik fünf Einzelmessungen gemittelt. Die Prozessierung der Rohdaten erfolgte mit einem von Andreas Stöcklin entwickelten Skript zur Korrektur der Ausleuchtung der Probenoberfläche bei variierten Probenwinkeln in OriginPro. Das zur Anpassung der so erhaltenen Reflexionsprofile verwendete Modell ist in Tabelle 2.1 beschrieben. Die Unterseite des Modells bildet das Si-Substrat mit der nativen Siliziumoxid-Schicht, deren Dicke typischerweise im Bereich von 10 – 20 Å liegt.^[185] Messungen an unbeschichteten Si-Wafern bestätigten die erwartete Schichtdicke und lagen typischerweise zwischen 13 Å und 16 Å. Da die Einflüsse auf die erhaltenen Reflexionsprofile in diesem Bereich als vernachlässigbar eingeschätzt werden können, wurde die Dicke anschließend auf 15 Å fixiert. Auf der Oxid-Schicht sind $(N + 0,5)$ DMPC-Bilagen adsorbiert, die sich in Ketten- und Kopfgruppen unterteilen, welche in allen Bilagen als identisch angenommen werden. Die Parameter der Komponenten sind in der Literatur zu finden (vergleiche Tabelle 3.2). Bei gemischten Filmen müssen die SLDs der einzelnen Komponenten nach ihren jeweiligen Anteilen x_i in den Schichten berechnet werden. Wird angenommen, dass es sich um ideale Mischungen handelt und Chol vollständig in den Kettengruppen lokalisiert ist, kann die SLD dieser über Gleichung (5.1) berechnet werden.

$$\rho_{Kette,Mischfilm} = \frac{x_{Chol} \cdot V_{Chol}^M \cdot \rho_{Chol} + (1 - x_{Chol}) \cdot V_{DMPC-Kette}^M \cdot \rho_{DMPC-Kette}}{x_{Chol} \cdot V_{Chol}^M + (1 - x_{Chol}) \cdot V_{DMPC-Kette}^M} \quad (5.1)$$

Hierbei handelt es sich um eine Vereinfachung, da die Hydroxyl-Gruppe des Chol in reellen Bilagen in die Kopfgruppenschicht hineinragt. Bei hohen Chol-Konzentrationen können sich außerdem in der Bilagenebene Domänen ausbilden, welche ausschließlich das Sterol enthalten. Die hier verwendeten Konzentrationen befinden sich jedoch unter denen, bei denen in der Literatur signifikante Domänenbildung beobachtet wurde.^[79] Zusätzlich ist die Ausdehnung der Domänen in der Größenordnung $< 1 \mu\text{m}$ und damit deutlich kleiner als die typische Kohärenzlänge bei Untersuchungen mit XRR unter einem Einfallswinkel von $\sim 1^\circ$, welche von T. P. Russel mit $\sim 30 \mu\text{m}$ abgeschätzt wird und somit die SLD über die Domänen hinweg gemittelt werden kann.^[18] Für die vorliegende Arbeit wurden somit weder die Domänenbildung noch das hineinragen der Chol-Hydroxyl-Gruppe in die Kopfgruppenschicht beachtet. Bei der äußeren Schicht der Probe handelt es sich um eine Monolage, weshalb nur eine Schicht der Kopfgruppen verwendet wird und die Kettengruppen die halbe Dicke der entsprechenden Lagen in den Bilagen trägt. Dieser Wert kann im Auswertungsprogramm nicht mit den übrigen verknüpft werden, weshalb er für die präsentierten Anpassungen auf $d_{Kette,letzte} = 15,15 \text{ \AA}$ festgelegt wurde. Der so entstehende Fehler hat jedoch einen vernachlässigbar kleinen Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse. Alle anderen Parameter sind auch hier identisch zu den inneren Bilagen. Weiter wird die Rauigkeit aller Grenzflächen als gleich angenommen. Die Hydratisierung der Kopfgruppe kann in XRR-Messungen durch eine Wasserschicht zwischen den Kopfgruppen benachbarter Bilagen beschrieben werden. Alternativ kann auch die Dicke d_{Kopf} und SLD ρ_{Kopf} der Kopfgruppen angepasst werden. Aufgrund der Diffusion von Wassermolekülen zwischen Lipid-Kopfgruppen innerhalb der Bilage wurde für das hier beschriebene Modell letztere Methode verwendet. Nach vorherigen Arbeiten in der Arbeitsgruppe Dahint von Andreas Stöcklin konnte außerdem davon ausgegangen werden, dass die Fehlstellen der Proben so groß sind, dass eine inkohärente Mischung der reflektierten Strahlung

5. Untersuchung der Interaktion von kationischen Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Bilagen

angenommen werden muss.^[156] Das heißt, dass anstelle von Bilagen mit regelmäßigen kleinen Löchern entweder intakte Bilagen oder Löcher detektiert werden. Für die Anpassung wird eine Kombination des beschriebenen Modells mit einer einzelnen Monolage auf dem Substrat angenommen ($N = 0$), wobei die Parameter der Kopf- und Kettengruppen identisch zu denen des intakten Films sind. Der Anteil γ_{Loch} der Fehlstellen im Modell wurde von Hand angepasst, da eine automatisierte Anpassung zu unrealistischen Ergebnissen führte.

Es wurden Trockenmessungen an reinen DMPC-Oligobilagen, sowie zwei verschiedenen Verhältnissen von beigemishtem Chol durchgeführt. Zur Präparation von Proben mit Chol-Gehalt wurde der jeweils angegebene Anteil der Stoffmenge von DMPC ausgetauscht, wodurch sich eine geringere Massenkonzentration bei der Rotationsbeschichtung ergab. Die Experimente fanden im trockenen Zustand bei 20 °C statt und die so erhaltenen Reflexionsprofile sind in Abbildung 5.5 dargestellt. Die angepassten Kurven sind als durchgezogene Linien eingezeichnet und die erhaltenen Probenparameter in Tabelle 5.2 eingetragen. Um Parameter zu erhalten, welche in realistischen Größen beim Vergleich mit Literaturwerten lagen, mussten deren Grenzen zum Teil stark eingeschränkt werden. Insbesondere im Falle der Untersuchung des reinen DMPC-Films ist deshalb eine Interpretation der erhaltenen Größen nur bedingt möglich.

Wie im Einzug von Abbildung 5.5 zu sehen ist, nahm die Gesamtdicke der Bilagen durch Beimischung von 20% Chol deutlich ab und bei Erhöhung auf 30% wieder leicht zu. Bei Betrachtung der einzelnen Schichtdicken zeichnet sich jedoch ein einheitlicher Trend ab, bei dem eine Zunahme der Kettengruppendicke und Abnahme der Kopfgruppendiffe durch erhöhten Chol-Gehalt beobachtet wurde. Ähnliche Änderungen in der Struktur von Lipid-Bilagen durch Chol wurden unter anderem von Giri *et al.* beschrieben, die bei der Untersuchung von oberflächenadsorbierten Lipid-Monolagen unter

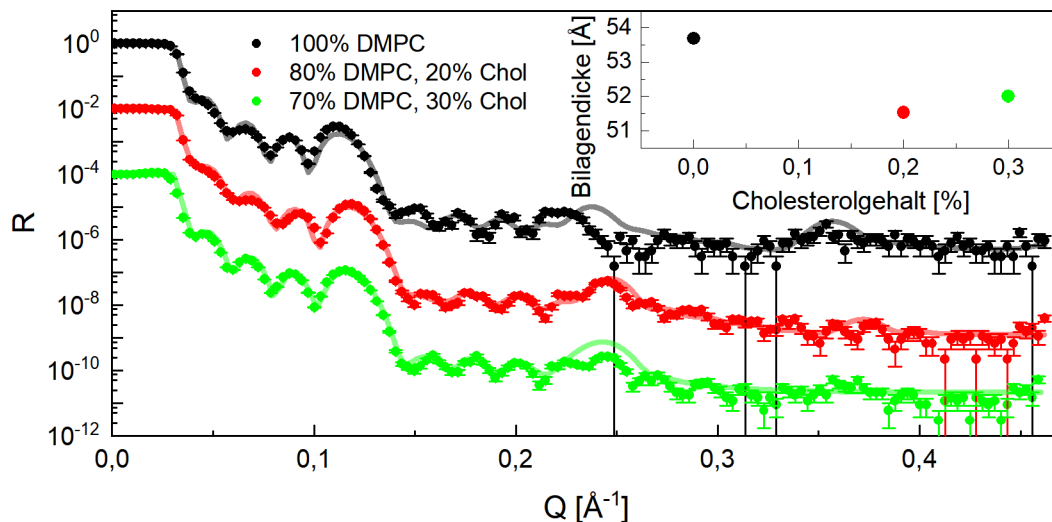


Abbildung 5.5: Erhaltene XRR-Profil von trockenen DMPC/Chol-Oligobilagen auf Si-Substraten. Anpassungen nach dem in Tabelle 2.1 beschriebenen Modell sind als transparente Linien eingezeichnet. Die entsprechenden Parameter sind in Tabelle 5.2 zu finden. Der Einsatz zeigt die nach der Anpassung erhaltene Bilagendicke.

H₂O mit XRR ebenfalls die Zunahme der Kettengruppendicke und Abnahme der Kopfgruppendicke beobachteten. Letztere war jedoch mit $\sim 0,5 \text{ \AA}$ bei einem Chol-Gehalt von 25% bedeutend kleiner als hier, sodass insgesamt eine Zunahme der gesamten Bilagendicke beobachtet wurde. Sie schlussfolgerten, dass sich Chol in die Kettengruppen-Schicht einlagerte, wobei die Hydroxyl-Gruppe in die Kopfgruppen-Schicht ragt, was zu einer Umordnung der Kettengruppen und somit Zunahme der entsprechenden Schichtdicke führte. Gleichzeitig nahm durch die Einlagerung der durchschnittliche Platzbedarf der Lipide in der Bilagenebene zu. Die Kopfgruppen lagerten sich dabei so um, dass die hydrophobe Kettengruppen-Schicht gegen die Umgebung abgeschirmt war.^[79] Die Ergebnisse sind jedoch nur bedingt zu übertragen, da diese im wässrigen Medium oberhalb der Phasenübergangstemperatur T_M von DMPC stattfanden. Bei Messungen unter Luft kann zum Beispiel nicht von einer vollständigen Hydratisierung der Kopfgruppen ausgegangen werden. Diese nimmt Einfluss auf die Dicke und SLD der Schichten. Über letzteres kann der Hydratisierungsgrad nach Gleichung (5.2) abgeschätzt werden. Somit ist es möglich einzuschätzen, ob Änderungen in der Schichtdicke auf den Hydratisierungsgrad oder strukturelle Änderungen zurückzuführen sind.

$$\phi_{w,Kopf} = \frac{\rho_{Kopf} - \rho_{Kopf,trocken}}{\rho_{H_2O} - \rho_{Kopf,trocken}} \quad (5.2)$$

Die SLD von H₂O und vollkommen trockener DMPC-Kopfgruppen ist in Tabelle 3.2 zu finden. In den hier präsentierten Ergebnissen war eine Abnahme von $\phi_{w,Kopf}$ bei Erhöhung des Chol-Gehalts der Proben zu beobachten. Dieser Effekt kann durch die stark hydrophoben Eigenschaften von Chol verstanden werden. Somit war die beobachtete Abnahme der Kopfgruppenschichtdicke zumindest

Tabelle 5.2: Erhaltene Parameter der Anpassungen von trockenen DMPC/Chol-Oligobilagen. Die Lochanteile γ_{Loch} der Bilagen wurden durch einen prozentualen Anteil des Substrats mit einer einzelnen adsorbierten Monolage simuliert. Die SLD der Kettenschicht ρ_{Kette} wurde durch Literaturwerten von DMPC-Kettengruppen^[34] und Chol^[141] unter Annahme einer idealen Mischung berechnet. Die Dicke der DMPC-Kettengruppe $d_{Kette,100\% DMPC}$ wurde ebenso aus der Literatur entnommen, wohingegen dieser Parameter für gemischte Oligobilagen angepasst wurde.^[34] Die Hydratisierung der Kopfgruppen $\phi_{w,Kopf}$ wurde anhand der angepassten SLD selbiger Schicht und Literaturwerten von trockenen DMPC-Kopfgruppen und H₂O berechnet.

Parameter	100% DMPC	80% DMPC, 20% Chol	70% DMPC, 30% Chol
$\chi^2 [10^3]$	0,98	1,68	6,31
$\Delta Q/Q [\%]$	$4,43 \pm 0,04$	$2,86 \pm 0,01$	$5,00 \pm 0,08$
N	5	5	5
$\gamma_{Loch} [\%]$	20	40	20
$d_{Kopf} [\text{\AA}]$	$11,69 \pm 0,01$	$10,39 \pm 0,04$	$8,67 \pm 0,09$
$\rho_{Kopf} [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]$	$12,50 \pm 0,02$	$13,10 \pm 0,02$	$13,32 \pm 0,05$
$d_{Kette} [\text{\AA}]$	30,3	$30,75 \pm 0,08$	$34,7 \pm 0,2$
$\rho_{Kette} [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]$	8,31	8,56	8,69
$\phi_{w,Kopf} [\%]$	$32,38 \pm 0,05$	$19,26 \pm 0,03$	$14,44 \pm 0,05$
$\sigma [\text{\AA}]$	$2,03 \pm 0,12$	$4,76 \pm 0,04$	$5,90 \pm 0,05$

teilweise auf die verringerte Anlagerung von H_2O -Molekülen zurückzuführen. Dies könnte die deutlich größeren Abnahmen von d_{Kopf} verglichen mit den in der Literatur berichteten Verläufen erklären. Weiter war durch die Einlagerung des Sterols eine Zunahme der Grenzflächen-Rauigkeiten σ zu beobachten. Dies kann durch die strukturellen Änderungen der Mischfilme verstanden werden. Die Einlagerung von Chol führt lokal zu einer größeren Bilagendicke, wohingegen an anderen Stellen anzunehmen ist, dass diese der Dicke reiner DMPC-Bilagen gleicht. Somit ist bei gleichmäßiger Verteilung des Sterols über die Bilagen davon auszugehen, dass es zu Unebenheiten kommt.

Die hier gezeigten Untersuchungen an trockenen Lipid-Oligobilagen und die nach den Anpassungen erhaltenen Ergebnisse sollten als Grundlage für komplexere Proben dienen. Die Einflüsse der Beimischung von Chol auf die Struktur von DMPC-Bilagen konnte anhand dreier Filme demonstriert werden. Aufgrund der vermutlich unvollständigen Hydratisierung der Kopfgruppen konnte die Änderung der entsprechenden Schichtdicken aufgrund struktureller Effekte jedoch nicht nachvollzogen werden. Hierzu sollten Proben in weiteren Experimenten wässrigen Medien ausgesetzt werden, was eine vollständige Hydratisierung gewährleistet.

5.3. Hydratisierte DMPC-Oligobilagen

In Abschnitt 5.1 wurden die strukturellen Änderungen trockener DMPC-Oligobilagen durch Beimischung von Chol demonstriert. Zur Beschreibung biologischer Systeme ist ein trockener Zustand jedoch nicht ausreichend. Die Membranen biologischer Zellen zum Beispiel trennt das Cytoplasma von der äußeren Umgebung. Bei beidem handelt es sich um wässrige Medien, wodurch die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide vollständig hydratisiert werden. Dies beeinflusst sowohl deren physikalischen als auch chemischen Eigenschaften. Außerdem ermöglichen Messungen unter Flüssigkeit den Einsatz verschiedener Lösungsmittel oder löslicher Komponenten, um den direkten Einfluss dieser *in situ* zu untersuchen.

Für die vorliegende Arbeit wurden Messungen mithilfe von NR, XRR, SE und ATR-FTIR an verschiedenen Systemen von Biomolekülen in wässrigen Medien durchgeführt. Es wurden zunächst Voruntersuchungen über den anzunehmenden Phasenzustand der untersuchten Proben bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Dies bietet erste Anhaltspunkte, um die mit Reflektometrie erhaltenen Profile anzupassen. Anschließend wurde der Einfluss von Salzen und AuNPs in der Flüssigphase auf die Struktur der Proben untersucht.

5.3.1. Phasenübergangstemperatur von hydratisierten DMPC-Oligobilagen

In kondensiertem Zustand bilden Lipide Nahordnungen aus, welche Phasen genannt werden. Diese sind sowohl vom atomaren Aufbau der Lipide selbst, als auch von äußeren Umständen, insbesondere der Temperatur, abhängig. Auch eine Mischung von Lipiden oder anderen einlagernden Molekülen, wie zum Beispiel Transmembranproteinen, kann die Struktur der Phasen beeinflussen. Charakterisiert werden Lipidphasen durch die unterschiedliche Ausrichtung der Kettengruppen im hydrophoben Teil der Lipidlagen oder -vesikel. Bei einem Phasenübergang ändern sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Strukturen, was auch mit einem veränderten Verhalten bezüglich der Interaktion mit

Fremdkörpern einher gehen kann. Somit können durch die Wahl der experimentellen Parameter, wie Temperatur und Probenzusammensetzung, die Ergebnisse maßgeblich beeinflusst werden. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muss deshalb sichergestellt werden, dass Experimente in einer bekannten Lipid-Phase durchgeführt werden, weshalb die Kenntnis dieser und der Phasenübergangstemperatur T_k von großer Bedeutung ist. Hierzu können über Techniken wie IR-Spektroskopie oder Differenzkalorimetrie die Lage der Phasenübergangstemperaturen bestimmt werden. Informationen über die molekulare Struktur der Lipidphasen liefern Methoden wie XRR oder NR.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Phasenübergangstemperatur von DMPC-Oligobilagen im wässrigen Milieu mithilfe von ATR-FTIR bestimmt. Hierfür wurde ein frisch gereinigter Si-ATR-Kristalle nach der in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Methode mit einer Lösung von 10 µg/ml Lipid rotationsbeschichtet und im Vakuum getrocknet. Dieser wurde anschließend in die in Abschnitt 4.3 beschriebene Probenzelle eingebaut, welche anschließend mit D₂O befüllt wurde. Als Hintergrundspektrum wurde eine perdeuterierte Octadecylthiol-SAM auf einem Au-beschichteten Si-Wafer verwendet. Die Temperatur der Probe wurde mithilfe eines Kryostaten eingestellt, welcher über einen Wasserkreislauf mit der Probenzelle verbunden war. Die Messungen starteten bei 20 °C, deutlich unter dem literaturbekannten Wert von $T_k = 24$ °C.^[179] Vor Beginn der Messung des IR-Spektrums wurde 30 – 60 min gewartet, damit die Probe ein thermodynamisches Gleichgewicht erreichen konnte. Anschließend wurde die Temperatur schrittweise um 1 °C erhöht und nach der genannten Wartezeit ein weiteres Spektrum aufgenommen. Nahe der erwarteten Lage von T_k wurde das Temperaturintervall auf 0,5 °C reduziert.

Der Phasenzustand der Lipide wurde anhand der CH₂-Banden charakterisiert (siehe Abbildung 5.6). Bereits ab $T = 22$ °C konnten an diesen Änderungen sowohl an der Bandenposition als auch -intensität festgestellt werden. Die Auswertung erfolgte anhand der Position, da der hier beobachtete Effekt in der Literatur wohldokumentiert ist.^[186] Diese wurde nach Basislinien-Korrektur der Spektren durch Anpassung von Lorentz-Peaks ermittelt. Wie in Abbildung 5.6 A zu erkennen ist, verschieben beide Peaks hin zu höheren Wellenzahlen. Am Verlauf der Peakpositionen ist deutlich zu erkennen, dass die Messung zu früh beendet wurde, um den finalen Zustand der Lipide eindeutig zu charakterisieren. Während der Messung war dies jedoch nicht ersichtlich, da die spektralen Änderungen, wie in Abbildung 5.6 B zu sehen, gering waren. Aus diesem Grund wurden nach Erreichen einer Temperatur von $T = 26$ °C die Untersuchungen an der Probe beendet.

Peakpositionen zeigten in Abhängigkeit der Temperatur einen sigmoidalen Verlauf. Dieser wurde mithilfe einer Boltzmann-Funktion angepasst.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (5.3)$$

Tabelle 5.3: Erhaltene Phasenübergangstemperaturen T_k nach Anpassung der beobachteten Verschiebungen der CH_2 -Streckschwingungsbanden.

Schwingungsbande	T_k [°C]	R^2
$\nu_{\text{CH}_2, \text{asym}}$	$23,89 \pm 0,19$	$> 0,98$
$\nu_{\text{CH}_2, \text{sym}}$	$24,05 \pm 0,17$	$> 0,98$

Hierbei entsprechen die Parameter A_1 und A_2 der Lage der Absorptionsbanden vor, respektive nach dem Phasenübergang, die Temperatur entspricht dem Parameter x . Die Phasenübergangstemperatur T_k wird somit am Wendepunkt der Funktion bei x_0 angenommen. Beide Kurvenverläufe wurden getrennt voneinander angepasst und zeigten eine hohe Fitgüte von $R^2 > 0,98$. Dies spricht dafür, dass trotz des verfrühten Abbrechens der Messung belastbare Ergebnisse zu erwarten sind. Die erhaltenen T_k sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Die aus den beiden Schwingungsbanden abgeleiteten Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenzen miteinander und ebenso mit dem Literaturwert von $T_k = 24^\circ\text{C}$ überein.^[179] Die beobachteten Verläufe der Schwingungsbanden sprechen jedoch dafür, dass erste strukturelle Änderungen bereits bei niedrigeren Temperaturen stattfinden. Somit sollten weitergehende Untersuchungen mindestens 2°C von der Phasenübergangstemperatur entfernt stattfinden, um einen eindeutigen Zustand der Probe zu gewährleisten.

Wie oben erwähnt wurde zusätzlich zur Verschiebung der Schwingungsbanden eine Abnahme der Bandenintensitäten festgestellt. Hierbei wurde jedoch die deutliche Zunahme der Bandenbreite, wie sie in der Literatur beschrieben wird nicht beobachtet.^[186] Da in anderen Untersuchungen mit NR festgestellt wurde, dass bei erhöhter Temperatur die Dicke der Wasserzwichenschichten zunimmt, kann jedoch gefolgert werden, dass somit auch die Absorption der Oligo-Bilagen in ATR-IR-Spektroskopie abnimmt, da so die Interaktion des Probenmaterials mit dem evaneszenten Feld reduziert wird.^[16] Tatsächlich zeigt eine Simulation von 15 DMPC-Bilagen mit den in Abschnitt 4.4.1 erhaltenen Werte für Lipid- und Wasserschichtdicken ober- und unterhalb von T_k eine resultierende Abnahme der Bandenintensität um etwa 18%, während in den in Abbildung 5.6 B gezeigten Spektren ein Signalverlust von etwa 20% zu beobachten war. Die Simulation kann jedoch etwaige Löcher in den Lipid-Lagen, welche durch die Flüssigphase ausgefüllt werden, nicht berücksichtigen. In den genannten Untersuchungen wurde ein geringerer Wasseranteil in diesen oberhalb von T_k festgestellt, was einen gegenläufigen Effekt zur Folge hätte. Jedoch muss hier auch erwähnt werden, dass in der genannten Untersuchung zwei verschiedene Proben untersucht wurden. Um ein vollständiges und verlässliches Bild zu den Hintergründen der beobachteten Abnahme der Schwingungsbanden zu erhalten, müsste die in diesem Abschnitt beschriebene Untersuchung an einem kombinierten Messaufbau durchgeführt werden, wie er in Kapitel 4 beschrieben wird, welcher zusätzlich strukturelle Informationen über die Probe liefert. Eine solche Untersuchung bedürfte jedoch viel Messzeit an einem Neutronenreflektometer, welche für die vorliegende Arbeit nicht zur Verfügung stand.

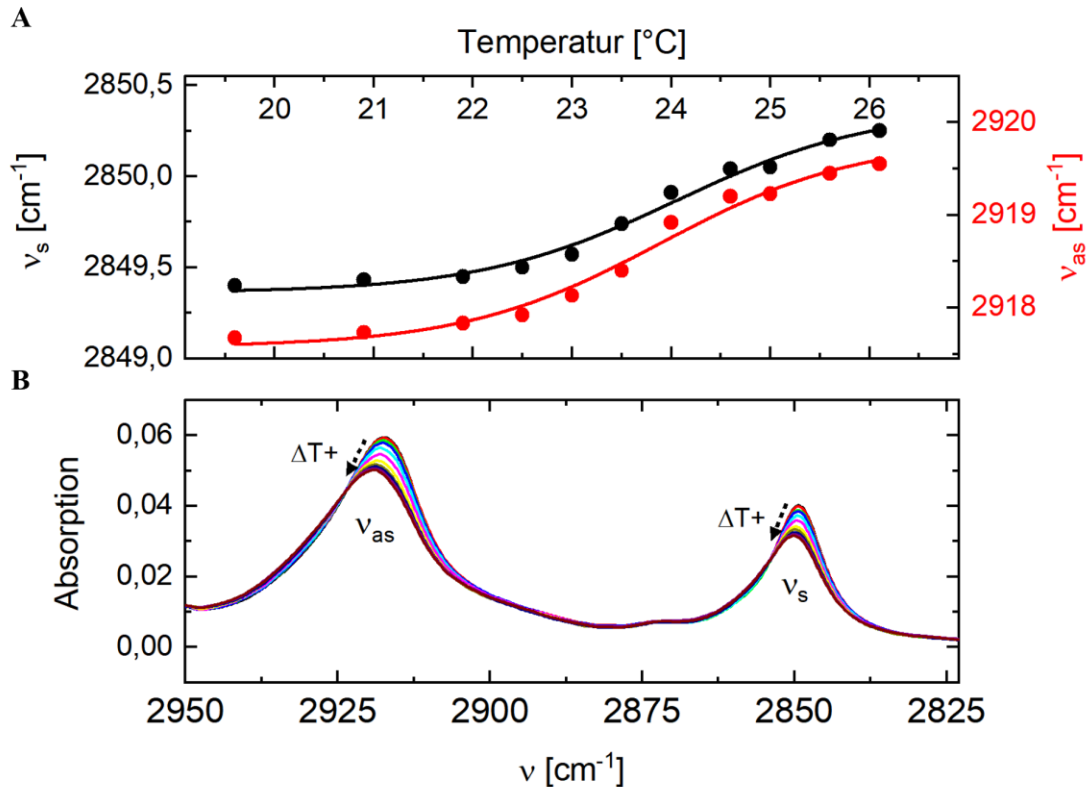


Abbildung 5.6: Einfluss der Temperatur auf die CH_2 -Valenzschwingungsbanden von DMPC-Oligobilagen, gemessen mit ATR-FTIR-Spektroskopie. **A:** Verschiebung der Lage der symmetrischen und asymmetrischen CH_2 -Valenzschwingungsbande bei Erhöhung der Temperatur. Die erhaltenen Messpunkte wurden mithilfe einer Boltzmann-Funktion angepasst, $R^2 > 0,98$. **B:** Zugehörige IR-Spektren. Zusätzlich zur Verschiebung kann eine Abnahme der Bandenintensität beobachtet werden.

5.3.2. Interaktion von hydratisierten DMPC-Oligobilagen mit Gold-Nanopartikeln und Magnesiumchlorid

Mithilfe der oben genannten Messmethoden sollte der Einfluss von AuNPs auf DMPC-Oligobilagen untersucht werden. Hier waren insbesondere auch strukturelle Änderungen der Proben von Interesse. Hierzu kamen sowohl strukturauflösende Methoden wie NR und XRR zur Verwendung als auch ATR-IR-Spektroskopie. Letzteres gibt wie bereits beschrieben Aufschluss auf den Phasenzustand der Lipide, welcher durch die Interaktion mit Fremdkörpern gestört werden kann. Reflektometrie hingegen ist in der Lage, detailliertere Einblicke in die internen Strukturen der Proben zu liefern. Um den Abstand der Bilagen zu regulieren können Salze wie MgCl_2 verwendet werden.^[187] Kationen können an die Kopfgruppen der Lipide anlagern und führen so zu Coulomb-Repulsion der Bilagen. Der resultierende Abstand wird dann durch ein Kräftegleichgewicht zwischen der repulsiven Coulomb-Wechselwirkung und attraktiven van-der-Waals-Wechselwirkungen verursacht.^[15] Dies ist auch hinsichtlich der Untersuchung biomimetischer Membranen interessant, da das Zytosol biologischer Zellen ebenfalls Salze enthält, welche mit der Zellmembran interagieren.^[159]

Es wurden Proben analog zu den Untersuchungen von T_k per Rotationsbeschichtung präpariert. Für NR und ATR-IR-Spektroskopie wurden analoge Si-Substrate wie oben beschrieben verwendet. Für XRR

5. Untersuchung der Interaktion von kationischen Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Bilagen

wurden 2'' Si-Wafer mit den Lipiden beschichtet, welche anschließend für die Flüssigkeitszellen zurechtgeschnitten wurden.

Untersuchungen an DMPC-Oligobilagen unter Wasser mit XRR waren nicht erfolgreich, da die Proben beim Befüllen der Flüssigkeitszelle ausnahmslos zerstört wurden. Dies war wahrscheinlich auf die unterschiedliche Lage der Proben innerhalb der Probenzellen zurückzuführen. Aufgrund der Bauweise der XRR-Flüssigkeitszelle befindet sich hier das gesamte Substrat in der verwendeten Flüssigkeit, während bei der NR-Flüssigkeitszelle nur ein Teil der beschichteten Substratoberfläche, welcher durch einen O-Ring abgegrenzt wird, mit der Flüssigkeit in Kontakt kommt (vergleiche Abbildung 3.5 (XRR-Zelle) und Abbildung 4.4 (NR-Zelle)). Gerade an den Rändern der Beschichtung ist mit Fehlstellen aufgrund des Zuschneidens der Wafer zu rechnen, von denen sich die Filme ablösen könnten. Die genaue Ursache konnte jedoch nicht ermittelt werden. Die Beimischung von Chol schien einen stabilisierenden Effekt auf die Oligobilagen zu haben, so dass auch XRR-Messungen unter Wasser ermöglicht wurden. Diese Experimente werden jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht behandelt, da keine guten Anpassungen der XRR-Profile erzielt werden konnten.

Hingegen konnten hydratisierte DMPC-Oligobilagen mithilfe von NR untersucht werden. Die hier präsentierten Ergebnisse stammen aus einer Messzeit am Instrument D6 des Helmholtz-Zentrums Berlin. Eine simultane Messung mit komplementären Methoden war aufbaubedingt nicht möglich. Vor der Messung wurde die Probe in die Flüssigkeitszelle eingespannt, welche dann mit D₂O befüllt wurde. Das System wurde mithilfe eines externen Kryostaten auf 20 °C temperiert und für etwa vier Stunden ruhen gelassen, damit die Probe ein thermodynamisches Gleichgewicht erreichen konnte. Nach jeder Änderung an der Flüssigphase wurde dem System etwa acht Stunden zum Erreichen des Gleichgewichts gegeben, bevor die Probe erneut vermessen wurde.

Tabelle 5.4: Verwendetes Modell zur Anpassung der Neutronenreflektometrie-Messungen an DMPC-Oligobilagen. Zahlenwerte stellen feste Parameter dar, alle anderen Parameter wurden zur Modellierung der NR-Profile angepasst. Identisch benannte Parameter sind zwischen den einzelnen Schichten verknüpft und somit die Anpassungswerte identisch. Die Dicken der hydratisierten Lipid-Schichten wurden der Literatur entnommen, ebenso die SLD der Kettenschichten, sowie die Parameter der Siliziumoxid-Schicht und der Silizium-Bulkphase. Die $iSLD$ und Wasseranteile $\phi_{w, lip}$ wurden in allen Bilagen-Schichten gleich angenommen. Die ϕ_w der Wasserzwichenschichten ist auf 100% festgelegt, da es sich hier um Teile der Flüssigphase zwischen den Bilagen handelt. Die Rauigkeit σ wurde in an allen Grenzflächen als gleich angenommen und angepasst und ist deshalb zugunsten der Übersichtlichkeit hier nicht eingetragen.

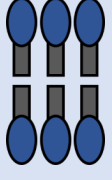
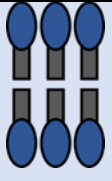
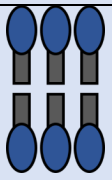
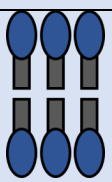
		Wiederholungen	d [Å]	SLD [10^{-6}Å^{-2}]	$iSLD$ [10^{-6}Å^{-2}]	ϕ_w [%]
Si	Silizium	—	—	$2,07^{[140]}$	0	0
SiO _x	Silizium-oxid	1	$15^{[182]}$	$3,47^{[140]}$	0	0
	Kopf	1	$12,7^{[14, 34]}$	ρ_{Kopf}	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	Ketten		$30,3^{[34]}$	$-0,4^{[140]}$	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	Kopf		$12,7^{[14, 34]}$	ρ_{Kopf}	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	D ₂ O 1		d_{w1}	—	—	100
	Kopf	$N - 3$	$12,7^{[14, 34]}$	ρ_{Kopf}	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	Ketten		$30,3^{[34]}$	$-0,4^{[140]}$	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	Kopf		$12,7^{[14, 34]}$	ρ_{Kopf}	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	D ₂ O 2		d_{w2}	—	—	100
	Kopf	1	$12,7^{[14, 34]}$	ρ_{Kopf}	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	Ketten		$30,3^{[34]}$	$-0,4^{[140]}$	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	Kopf		$12,7^{[14, 34]}$	ρ_{Kopf}	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	D ₂ O 3		d_{w3}	—	—	100
	Kopf	1	$12,7^{[14, 34]}$	ρ_{Kopf}	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	Ketten		$30,3^{[34]}$	$-0,4^{[140]}$	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	Kopf		$12,7^{[14, 34]}$	ρ_{Kopf}	$i\rho_{lip}$	$\phi_{w, lip}$
	D ₂ O (Bulk)	—	—	ρ_{D_2O}	0	—

Tabelle 5.4 zeigt das angenommene Modell der DMPC-Oligobilagen aufgrund derer die Anpassung der NR-Daten stattfand. Dieses stammt aus vorangegangenen Arbeiten des Arbeitskreises Dahint und wurde in Zusammenarbeit mit Andreas Stöcklin für die vorliegenden Ergebnisse modifiziert.^[14, 155-156] Da aus Voruntersuchungen bekannt war, dass sich die Probe bei 20 °C in der $P_{\beta'}$ -Phase befinden musste, konnten die Dicken der Lipid-Schichten, sowie die SLD der Lipid-Kettenschichten aus der Literatur übernommen werden.^[34, 140] Zwar ist auch die SLD hydratisierter Kopfgruppen literaturbekannt und könnte somit festgelegt werden, jedoch ist denkbar, dass bei der Interaktion mit Fremdstoffen wie Salzen oder AuNPs eine Anlagerung an die Kopfgruppen erfolgt, die sich auch auf die SLDs der Schicht auswirken könnte. Um diesen Effekt zu erörtern wurde der entsprechende Parameter mit angepasst. Es wurden insgesamt $(N - 3)$ Bilagen mit identischen Wasserzwichenschichten angenommen, wobei die

5. Untersuchung der Interaktion von kationischen Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Bilagen

erste (d_{w1}) und letzte (d_{w3}) Wasserzwichenschicht separat zu den inneren (d_{w2}) angepasst wurde. Im Falle der Messung unter D_2O ermöglichte die Präsenz von Kiessig-Oszillationen und deren Periodizität eine initiale Abschätzung von N . Für andere Probenbedingungen waren keine Kiessig-Oszillationen zu erkennen, weshalb hier die Optimierung von N nur über die Variation des Parameters zwischen den Anpassungs-Iterationen möglich war.

Für alle Grenzflächen wurde dieselbe Rauigkeit σ und iSLD angenommen. Letztere liegt höher als in der Literatur übliche Werte um Effekte von off-spekularer Streuung zu berücksichtigen, die die Intensität der Totalreflexionskante vom theoretischen Wert von Eins abweichen lassen. Im zur Anpassung verwendeten Programm kann außerdem in jeder Schicht der Anteil der Volumenphase, welche die Schicht darstellt, welche am weitesten von der Grenzfläche, an der die erste Reflexion stattfindet, berechnet werden. Im Falle von NR, wobei der Neutronenstrahl von der Seite des Silizium-Substrats einfällt und somit die verwendete Flüssigkeit die Rückseite der Probe darstellt, entspricht dies dem Anteil der Flüssigphase in den Bilagen $\phi_{w,i}$. Im Gegensatz dazu beschreibt diese Schicht bei XRR-Messungen das Substrat, sodass hier der Anteil der Flüssigkeit, beziehungsweise Fehlstellen in den Schichten über die in Abschnitt 5.2.2 beschriebenen Methode der Kombination zweier unterschiedlich aufgebauter Modelle verwendet werden müsste. Durch die Anteile der Volumenphase in einer Schicht i wird im SLD-Profil des Modells die effektive SLD $\rho_{i,eff}$ aufgetragen, welche sich aus der SLD der reinen, beziehungsweise hydratisierten Schicht ρ_i und derer der Flüssigphase ρ_w ergibt. Aus den Anpassungsparametern kann dann ρ_i erhalten werden:

Tabelle 5.5: Erhaltene Parameter der Anpassungen von DMPC-Oligobilagen bei Interaktion mit $MgCl_2$ und AuNP unter Verwendung des in Tabelle 5.4 beschriebenen Modells. Der Quellfaktor der inneren Wasserzwichenschichten wurde über die Änderung der Dicke der inneren Wasserzwichenschicht $d_{w,i}$ der Probenbedingung i verglichen mit dem analogen Parameter der Messung unter D_2O d_{w,D_2O} nach $S_{w2,i} = d_{w2,i}/d_{w,D_2O}$ berechnet. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird nur der Quellfaktor der inneren Wasserzwichenschichten S_{w2} angegeben.

Parameter	D_2O	50 mM $MgCl_2$	25 mM $MgCl_2$	10 $\frac{\mu g}{ml}$ 5 nm AuNP
$\chi^2 [10^3]$	1,23	0,76	1,05	1,17
$\Delta Q/Q [\%]$	$4,42 \pm 0,28$	$16,23 \pm 0,04$	$15,09 \pm 0,13$	$13,81 \pm 0,02$
N	15	8	6	6
$d_{w1} [\text{\AA}]$	$6,57 \pm 0,20$	$37,3 \pm 1,3$	$40,4 \pm 1,0$	$40,2 \pm 0,9$
$d_{w2} [\text{\AA}]$	$8,77 \pm 0,01$	$87,1 \pm 0,2$	$119,7 \pm 0,3$	$124,3 \pm 0,3$
$d_{w3} [\text{\AA}]$	$16,54 \pm 0,16$	$98,0 \pm 0,4$	$160,1 \pm 0,5$	$183,0 \pm 0,5$
$\rho_{Kopf} [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]$	$3,68 \pm 0,04$	$3,74 \pm 0,10$	$3,82 \pm 0,12$	$3,89 \pm 0,12$
$i\rho_{lip} [10^{-8} \text{\AA}^{-2}]$	$8,63 \pm 0,08$	$23,1 \pm 0,7$	$29,2 \pm 0,9$	$27,8 \pm 0,8$
$\rho_w [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]$	$6,20 \pm 0,01$	ρ_{w,D_2O}	ρ_{w,D_2O}	ρ_{w,D_2O}
$\phi_{w,lip} [\%]$	$17,4 \pm 0,4$	24 ± 1	23 ± 2	25 ± 2
$\sigma [\text{\AA}]$	$6,32 \pm 0,17$	$25,9 \pm 0,2$	$26,8 \pm 0,2$	$26,9 \pm 0,2$
S_{w2}	1	$9,93 \pm 0,01$	$13,65 \pm 0,02$	$14,17 \pm 0,02$

$$\begin{aligned}\rho_{i,eff} &= \rho_i \cdot (1 - \phi_{w,i}) + \rho_w \cdot \phi_{w,i} \\ \rho_i &= \frac{\rho_{i,eff} - \rho_w \cdot \phi_{w,i}}{1 - \phi_{w,i}}\end{aligned}\quad (5.4)$$

$\phi_{w,lip}$ wurde dabei als Anteil der Fehlstellen in den Bilagen interpretiert und in allen den Lipiden zugeordneten Schichten als identisch angenommen. Diese werden als homogen ohne ausgeprägte Domänenbildung über die Bilagen verteilt angenommen, weshalb sie aufgrund der größeren Kohärenzlänge der Neutronenstrahlung gemittelt werden. Von einer separaten Anpassung von $\phi_{w,i}$ in den einzelnen Schichten ist abzusehen, um den Parameterraum möglichst klein zu halten. Da der für das SLD-Profil relevante Wert $\rho_{i,eff}$ sowohl von ρ_i als auch $\phi_{w,i}$ abhängig ist, können diese Parameter des Modells nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Durch die Einschränkung, dass $\phi_{w,i}$ in allen Lipid-Lagen gleich ist, wird jedoch der Raum möglicher Kombinationen für ρ_i genug eingeschränkt, dass die Anpassung beider Parameter möglich ist. Dennoch ist dieser Umstand bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen. Ferner wurde auch die SLD der Flüssigphase ρ_w angepasst, um mögliche Verunreinigungen oder gelöste Gase in dieser zu berücksichtigen und eine gute Anpassung der Totalreflexionskante zu erzielen. Da die verwendeten Salz- und NP-Konzentrationen gering sind, kann davon ausgegangen werden, dass ρ_w für die hier beschriebenen Untersuchungen in Näherung konstant bleibt, weshalb dieser Parameter für alle Anpassungen gleichgesetzt wurde. Die Anpassungen erfolgten für alle Probenbedingungen simultan, wodurch ρ_w so variiert wurde, dass die Anpassungsgüte für die Gesamtheit aller Messungen optimiert wurde. Abbildung 5.7 zeigt die erhaltenen Daten mit der besten Anpassung. Die so erhaltenen Parameter sind in Tabelle 5.5 aufgeführt.

Wie anhand der Lage des Bragg-Peaks unschwer zu erkennen ist, führte die Zugabe von 50 mM MgCl_2 zu einem starken Quellen der Probe. Für die innere Wasserzwichenschicht wurde ein Quellfaktor von $S_{w2} = d_{w2}/d_{w2,D_2O} = 9,93 \pm 0,01$ erhalten. Der Abstand der Bilagen zueinander kommt wie oben genannt durch ein Kräftegleichgewicht zwischen attraktiven van-der-Waals- und repulsiven Coulomb-Kräften zustande.^[15] Durch Anlagerung von Mg^{2+} -Ionen an den Lipid-Kopfgruppen kommt es zu elektrostatischer Repulsion zwischen den Lagen, weshalb das Gleichgewicht bei einem größeren Lagenabstand erreicht wird. Die SLD der Kopfgruppen ρ_{Kopf} blieb dabei jedoch innerhalb der Fehlergrenzen unverändert.

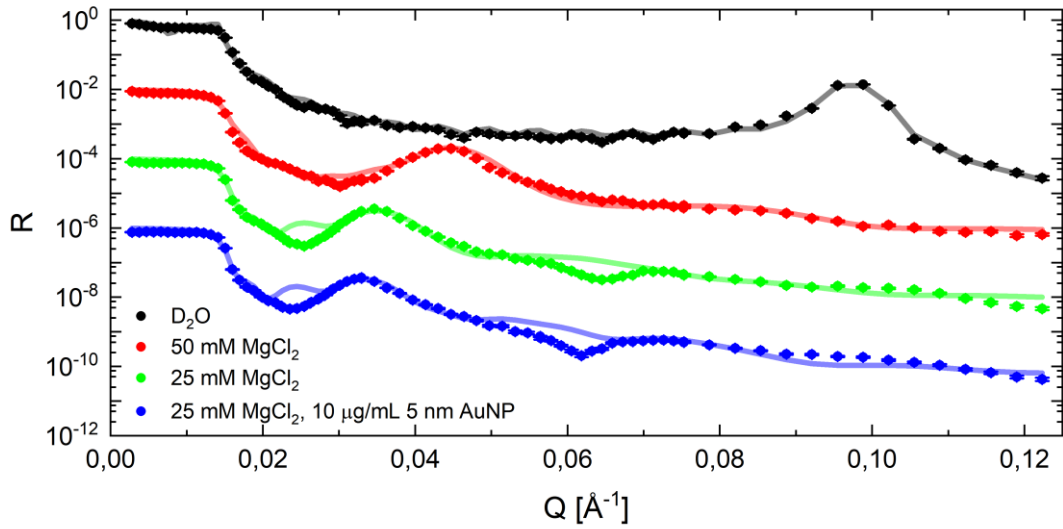


Abbildung 5.7: Erhaltene NR-Profile von DMPC-Oligobilagen auf Si-Substraten unter D_2O und nach Zugabe von $MgCl_2$ und AuNP. Anpassungen nach dem in Tabelle 5.4 beschriebenen Modell sind als durchgezogene Linien eingezeichnet. Die so erhaltenen Parameter sind in Tabelle 5.5 zu finden.

Gleichzeitig konnte durch die Anpassung ein Verlust von sieben der ursprünglich fünfzehn Bilagen ermittelt werden, was sich auch in einem breiteren Bragg-Peak äußerte. Wie oben bereits erwähnt, waren nach Zugabe von $MgCl_2$ keine Kiessig-Oszillationen mehr zu erkennen, weshalb die Zahl der Bilagen über Variation zwischen den Anpassungsiterationen bestimmt wurde. Das starke Quellen der Probe führte weiterhin zu einer großen Zunahme der Rauigkeit σ der einzelnen Schichten, sowie einer starken Zunahme des Wasseranteils der Lipidschichten $\phi_{w,lip}$. Es ist naheliegend, dass durch den großen Abstand der Bilagen sowohl deren Welligkeit aufgrund geringerer Stabilisierung durch benachbarte Lagen zunimmt, als auch, dass es zu einem teilweisen Materialverlust innerhalb der Lagen kommen kann. Gleichzeitig nahm die iSLD der Lipide $\rho_{i,lip}$ um einen Faktor von $\sim 1,67$ zu, was für eine deutliche Zunahme der off-spekularen Streuung durch den Quellprozess spricht. Die angepassten NR-Profile für die Messungen unter reinem D_2O und 50 mM $MgCl_2$ entsprechen den Rohdaten sehr gut und lassen somit eine hohe Verlässlichkeit der erhaltenen Parameter vermuten.

Beim Verdünnen der Flüssigphase auf 25 mM $MgCl_2$ kam es zu einem weiteren Quellen der Oligobilagen, wobei die Dicke der ersten Wasserzwichenschicht am wenigsten zunahm. Der Quellfaktor relativ zur Messung unter D_2O erhöhte sich auf $S_{w2} = 13,65 \pm 0,02$. Auch ergab ein Anpassen der Reflexionsprofile einen Verlust von zwei weiteren Bilagen. Da nicht davon auszugehen ist, dass sich mehr Mg^{2+} -Ionen als zuvor an den Kopfgruppen anlagern, ist der beobachtete Effekt durch eine verringerte Abschirmung durch die gelösten Ionen zu erklären. Hierdurch nimmt die elektrostatische Repulsion der Bilagen weiter zu, und das Kräftegleichgewicht wird entsprechend bei größeren Bilagenabständen erreicht. Auch σ und $\rho_{i,lip}$ nehmen leicht zu, was für eine weitere Abnahme der Biegesteifigkeit und Zunahme off-spekularer Streuung spricht. Dahingegen war kaum Einfluss auf $\phi_{w,lip}$ zu erkennen, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass kein weiterer Lipid-Verlust innerhalb der Bilagen stattfand. Auch ρ_{Kopf} änderte sich nicht signifikant.

Bei Zugabe von 10 µg/ml 5 nm AuNP wurde ein weiteres Quellen der Probe festgestellt. Gegenüber der vorherigen Messung wurde ein Zuwachs für die Dicken aller Wasserzwichenschichten mit Ausnahme der ersten festgestellt, welche sich nicht signifikant änderte. Grund dafür könnte sein, dass NPs mit einer Größe von 5 nm zu groß sind, als dass sie in die erste Wasserzwichenschicht eindringen könnten. Der Quelfaktor der inneren Wasserzwichenschicht erhöhte sich auf $S_{w2} = 14,17 \pm 0,02$. Die anderen angepassten Parameter blieben dabei weitestgehend unverändert, was dafür spricht, dass die Partikel einen geringen Einfluss auf die Struktur der Oligobilagen hatten. Tatsächlich war in vielen Folgeexperimenten auch das hier gezeigte Quellen der Probe nicht zu erkennen, wobei gesagt werden muss, dass es sich bei NPs um metastabile Substanzen handelt und deshalb auch bei Benutzung derselben Charge durch zeitliche Distanz der Experimente durchaus mit Abweichungen der Ergebnisse zu rechnen ist.

Bei näherer Betrachtung der Kurvenverläufe in Abbildung 5.7 fällt auf, dass verglichen mit den Messungen unter D₂O oder 50 mM MgCl₂ das angepasste Reflexionsprofil der letzten beiden Messungen Abweichungen von den Rohdaten aufweist. Insbesondere in den Bereichen von $(0,02 \sim 0,03) \text{ \AA}^{-1}$ und $(0,05 \sim 0,07) \text{ \AA}^{-1}$ ist zu erkennen, dass der aus den erhaltenen Parametern errechnete Verlauf über den gemessenen Werten liegt. Es ist unter Umständen möglich, durch ein gemischtes Modell, wobei eine der beiden Strukturen mehr Bilagen aufweist als die andere, bessere Ergebnisse zu erzielen. In der Arbeitsgruppe Dahint wurden mit einem solches Modell von Andreas Stöcklin bessere Anpassungen erhalten.^[156] Für die vorliegende Arbeit war der Einsatz eines solchen Modells jedoch wenig erfolgreich, weshalb auf den Einsatz dessen verzichtet und ein weniger komplexes Modell verwendet wurde.

Wie oben bereits erwähnt war eine simultane Messung mit komplementären Methoden bei dem beschriebenen Experiment nicht möglich. Es wurde stattdessen zu einem späteren Zeitpunkt die Interaktion von AuNPs mit hydratisierten DMPC-Oligobilagen mithilfe von ATR-IR-Spektroskopie untersucht. Hierfür wurden Partikel aus demselben Ansatz verwendet, welcher auch für obenstehende Experimente mit NR verwendet wurden. Als Hintergrund wurde dabei das Spektrum eines Goldbedampften Silizium-Wafer aufgenommen, welcher mit einer perdeuterierten Octadecanthiol-Monolage beschichtet war. Auch bei diesem Experiment wurde als Ausgangspunkt die Flüssigkeitszelle mit reinem D₂O befüllt. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit NR kann bei Messungen mit ATR-IR-Spektroskopie der Probenzustand durchgehend überprüft und anhand der Intensität der CH₂-Valenzschwingungsbanden beurteilt werden, ob das System einen Gleichgewichtszustand erreicht hat. Die erhaltenen Spektren wurden einer Basislinienkorrektur unterzogen und anschließend die CH₂-Valenzschwingungsbanden mithilfe von Lorentz-Funktionen angepasst. Die so erhaltenen Spektren und Bandenintensitäten sind in Abbildung 5.8 dargestellt.

5. Untersuchung der Interaktion von kationischen Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Bilagen

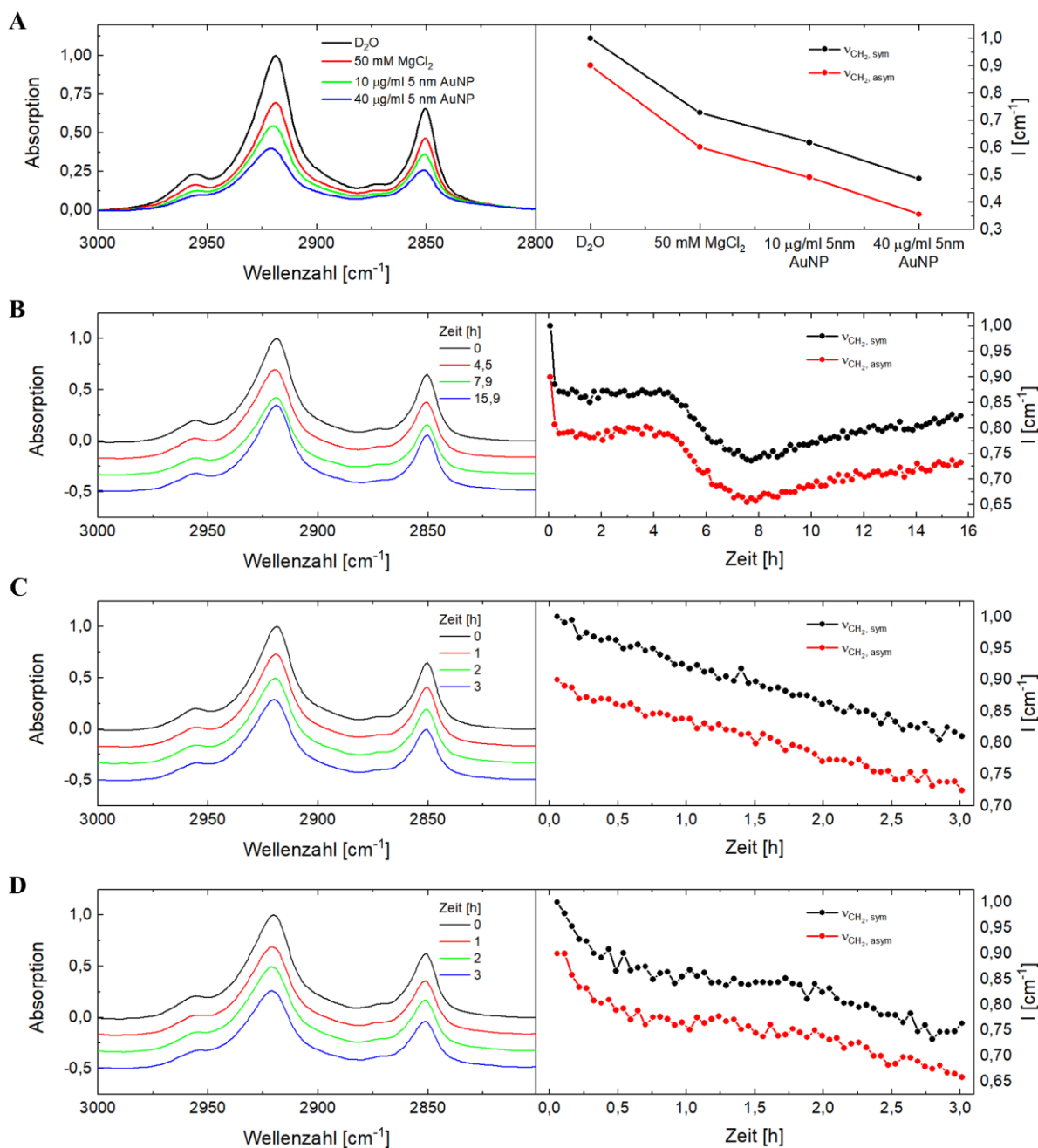


Abbildung 5.8: Änderungen der CH_2 -Valenzschwingungsbanden von DMPC-Oligobilagen bei Interaktion mit MgCl_2 und AuNPs, untersucht mit ATR-FTIR-Spektroskopie. Die linke Seite zeigt ausgewählte Spektren der Messserien, die rechte Seite die Entwicklung der CH_2 -Valenzschwingungsbanden nach Anpassung mit Lorentz-Funktionen, normiert auf den jeweiligen Startwert. **A** Finale Spektren der Messserien unter den untersuchten experimentellen Bedingungen. **B** Interaktion mit 50 mM MgCl_2 (Schritt 2), untersucht über 16 h. **C** Interaktion mit 10 $\mu\text{g/ml}$ 5 nm AuNP (Schritt 3), untersucht über 3 h. **D** Interaktion mit 40 $\mu\text{g/ml}$ 5 nm AuNP (Schritt 4), untersucht über 3 h.

Die Zugabe von MgCl_2 führte zu einer deutlichen Abnahme der Bandenintensitäten (siehe Abbildung 5.8 B). Dies deckt sich mit den aus NR erhaltenen Ergebnissen, nach denen es sowohl zu einem Quellen der Probe als auch zu einem Verlust äußerer Bilagen kommt. Beides führt zu geringeren Bandenintensitäten, da die Interaktion des evaneszenten Feldes mit Lipiden somit reduziert wird. Eine

quantitative Aussage kann jedoch nicht getroffen werden, da hierfür zu viele unbekannte Parameter vorhanden sind (siehe Abschnitt 3.7.1). Hätten bei diesem Experiment simultan komplementäre NR-Messungen durchgeführt werden können, wären genauere Aussagen über die physikalischen Ursachen der beobachteten Intensitätsverluste möglich gewesen. Auf eine anschließende Verdünnung der Flüssigphase, wie bei den Untersuchungen mit NR wurde verzichtet, da sich in der Zwischenzeit 50 mM als Konzentration der Wahl bei Quellexperimenten erwiesen hat. Der Einsatz dieser Konzentration resultiert in weniger Lagenverlust, dennoch ist die Quellung in der Regel noch ausreichend, damit AuNPs in die Wasserzwichenschichten eindringen können. Weiter ähnelt die so erreichte Ionenstärke von $I = 150 \text{ mM}$ derer, die auch in Mitochondrien von Säugetieren zu finden ist.^[159] Man versprach sich daher, dass die beobachteten Effekte auf reelle biologische Systeme zu übertragen sind. Das System wurde über Nacht durchspült, um einen Gleichgewichtszustand zu gewährleisten. Nach Beurteilung des Verlaufs der Bandenintensitäten im Messprogramm war davon auszugehen, dass dieser erreicht wurde. Bei der finalen Auswertung der Bandenintensitäten zeigte sich ein komplexer Verlauf, welcher zum Ende der Messung noch nicht gegen einen Grenzwert konvergierte. Es wurde zunächst eine Abnahme der Intensität um etwa 11% in den ersten Messpunkten beobachtet. Anschließend zeigte sich für etwa 4,5 h ein Plateau, woraufhin weitere 14% der Bandenintensitäten über einen Zeitraum von 3,5 h verloren gingen. In den darauffolgenden 8 h wurde dann eine langsame Zunahme der Intensitäten bis zu einem letzten Messwert von etwa 83% des ursprünglichen Wertes beobachtet. Gleichzeitig wurden die Positionen der Valenzschwingungsbanden zunächst um etwa $0,6 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{CH}_2, \text{sym}}$), beziehungsweise $1,2 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{CH}_2, \text{asym}}$) erhöht, und näherten sich über den restlichen Verlauf der Messungen ihrem ursprünglichen Wert an, was für eine Störung der Ordnung im Kettengruppen-Bereich der Lipid-Bilagen durch den Quellprozess mit anschließender Relaxation des Systems spricht. Auch hier konnte kein Erreichen eines Grenzwertes erkannt werden konnte. Somit kann hier nicht von einem System im Gleichgewicht gesprochen werden. Die Hintergründe des beobachteten Verlaufs können nur schwer erklärt werden, da ATR-FTIR-Spektroskopie nur wenige Informationen über die Probenstruktur liefern kann. Es wäre möglich, dass die ersten Änderungen der Absorptionsbanden auf den Quellprozess zurückzuführen sind, und der zweite beobachtete Intensitätsverlust auf ein Ablösen äußerer Lagen. Die darauffolgende Zunahme der Bandenintensität könnte auf Adsorption der durch den Ablöseprozess entstandenen Vesikel oder auf ein Relaxieren der verbliebenen Banden und somit verkleinerte Bilagenabstände hinweisen. Ohne komplementäre Messtechniken handelt es sich hier jedoch lediglich um Spekulationen.

Dem System wurde anschließend eine Lösung von 5 nm AuNP in D_2O zugegeben, sodass eine AuNP-Konzentration von $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$ resultierte. Hierbei wurde eine weitere Abnahme der Bandenintensität beobachtet (siehe Abbildung 5.8 C), was sich mit den oben beschriebenen Ergebnissen der Untersuchung von DMPC-Oligobilagen mit NR deckt, jedoch kann hier erneut nicht zwischen Lagenverlust und Quellverhalten der Probe unterschieden werden. Die Auswertung der Bandenintensitäten über alle Messpunkte zeigte einen annähernd linearen Verlauf, der jedoch zum Zeitpunkt der Messung nicht erkannt wurde. Somit ist davon auszugehen, dass das System auch hier noch nicht den Gleichgewichtszustand erreicht hatte. Gleichzeitig wurden erneut beide Bandenpositionen zu größeren Wellenzahlen verschoben. Die letzten gemessenen Werte waren um $0,5 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{CH}_2, \text{sym}}$) und $1,0 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu_{\text{CH}_2, \text{asym}}$) gegenüber den Anfangswerten erhöht, was für Änderungen in der Struktur innerhalb des Kettengruppen-Bereichs der Lipid-Bilagen durch Interaktion

mit den zugesetzten AuNPs spricht. Auch hier konnte ein nahezu linearer Verlauf beobachtet werden, welche zum Ende der Messserie nicht konvergierte. Ursache der beobachteten Änderungen könnte ein Eindringen der NPs in die Bilagen sein. Ein ähnliches Verhalten von AuNPs in Kontakt mit Lipiden wurde in der Literatur beschrieben.^[131, 188-189] Das gemessene IR-Spektrum kann somit als Summe der Struktur der Lipide, welche in Kontakt zu den Partikeln stehen, und denen, die nicht mit diesen in Kontakt sind, verstanden werden. Einen ähnlichen Schluss lässt die Betrachtung der Bandenbreiten zu, welche im Verlauf der Messserie um etwa 7% zunahmen. Um eine belastbare Aussage über den Interaktionsmechanismus zu treffen, reichen die Informationen, die das hier beschriebene Experiment liefert, jedoch nicht aus.

Die Erhöhung der AuNP-Konzentration auf 40 µg/ml verstärkte den beobachteten Effekt. Es war eine erneute Abnahme der Bandenintensitäten um etwa 15% über 50 min zu beobachten, während die Bandenpositionen zu höheren Wellenzahlen verschoben wurden. Während der Verlauf der Bandenintensitäten daraufhin ein Konvergieren gegen einen Grenzwert erahnen ließ, wurde ähnlich wie bei der Zugabe von MgCl₂ nach etwa 2 h eine weitere Abnahme der Bandenintensitäten mit simultaner Verschiebung der Bandenpositionen beobachtet, welche über den Zeitraum der Messserie einen linearen Verlauf zeigte. Da auch die vorherigen Messserien nicht konvergierten, ist eine detaillierte Interpretation der Prozesse nicht möglich. Jedoch bekräftigen die beobachteten Änderungen die Vermutung, dass durch Interaktion der AuNPs mit den Lipiden strukturelle Änderungen innerhalb der Kettengruppen-Bereiche auftreten. Durch die erhöhte Konzentration der Partikel finden diese in einem größeren Anteil der Bilagen statt und das Summenspektrum ist somit weiter vom nativen Zustand entfernt.

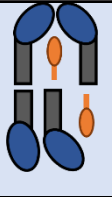
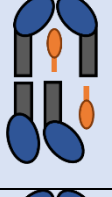
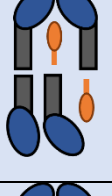
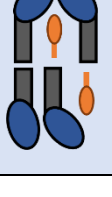
Die beobachtete Abnahme der Bandenintensitäten durch Zugabe von MgCl₂ und AuNPs zu DMPC-Oligobilagen decken sich mit den Erkenntnissen der Untersuchungen mit NR, wobei bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufs offensichtliche Unterschiede zu sehen sind. Während mit NR mithilfe von Wiederholungsmessungen sichergestellt werden konnte, dass sich das System im Gleichgewicht befand, ließ die Auswertung der ATR-FTIR-Messungen das Gegenteil erkennen. Dieser Umstand war während der Messungen trotz durchgängiger Betrachtung der Bandenintensitäten nicht zu erkennen. Die mit ATR-FTIR-Spektroskopie beobachteten Einflüsse auf die Bandenposition- und -breite lassen zusätzliche Schlüsse über die innere Struktur der Lipid-Bilagen zu, welche aus den beschriebenen NR-Experimenten nicht hervorgingen. Da die Experimente nicht an derselben Probe und zeitlich getrennt stattfanden, sind die Erkenntnisse jedoch schwer übertragbar. Um gesicherte Aussagen über den Einfluss der Partikel auf die Bilagen-Struktur treffen zu können ist der gleichzeitige Einsatz komplementärer Messmethoden vorteilhaft. Zwar wurde für die vorliegende Arbeit ein solcher Aufbau entwickelt (siehe Kapitel 4), jedoch war es nicht möglich, die hier präsentierten Ergebnisse an diesem zu reproduzieren. Grund für die beobachteten Unterschiede im Probenverhalten waren einerseits Probe- zu-Probe Unterschiede zwischen den Lipid-Proben, die auch anhand der unterschiedlichen Ergebnisse aus den präsentierten Untersuchungen deutlich werden. Ein weiterer Umstand, der die Untersuchung einer analogen Probe mit dem entwickelten komplementären Messaufbau erschwerte, war das Alter der verwendeten AuNPs. Da zwischen den Messzeiträumen erheblich Zeit verstrich, waren die für die in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnisse verwendeten Partikel zu sehr gewachsen, als dass sie ähnliche Ergebnisse hätten liefern können. Neu synthetisierte Partikel unterschieden sich in ihrer Größenverteilung außerdem zu sehr von den hier verwendeten, weshalb auch hier mit anderen Ergebnissen zu rechnen war.

5.4. Interaktion hydratisierter Lipid-Oligobilagen aus DMPC und Cholesterol mit Gold-Nanopartikeln und Magnesiumchlorid

In den vorherigen Abschnitten wurde ein vereinfachtes Modell von Zellmembranen betrachtet, welches ausschließlich aus Phospholipiden bestand. Reelle Zellmembranen sind jedoch komplexer aufgebaut und enthalten unter anderem Membranproteine, sowie weitere Arten von Lipiden, wie Sterine. Letztere machen in eukaryotischen Zellmembranen einen Anteil von bis zu 30% aus.^[190] Ein wichtiges Sterin, welches häufig in tierischen Zellmembranen aufzufinden ist, ist Chol. Hier dient es zum einen der Modulation der Permeabilität und Struktur der Membran und leistet darüber hinaus auch einen Beitrag zur Membranstabilität.^[190] Aufgrund dieser Eigenschaften, sowie der leichten kommerziellen Zugänglichkeit, wurde als nächster Schritt hin zur Komplexität biologischer Zellen entschieden, gemischte Lipid-Oligobilagen aus DMPC und Chol zu untersuchen.

Parallel zu den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Forschungsergebnissen, untersuchte auch Andreas Stöcklin im Arbeitskreis Dahint den Einfluss von Chol auf die Struktur von Modellmembranen. Hier zeigte sich der stabilisierende Effekt von Chol auf Oligobilagen. Durch die Einlagerung des Sterins wurde weniger Lagenverlust beim Kontakt der Proben mit wässrigen Phasen, sowie geringere Quellungen durch Zugabe von Salzen beobachtet. Eine ausführliche Untersuchung der Einflüsse unterschiedlicher Chol-Anteile in Membranmodellen kann in seiner Dissertation nachgelesen werden.^[156]

Tabelle 5.6: Angewandtes Modell zur Simulation der NR-Profile von DMPC-Oligobilagen mit 20% Chol-Gehalt. Im Vergleich zum in Abschnitt 5.3 beschriebenen Modell wurden die Parameter der Lipid-Kettengruppen gemäß Literaturangaben^[34] unter Annahme einer gleichmäßigen Verteilung des Chol, sowie auf Basis der in Abschnitt 5.1 beschriebenen Voruntersuchungen angepasst. Aufgrund der angenommenen Deformierung der Kopfgruppen zur Abschirmung der hydrophoben Chol-Moleküle gegen die Flüssigphase wurde die Dicke der damit assoziierten Schicht d_{Kopf} für die Messung unter D_2O mit angepasst. Für die anschließenden Probebedingungen wurde dieser Wert als Verknüpfung übernommen, sodass er für alle NR-Profile gleichzeitig optimiert wurde.

		Wiederholungen	d [Å]	SLD [10^{-6}Å^{-2}]	$iSLD$ [10^{-6}Å^{-2}]	ϕ [%]
Si	Silizium	1	—	2,07	0	0
SiO _x	Silizium-oxid	1	15	3,47	0	0
	Kopf	1	d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	Ketten		30,75	−0,3	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	Kopf		d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	D ₂ O 1		d_{w1}	—	—	100
	Kopf	$N - 3$	d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	Ketten		30,75	−0,3	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	Kopf		d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	D ₂ O 2		d_{w2}	—	—	100
	Kopf	1	d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	Ketten		30,75	−0,3	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	Kopf		d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	D ₂ O 2		d_{w3}	—	—	100
	Kopf	1	d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	Ketten		30,75	−0,3	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	Kopf		d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i,lip}$	ϕ_{lip}
	D ₂ O (Bulk)	—	—	—	0	—

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Chol-Gehalt von 20% festgelegt, da solche Proben sowohl eine gute Stabilität als auch ausreichend große Bilagenabstände zeigten, um ein Eindringen von AuNPs zu ermöglichen. Hierzu wurden entsprechende Proben mit dem in Abschnitt 4.3 beschriebenen kombinierten Messaufbau für NR und ATR-FTIR-Spektroskopie am Instrument FIGARO des ILL untersucht. Hiermit war im Gegensatz zu den in vorigen Abschnitten beschriebenen Proben die simultane Untersuchung mit beiden Messmethoden an derselben Probe möglich, was den Faktor der Probe-zu-Probe-Variation bei getrennten Untersuchungen eliminiert. Eine rudimentäre Beschreibung der Ergebnisse ist auch in Abschnitt 4.3.1 zu finden, wobei an dieser Stelle eine genauere Beschreibung der gewonnenen Erkenntnisse gegeben werden soll. Der experimentelle Ablauf erfolgte dabei analog zur Untersuchung reiner DMPC-Oligobilagen, wie in Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Es kamen hierbei kationische AuNPs mit einem Durchmesser von 2 nm zum Einsatz, deren Größe kurze Zeit vor den Untersuchungen mithilfe von SEM bestätigt wurde.

Das zur Anpassung der NR-Profile verwendete Modell ist in Tabelle 5.6 dargestellt. Ein grundlegender Unterschied im Vergleich zu dem zuvor beschriebenen Modell für reine DMPC-Oligobilagen ergibt sich durch die strukturellen Einflüsse des eingelagerten Chol. Da es sich hierbei um ein lipophiles Molekül handelt, lagert es sich primär in den Kettengruppenschichten der Bilagen ein. Um die Exposition zur wässrigen Phase zu vermeiden, orientieren sich die Kopfgruppen der Phospholipide um, sodass der hydrophobe Bereich gegen die Umgebung abgeschirmt wird. Somit ist die lokale Dicke der Kopfgruppenschicht verringert, und über die gesamte Schicht ist mit einer Zunahme der Rauigkeit relativ zu reinen DMPC-Oligobilagen zu rechnen. In Voruntersuchungen an trockenen Oligobilagen (siehe Abschnitt 5.1) konnte dies bestätigt werden. Weiter war hier auch eine leichte Zunahme der Dicke der Kettengruppenschicht zu erkennen. Auch dieser Umstand erscheint aufgrund der Größe des Chol und der DMPC-Kettengruppen sinnvoll. Die in Abschnitt 5.1 erhaltenen Dicken der Kettengruppenschicht wurden für das hier verwendete Modell übernommen und nicht angepasst, da davon auszugehen ist, dass sich diese durch die Hydratisierung der Probe nicht signifikant ändern. Analog zu den Voruntersuchungen wurde außerdem unter Annahme einer gleichmäßigen Verteilung des Chol auf die Kettengruppenschichten die SLD $\rho_{Kette,Mischfilm}$ dieser nach Gleichung (5.1) berechnet und als konstant festgelegt. Die Anpassung der NR-Profile anhand des beschriebenen Modells erfolgte für alle Probenbedingungen simultan. Dabei wurden die SLD der Flüssigphase ρ_w und die Dicke d_{Kopf} der mit den Kopfgruppen assoziierten Schicht nur für die Messung unter D_2O angepasst und mit den entsprechenden Parametern der anderen Profile verknüpft, sodass diese für alle Bedingungen gleichzeitig optimiert wurden. Analog zu den zuvor beschriebenen Modellen wurden drei unterschiedliche Wasserschichtendicken $d_{w,i}$ angepasst, wobei die erste und letzte Wasserschicht jeweils separat zu den inneren Wasserschichten bestimmt wurden. Im Gegensatz zur Untersuchung an reinen DMPC-Oligobilagen oder trockenen Filmen konnten in den NR-Profilen keine Kiessig-

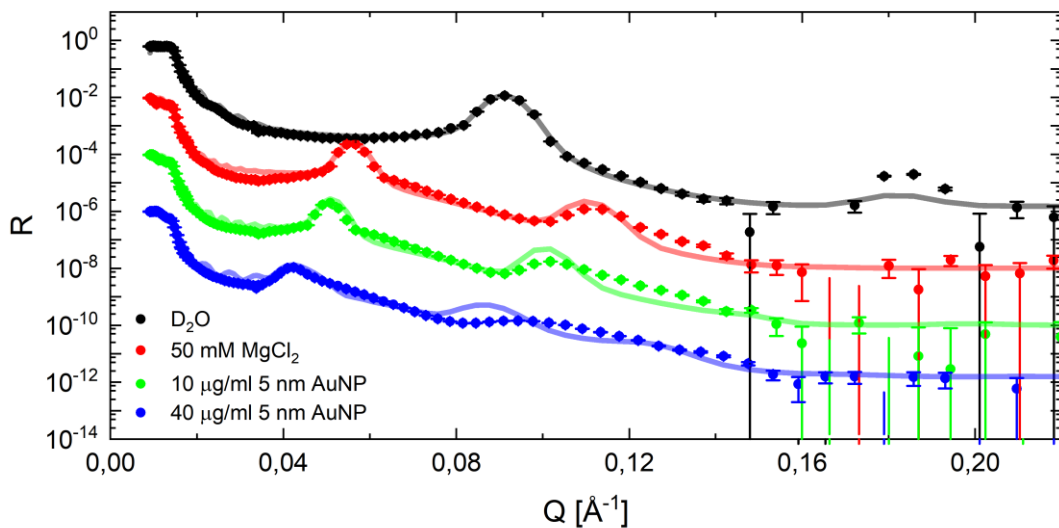


Abbildung 5.9: Erhaltene NR-Profile von Oligobilagen aus 80% DMPC und 20% Chol auf Si-Substraten unter D_2O und nach Zugabe von $MgCl_2$ und AuNP. Anpassungen nach dem in Tabelle 5.6 beschriebenen Modell sind als transparente Linien eingezeichnet. Die so erhaltenen Parameter sind in Tabelle 5.7 zu finden.

5. Untersuchung der Interaktion von kationischen Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Bilagen

Oszillationen erkannt werden, welche Aufschluss über die Zahl der Bilagen geben würden. Somit wurde dieser Parameter ermittelt, indem die Zahl der inneren Wiederholeinheiten variiert und die daraus resultierende Änderung der Anpassungsgüte χ^2 notiert wurde. Die nach Simulation erhaltenen Parameter sind in Tabelle 5.7 zu sehen und werden im Folgenden genauer beschrieben. Die gemessenen und simulierten NR-Profile sind in Abbildung 5.9 dargestellt.

Die Simulation des NR-Profils unter reinem D₂O ergab eine Zahl von 19 Bilagen. Somit wurde trotz gleicher Konzentration bei der Probenpräparation und gleicher Trocknungsmethode eine dickere Probe erhalten als bei der Präparation von reinen DMPC-Oligobilagen. Gleichzeitig ergab sich eine Abnahme der Dicke der Kopfgruppenschichten d_{Kopf} um etwa 0,74 Å. Dieser Effekt war wie beschrieben anhand der theoretischen Grundlagen anzunehmen. Da auch die Zunahme der Dicke der Kettengruppenschicht gering ausfiel (siehe Abschnitt 5.2.2), erschien auch die Größenordnung des hier beschriebenen Einflusses auf d_{Kopf} sinnvoll. Weiter wurde eine größere Rauigkeit σ der Probe, sowie ein erhöhter Wasseranteil $\phi_{w,lip}$ beobachtet. Dies spricht dafür, dass es bei der Einlagerung von Chol in den Bilagen zur Ausbildung lokaler Löcher kommt, wie auch in den Arbeiten von Andreas Stöcklin beschrieben. Hierin wurde mithilfe von Rasterkraftmikroskopie beobachtet, dass Proben mit hohem Chol-Anteil zwar eine insgesamt homogenere Oberfläche, jedoch sich in dieser größere zusammenhängende Löcher

Tabelle 5.7: Erhaltene Parameter der Anpassungen von Oligobilagen aus 80% DMPC und 20% Chol bei Interaktion mit MgCl₂ und AuNP unter Verwendung des in Tabelle 5.4 beschriebenen Modells. Die SLD der Flüssigkeitsphase ρ_w wurde nur für die Messung unter D₂O angepasst und für die anderen Zustände verknüpft, da aufgrund der Totalreflexionskante der NR-Profile keine signifikante Änderung des Parameters zu erwarten ist. Da für die Dicke der Kopfschichten d_{Kopf} in ersten Tests ebenso keine signifikanten Änderungen zu erkennen waren wurde für diesen Parameter analog verfahren. Die Anpassung der Profile erfolgte für alle Probenbedingungen gleichzeitig.

Parameter	D ₂ O	50 mM MgCl ₂	10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ 5nm AuNP	40 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ 5nm AuNP
χ^2 [10 ⁴]	2,10	6,29	11,5	9,48
$\frac{\Delta Q}{Q}$ [%]	8,43 ± 0,05	8,73 ± 0,01	7,96 ± 0,01	12,30 ± 0,07
N	19	16	13	7
d_{w1} [Å]	13,8 ± 0,2	36,0 ± 0,3	48,6 ± 0,2	66,3 ± 0,2
d_{w2} [Å]	14,4 ± 0,2	60,1 ± 0,2	71,7 ± 0,2	92,6 ± 0,2
d_{w3} [Å]	21,2 ± 0,2	109,7 ± 0,3	125,4 ± 0,2	153,2 ± 0,2
d_{Kopf} [Å]	11,96 ± 0,08	d_{Kopf,D_2O}	d_{Kopf,D_2O}	d_{Kopf,D_2O}
ρ_{Kopf} [10 ⁻⁶ Å ⁻²]	3,58 ± 0,03	3,61 ± 0,06	3,62 ± 0,08	3,78 ± 0,09
$i\rho_{lip}$ [10 ⁻⁸ Å ⁻²]	9,1 ± 0,1	18,1 ± 0,2	28,7 ± 0,5	54,9 ± 0,9
ρ_w [10 ⁻⁶ Å ⁻²]	6,22 ± 0,01	ρ_{w,D_2O}	ρ_{w,D_2O}	ρ_{w,D_2O}
$\phi_{w,lip}$ [%]	23,2 ± 0,3	57,6 ± 0,3	59,8 ± 0,3	58,3 ± 0,3
σ [Å]	9,66 ± 0,09	10,72 ± 0,12	9,68 ± 0,16	9,00 ± 0,17
S_{w2}	1	4,17 ± 0,06	4,98 ± 0,07	6,43 ± 0,09

zeigten, wohingegen Proben aus reinem DMPC viele kleine Löcher aufwiesen.^[156] Die für die vorliegende Arbeit gemessenen Bragg-Peaks der Probe waren außerdem bedeutend breiter als bei der Untersuchung an reinen DMPC-Oligobilagen, woraus sich bei der Simulation eine schlechtere Auflösung $\Delta Q/Q$ ergab. In der Literatur können Fälle von ähnlicher Bragg-Peakverbreiterungen von Lipid-Oligobilagen gefunden werden, die Effekten der endlichen Probenausdehnung, sowie strukturelle Deformation aufgrund von Scherkräften zugeschrieben wurden.^[191] Es ist denkbar, dass die Einlagerung von Chol in die Bilagen ebenso zu strukturellem Stress in den Bilagen führt und somit die Bragg-Peaks verbreitert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es durch die Einlagerung zu größerer Domänenbildung kommt als zunächst angenommen. Eine solche Annahme würde jedoch eine grundlegende Überarbeitung des verwendeten Modells zur Anpassung der Reflexionsprofile hinsichtlich einer inkohärenten Kombination Chol-reicher und -armer Spezies benötigen. Wie in Abschnitt 5.3 erwähnt wurde dies zugunsten eines möglichst einfachen Modells an dieser nicht berücksichtigt. Zusätzlich würde der Einsatz eines inkohärenten Modells in der zur Auswertung verwendeten Software die Verknüpfung äquivalenter Parameter bei unterschiedlichen Probenbedingungen nicht erlauben, was jedoch genutzt werden sollte, um möglichst robuste Werte für diese zu erhalten. Darüber hinaus zeigte der Vergleich mit den in Abschnitt 5.3.2 untersuchten Proben dickere Wasserzwichenschichten, was auf erhöhte repulsive Wechselwirkung zwischen den Bilagen hinweist. Dieser Umstand kann nicht eindeutig erklärt werden. Es wäre möglich, dass es sich hierbei um einen Effekt von kontaminiertem D₂O handelt. Da die Flüssigphase des untersuchten Systems nicht gepuffert war, können auch sehr geringe Mengen von wasserlöslichen Stoffen starke Auswirkungen haben. Auch könnte durch gelöstes CO₂ aus der Luft die Flüssigphase angesäuert worden sein, was ebenso Einfluss auf die erhaltenen Parameter haben kann. Neben den bereits beschriebenen Änderungen durch Einlagerung von Chol konnte außerdem eine Zunahme von χ^2 um etwa eine Größenordnung beobachtet werden.

Die Zugabe von 50 mM MgCl₂ führte wie in vorherigen Untersuchungen zu einem Quellen der Probe und der damit einhergehenden Verschiebung der Bragg-Peaks zu kleinen Streuvektoren Q . Dieser Effekt war jedoch mit einem Quellfaktor von $S_{w2} = 4,17 \pm 0,06$ weniger als halb so groß als bei der Untersuchung reiner DMPC-Oligobilagen. Es kann angenommen werden, dass durch die Hydrophobie des eingelagerten Chol die Anlagerung von Mg²⁺-Ionen an die Kopfgruppenschicht verringert wird. Passend dazu konnte auch kein Einfluss auf die SLD der Kopfgruppenschicht ρ_{Kopf} beobachtet werden. Die Probe zeigte außerdem einen bedeutend geringeren Lagenverlust als durch den Quellprozess als dies an der reinen DMPC-Probe beobachtet wurde (16% gegenüber 47%), dahingegen stieg jedoch der Lösungsmittelanteil in den Schichten $\phi_{w,lip}$ stärker an. Dies spricht dafür, dass entgegen der eingangs beschriebenen Annahme einer Stabilisierung der Probe die laterale Stabilität der Bilagen durch das eingelagerte Chol eher abnahm. Der geringere Lagenverlust weist auf eine erhöhte Stabilität des Gesamtsystems hin, ebenso wie die geringere Quellung der Probe. Weiter fiel die Zunahme der iSLD $\rho_{i,lip}$ und Rauigkeit σ der Probe geringer aus als bei der Untersuchung äquivalenter Bedingungen an reinen DMPC-Oligobilagen, was möglicherweise auf eine Versteifung der Bilage und somit geringere Welligkeit hinweist. Ein weiteres Indiz, welches diese Annahme bekräftigt ist, dass die Zugabe des Salzes nahezu keinen Einfluss auf die Auflösung $\Delta Q/Q$ bei Untersuchung der gemischten Probe hatte. Insgesamt scheint es so, dass das Oligobilagen-System durch die Beimischung von Chol versteift und orthogonal zur Ebene stabilisiert wurde, es jedoch beim Quellen zu einem gestiegenen Materialverlust

5. Untersuchung der Interaktion von kationischen Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Bilagen

innerhalb der einzelnen Bilagen kam. Um dies eindeutig zu bestätigen wären jedoch Untersuchungen mit bildgebenden Methoden wie AFM unter den hier beschriebenen Bedingungen vonnöten.

Die Zugabe von 10 µg/ml AuNP zur Flüssigphase führte zu einem weiteren Quellen der Wasserzwichenschichten um etwa 20%. Ein Vergleich mit der Untersuchung an reinen DMPC-Oligobilagen ist hier jedoch nur begrenzt möglich, da bei diesen die Zugabe der AuNPs bei einer anderen Konzentration von MgCl₂ erfolgte. Relativ zum vorangegangenen Zustand zeigt das gemischte System jedoch einen deutlich stärkeren Einfluss. Dabei nahmen auch $\phi_{w, lip}$ und $\rho_{i, lip}$ leicht zu, wohingegen σ etwas abnahm, was dafür sprechen könnte, dass gemischte Bilagen durch AuNPs weniger starken strukturellen Änderungen ausgesetzt werden als Proben aus reinem DMPC. Verglichen mit der Zugabe des Salzes war der Einfluss hier jedoch sehr gering und wie bereits beschrieben der Vergleich mit den aus der Untersuchung reiner DMPC-Oligobilagen erhaltenen Parametern nur bedingt möglich. Die SLD der Kopfgruppen ρ_{Kopf} blieb hingegen erneut unverändert. Darüber hinaus gingen beim Quellprozess drei weitere Bilagen verloren, was jedoch noch immer in einer ausreichend dicken Probe resultierte, um belastbare Ergebnisse zu erhalten. Nichtsdestotrotz war die Simulation des Modells deutlich schwieriger als die des vorherigen Probenzustandes. Insbesondere der zweite Bragg-Peak bei $Q \approx 0,10 \text{ \AA}^{-1}$ war weder in seiner Intensität noch Lage zufriedenstellend anzupassen.

Die Erhöhung der AuNP-Konzentration auf 40 µg/ml resultierte in einem deutlichen Quellen der Probe um etwa 29%. Hierbei wurde keine weitere Zunahme von $\phi_{w, lip}$ beobachtet. Die Rauigkeit σ nahm leicht ab, was als Versteifung der Bilagen durch angelagerte NPs interpretiert werden kann. Gleichzeitig wurde jedoch ein Verlust der Hälfte der Bilagen beobachtet. Es ist hierbei jedoch unklar, ob dies durch den Quellprozess oder durch direktes Abtragen durch die AuNPs vonstattenging. Darüber hinaus wurde jedoch eine leichte Zunahme von ρ_{Kopf} beobachtet. Da die SLD von Gold ρ_{Au} größer als die der DMPC-Kopfgruppen ist, könnte dies auf eine Anlagerung der Partikel an die Kopfgruppenschicht hindeuten. Unter Annahme einer gleichmäßigen Verteilung der Partikel und Vernachlässigung der auf diesen adsorbierten Tenside ergibt sich der Anteil der AuNP in den Schichten x_{Au} aus dem Verhältnis der erhaltenen $\rho_{Kopf, i}$ der Messungen nach Zugabe von MgCl₂ und nach Zugabe der AuNP:

$$x_{Au} = \frac{\rho_{Kopf} (40 \text{ µg/ml AuNP}) - \rho_{Kopf} (50 \text{ mM MgCl}_2)}{\rho_{Au} - \rho_{Kopf} (50 \text{ mM MgCl}_2)} \approx 4\% \quad (5.5)$$

Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Simulation dieser Probenbedingung bedeutend schlechter als die der vorherigen ausfiel und die Zunahme weniger als zwei Standardabweichungen betrug. Der erhaltene Wert muss somit kritisch betrachtet werden. Es kann jedoch somit gezeigt werden, dass bei einer ausreichend guten Simulation über die erhaltenen Parameter das Ausmaß der Einlagerung der AuNPs abgeschätzt werden kann. Ein Eindringen der AuNP in die Kettenschicht der Bilagen kann aufgrund der Einschränkungen des Modells hinsichtlich der Fixierung der Schichtparameter nicht nachgewiesen werden. Es wurde daher versucht, diese Parameter bei Messungen in Gegenwart der AuNPs mit anzupassen, was jedoch die Anpassungsgüte nicht verbesserte und zu insgesamt unrealistischen Parameterwerten führte.

Zusätzlich wurde eine deutliche Zunahme von $\rho_{i, lip}$ beobachtet. Aufgrund der Grundannahme, dass dieser Parameter das Ausmaß der off-spekularen Streuung beschreibt, kann hierüber keine quantitative Aussage zu x_{Au} getroffen werden. Da jedoch $\rho_{Au} = -16 \cdot 10^{-8} \text{ \AA}^{-2[140]}$ um mehrere

Größenordnungen größer ist als die iSLD der trockenen DMPC-Kopfgruppen $i\rho_{Kopf}^{trocken} = -0,06 \cdot 10^{-8} \text{ \AA}^{-2}$, könnte die deutliche Zunahme des Parameters auch auf eine signifikante Präsenz der Partikel in den mit der Probe assoziierten Lagen des Modells schließen lassen. Zwar ist auch $i\rho_{Au}$ kleiner als die iSLD der Lipid-Bilagen vor Zugabe der AuNP und insbesondere danach, eine Kombination der üblicherweise durch die iSLD beschriebenen Neutronenabsorption mit verstärkter off-spekularer Streuung könnte jedoch die starke Zunahme des Modellparameters erklären.

Neben den beschriebenen Änderungen der Modellparameter wurde auch eine deutliche Zunahme von $\Delta Q/Q$ beobachtet. Es wäre denkbar, dass durch die geringe Zahl der übrigen Bilagen die vereinfachte Annahme, dass die inneren Wasserzwichenschichten dieselbe Dicke d_{w2} aufweisen nicht mehr gegeben ist. Unterschiedliche Dicken der inneren Wasserzwichenschichten können in einer schlechteren Auflösung resultieren. Durch die Verwendung zusätzlicher separat simulierter Wasserzwichenschichten-Dicken würde das Modell jedoch zu komplex werden, um verlässliche Parameter zu erhalten.

Schlussendlich kann anhand der erhaltenen Ergebnisse gesagt werden, dass am gemischten System ein deutlicherer Einfluss der NPs auf die untersuchten Oligobilagen zu beobachten war, als dies bei Proben aus reinem DMPC der Fall war. Die erhaltenen Ergebnisse beider Proben lassen sich jedoch nur bedingt vergleichen, da die Ausgangslage bei Zugabe der NPs verschieden war. Innerhalb einer Messserie ließen sich die Einflüsse dahingegen gut erkennen, jedoch waren gerade bei größeren Quellungen die Simulationen der NR-Profile mit dem verwendeten Modell weniger belastbar. Ähnlich wie in Abschnitt 5.3 beschrieben könnte durch Verwendung eines gemischten Modells aus unterschiedlichen Zahlen von Bilagen die Anpassung weiter verbessert werden, was jedoch diesen Prozess weitaus komplexer gestalten würde. Auch wäre somit eine simultane Anpassung aller Probenbedingungen nicht möglich gewesen, weshalb weiterhin das vereinfachte Modell verwendet wurde.

Wie eingangs erwähnt wurden die beschriebenen Untersuchungen mithilfe des in Abschnitt 4.3 beschriebenen kombinierten Messaufbaus durchgeführt, was die simultane Untersuchung der Probe mit ATR-FTIR-Spektroskopie ermöglichte. Eine vergleichende Interpretation der Ergebnisse ist somit belastbarer, da Probe-zu-Probe-Unterschiede vermieden werden.

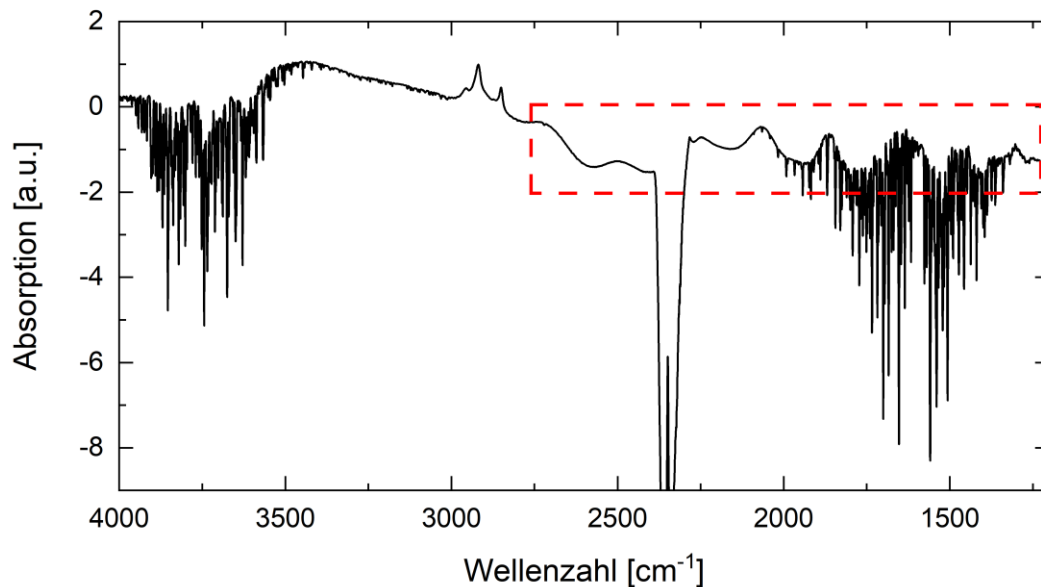


Abbildung 5.10: IR-Absorptionsspektrum der untersuchten Probe von DMPC-Oligobilagen mit 20% Chol unter D_2O . Als Hintergrundspektrum wurde der gesäuberte ATR-Kristall gegen D_2O zu einem separaten Zeitpunkt gemessen. Störfaktoren für eine quantitative Auswertung der Spektren sind deutlich zu erkennen. Im rot markierten Bereich ist das periodische Signal der Etalons zu erkennen. In den Bereichen von $(1300 \sim 2000) \text{ cm}^{-1}$ und $(3400 \sim 4000) \text{ cm}^{-1}$ sind starke Rotationsbanden von H_2O aus der Umgebungsluft zu sehen.

Ein grundsätzliches Problem bei NR-Experimenten ist die begrenzt verfügbare Messzeit. Da entsprechende Instrumente stark gefragt sind, stehen meist nur wenige Tage zur Verfügung, die optimal genutzt werden müssen, um möglichst viele Ergebnisse zu erhalten. Aus diesem Grund wurden parallel zu den hier beschriebenen Untersuchungen weitere Proben untersucht, welche abwechselnd in den kombinierten Aufbau eingebaut wurden. Zwischen den Messungen wurde sichergestellt, dass alle Proben bei einer stabilen und kontrollierten Temperatur gehalten wurden und der Durchfluss über das Peristaltik-System ungestört blieb. Jedoch bringt der Probenwechsel einige Probleme für die ATR-FTIR-Spektroskopie mit sich, die bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden müssen. Zunächst ist es nicht mehr sichergestellt, dass die Probenausleuchtung f zwischen einzelnen Messungen identisch ist. Dies wird jedoch wie in Abschnitt 3.7.1 beschrieben vorausgesetzt, um die Abnahme der Bandenintensitäten beim Lagenverlust zu simulieren und somit spektrale Änderungen zu interpretieren. Aus diesem Grund kann diese Methode hier nur als Anhaltspunkt, nicht jedoch zur belastbaren quantitativen Auswertung genutzt werden.

Zwar wurde bei der Justage des IR-Strahlengangs dafür Sorge getragen, dass die detektierte Strahlintensität maximiert wird, jedoch ist anzunehmen, dass die Winkel, in denen die Grenzfläche getroffen wurde, trotzdem leicht voneinander abwichen, insbesondere da die Reflexion aus der Spektrometerebene heraus zum ATR-Kristall über frei rotierbare Arme stattfand. Dies führt auch zu weiteren Problemen, welche die Auswertung der IR-Spektren erschweren können. Wie in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, können durch unterschiedliche Einfallswinkel an dünnen Proben in den erhaltenen Absorptionsspektren Etalons auftreten. Diese periodischen Signale können unter Umständen mit den Absorptionsbanden der Probe überlagern und verfälschen somit deren Analyse. In den hier

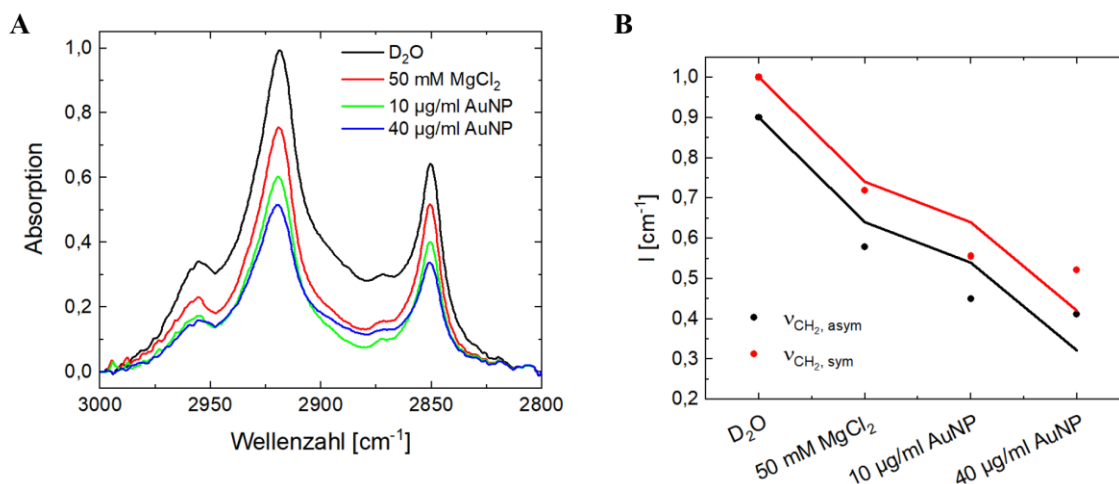


Abbildung 5.11: Änderung der CH_2 -Banden der untersuchten Probe von DMPC-Oligobilagen mit einem Chol-Gehalt von 20%. **A** Absorptionsbanden im Bereich von 2800 – 3000 cm^{-1} . Die Abnahme der Banden beim Fortschritt des Experiments ist deutlich zu erkennen. **B** Normierte Absorptionen der CH_2 -Streckschwingungsbanden (Datenpunkte) und simulierte Absorption anhand der aus NR erhaltenen Parameter (Linien). Zugunsten der Übersichtlichkeit wurden die Daten der asymmetrischen Streckschwingungsbande versetzt dargestellt.

beschriebenen Experimenten waren starke Etalons im Bereich von $\tilde{\nu} = (2800 \sim 1400) \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen (siehe rot markierter Bereich in Abbildung 5.10). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die CH_2 -Valenzschwingungsbanden, welche für die Auswertung der untersuchten Probe verwendet werden, dadurch beeinflusst wurden.

Weiter stand zum Zeitpunkt der Messungen, im Gegensatz zu späteren Untersuchungen, keine fest installierte Zufuhr von Trockengas am Instrument zur Verfügung. Stattdessen wurde eine Stickstoff-Gasflasche verwendet und über einen Druckminderer der Strahlengang des IR-Spektrometers gespült. Aufgrund des offenen Systems war der Verbrauch jedoch so hoch, dass diese über die Messzeit mehrfach ausgetauscht werden musste. Somit gab es mehrfach Zeiträume, in denen die Spülung unterbrochen wurde und dementsprechend die Luftfeuchtigkeit im Strahlengang wieder anstieg. Dies hatte zur Folge, dass die erhaltenen IR-Spektren deutliche H_2O -Rotationsschwingungsbanden in den Bereichen von $\tilde{\nu} = (2000 \sim 1300) \text{ cm}^{-1}$ und $\tilde{\nu} = (4000 \sim 3400) \text{ cm}^{-1}$ zeigten, wie in Abbildung 5.10 zu sehen ist. Zwar liegen die untersuchten CH_2 -Valenzschwingungsbanden außerhalb dieser Bereiche, jedoch können bei großen Unterschieden der Luftfeuchtigkeit in Probe- und Hintergrundspektrum die H_2O -Rotationsschwingungsbanden noch bis in den untersuchten Bereich erkannt werden. Das verwendete Hintergrundspektrum war für alle im aktuellen Abschnitt beschriebenen Messungen das Einkanalspektrum eines frisch gereinigten ATR-Substrats gegen D_2O , welches zu einem separaten Zeitpunkt aufgenommen wurde. Zwar war somit von einer weiteren Abweichung der Spülung und Probenausleuchtung auszugehen, hinsichtlich der ohnehin bestehenden Probleme wurde die Verwendung dieses Hintergrundspektrums jedoch als geeigneter erachtet als die ursprünglich vor jeder Probenmessung aufgenommenen Hintergrundspektren des Strahlengangs ohne ATR-Kristall. Somit konnte die Auswertung anhand eines konstanten Hintergrunds stattfinden.

Da für die Auswertung der aufgenommenen Absorptionsspektren nur der Bereich von $\tilde{\nu} = (3000 - 2800) \text{ cm}^{-1}$ von Interesse war, wurde eine simple Basislinienkorrektur mithilfe einer Geraden zwischen den beiden Datenpunkten der jeweiligen Messung vorgenommen. Die erhaltenen Spektren der CH_2 -Valenzschwingungsbanden sind in Abbildung 5.11 A zu sehen. Im Allgemeinen folgen die Bandenintensitäten dem nach der Auswertung der NR-Profile zu erwartendem Trend. In jedem Schritt wurde eine Abnahme der Intensitäten beobachtet. Diese können wie auch in zuvor beschriebenen Untersuchungen sowohl über einen Quellprozess als auch über einen Verlust von Lipid-Bilagen erklärt werden, da sich in beiden Fällen weniger Absorbanden im intensiven Teil des evaneszenten Feldes befinden. Die CH_2 -Valenzschwingungsbanden wurden zusätzlich mithilfe von Lorentz-Funktionen angepasst, die so erhaltenen Bandenintensitäten sind in Abbildung 5.11 B als Datenpunkte abgebildet. Diese wurden normiert, indem sie durch den Wert der ersten Messung unter D_2O geteilt wurden. Somit ist der relative Verlauf der Bandenintensitäten gut ersichtlich. Der Intensitätsverlust bei Zugabe von MgCl_2 und $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$ AuNP ist deutlich zu erkennen, jedoch keine signifikante Änderung nach Erhöhung der AuNP-Konzentration, da zwar die Amplitude der angepassten Bande geringer ausfiel als bei der vorherigen Messung, jedoch die Bandenbreite zunahm. Das Peakzentrum blieb dabei unverändert. Nach den aus der Anpassung der NR-Profile erhaltenen Parametern wäre mit einer deutlichen Abnahme der Bandenintensitäten zu rechnen gewesen, da hier sowohl ein Quellprozess als auch Lagenverluste erhalten wurden. Es wäre möglich, dass die Abweichung der Ergebnisse durch die Anlagerung der NPs begründet ist, da diese mit dem Tensid MACI stabilisiert sind, welche selbst CH_2 -Gruppen enthalten, die zu Absorptionsbanden im untersuchten Spektralbereich führen, aufgrund ihrer chemischen Umgebung jedoch verschoben sein können. Somit könnte die Bandenbreite erhöht und der Intensitätsverlust teilweise kompensiert werden. Um dies zu bestätigen, wäre eine Untersuchung der Partikel in Lösung ohne Gegenwart von Lipid-Oligobilagen vonnöten. Eine solche Lösung zeigt jedoch keinerlei Absorptionsbanden, die den Partikeln zugeordnet werden konnten, weshalb die Vermutung an dieser Stelle nicht abschließend bestätigt oder widerlegt werden kann. Es wäre auch möglich, dass der beobachtete Effekt auf eine Faltung der Absorptionsbanden mit den Etalons zurückzuführen ist. Insbesondere die größere Absorption zwischen den Absorptionsbanden bei $\tilde{\nu} \approx 2875 \text{ cm}^{-1}$ lässt diese Schlussfolgerung sinnvoll erscheinen.

Anhand der aus der Anpassung der NR-Profile erhaltenen Parametern wurde der anzunehmende Verlauf der Bandenintensitäten nach 3.7.1 simuliert. Wie bereits erwähnt, ist diese Methode aufgrund der nicht erfüllten grundlegenden Annahmen nur bedingt aussagekräftig, jedoch können hiermit die Unterschiede zwischen den erhaltenen Ergebnissen verdeutlicht werden. Die nach den Parametern zu erwartenden Verläufe der Bandenintensitäten sind in Abbildung 5.11 B als Linien eingezeichnet. Die Abnahme der symmetrischen Valenzschwingungsbande $\nu_{\text{CH}_2, \text{sym}}$ nach Zugabe von MgCl_2 zur wässrigen Phase stimmen für beide Messmethoden überein, während bei der asymmetrischen Valenzschwingungsbande $\nu_{\text{CH}_2, \text{asym}}$ anhand der Parameter aus der NR-Auswertung eine geringere Änderung zu erwarten gewesen wäre. Bei Betrachtung der weiteren Messbedingungen wurden weitere Abweichungen offensichtlich. Die Simulation ließ eine geringere Abnahme beider Bandenintensitäten nach erster Zugabe von NPs erwarten als gemessen, da laut den NR-Profilen nur ein geringer Quellprozess und wenig Lagenverlust stattfand. Der Intensitätsverlust bei Erhöhung der AuNP-Konzentration sollte dahingegen deutlich stärker ausfallen. Zwar kann an dieser Stelle wie bereits erwähnt ein kompensierender Effekt durch Absorption der an den Partikeloberflächen adsorbierten Tenside erwartet werden, jedoch ist unklar, ob

dieser ein solches Ausmaß erreichen kann. Wahrscheinlicher erscheint, dass die Abweichungen beider Methoden auf die bereits beschriebenen Probleme durch den Probentausch zwischen den einzelnen Messungen zurückzuführen sind.

In diesem Abschnitt wurde die Interaktion von kationischen AuNPs mit gemischten Lipid-Oligobilagen aus DMPC und Chol untersucht. Es konnte ein eindeutiger Einfluss der Partikel auf die Lipid-Probe nachgewiesen werden. Aufgenommene NR-Profile zeigten sowohl eine Vergrößerung der Wasserzwichenschichten als auch ein teilweises Abtragen der Bilagen. Dieser Effekt wurde durch Erhöhung der Partikelkonzentration weiter verstärkt. Eine genaue Ortung der Partikel in den Proben war jedoch nur begrenzt möglich. Zwar zeigte die SLD der Kopfgruppenschicht eine leichte Zunahme bei Interaktion mit einer großen Partikelkonzentration, jedoch war der Wert nur zwei Standardabweichungen von der Messung ohne AuNP entfernt und somit statistisch nicht signifikant. Um eingelagerte NPs besser lokalisieren zu können, könnte für zukünftige Untersuchungen durch Mischung von deuterierten und protonierten Lipiden beziehungsweise D_2O und H_2O als Lösungsmittel der Kontrast von Probe und Flüssigphase variiert werden. Dies würde ermöglichen, durch Parameterverknüpfung äquivalenter Probenbedingungen mit unterschiedlichem Kontrast die Parameter weiter einzugrenzen. Weiter wäre es somit auch möglich, die SLD der Lipide und des Lösungsmittels so anzupassen, dass sie in NR nicht mehr zu unterscheiden sind. Somit würden die gemessenen Profile nur noch auf den adsorbierten Partikeln beruhen, welche dann eindeutig zu lokalisieren wären. Solche Experimente sind jedoch komplex und benötigen eine gute Reproduzierbarkeit des Probenverhaltens. Für die vorliegende Arbeit konnten Untersuchungen dieser Art nicht durchgeführt werden.

Ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit denen aus den Untersuchungen an reinen DMPC-Proben in Abschnitt 5.3.2 zeigt, dass die Beimischung von Chol sowohl strukturelle Einflüsse auf die Probe an sich hatte als auch deren Interaktion mit den AuNPs abschwächte. Zwar zeigten gemischte Lipid-Oligobilagen eine größere Rauigkeit und die Ausbildung größerer Löcher innerhalb der einzelnen Lagen, jedoch wurde die Probe gegen äußere Einflüsse stabilisiert, was zu weniger Lagenverlust durch äußere Einflüsse führte. Auch wurden gemischte Proben seltener beim ersten Kontakt mit der Flüssigphase abgetragen, was insbesondere für Messzeiten an NR-Instrumenten von Vorteil war, da die Notwendigkeit häufiger Probenpräparationen somit wegfiel. Auch die Untersuchung der Probe mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie zeigte die beschriebenen Effekte bei Interaktion der Probe mit $MgCl_2$ und AuNPs, jedoch in einem geringeren Ausmaß als nach den Simulationen der NR-Profile zu erwarten war. Als Hintergrund dieser Abweichung wird ein kompensierender Effekt durch die an den Partikeloberflächen adsorbierten Tenside vermutet sowie systematische Fehler, welche auf den Probenwechsel zwischen den einzelnen Messungen zurückzuführen waren. Für weitere Untersuchungen sollte auf diese verzichtet werden, um die damit einhergehenden Probleme wie Etalons und unterschiedliche Probenausleuchtung zu vermeiden.

6. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit integralem Gramicidin

In Kapitel 5 der vorliegenden Arbeit wurden die Interaktionen eines vereinfachten Zellmembranmodells, welches ausschließlich aus Lipiden bestand, mit MgCl_2 und AuNPs untersucht. Biologische Zellmembranen sind jedoch nicht ausschließlich aus solchen, sondern auch aus Proteinen aufgebaut, welche essenziell für die Funktionalität der Zellmembran sind.^[68] Diese Membranproteine können grob in periphere Proteine, also solche die an der Oberfläche der Lipid-Membran adsorbiert sind, sich jedoch im Cytoplasma oder der wässrigen Umgebung der Zelle aufhalten, und Transmembranproteine, welche in der Membran eingelagert sind, unterschieden werden.^[72] Somit ist die Verwendung von Membranproteinen der offensichtliche nächste Schritt hin zu einem Modellsystem, welches eukaryotische Zellen akkurat widerspiegelt. In diesem Kapitel werden Untersuchungen an Modellsystemen mit einem Transmembranprotein beschrieben. Die Untersuchung an Modellen mit einem peripheren Membranprotein sind in Kapitel 7 zu finden.

Transmembranproteine sind Proteine, welche in Zellmembranen eingebaut sind und dort ihre natürliche Funktion ausüben.^[72] Für diese ist neben der Primärstruktur, also der Aminosäuresequenz des Proteins, auch die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins essenziell. Diese gehen jedoch bei der Isolierung des Proteins aus der Zellmembran häufig verloren, womit Untersuchungen an dem Protein wenig aussagekräftig sind, um den Einfluss auf natürliche Zellen zu verstehen. Die Auswahl an geeigneten Proteinen, welche bei der Präparation ihre natürliche Faltung beibehalten oder zurückerlangen können, ist stark begrenzt und oft sehr kostspielig. Eines der wenigen kommerziell in ausreichender Menge verfügbaren Proteine ist Gramicidin, welches trocken und in einem isolierten Zustand käuflich erwerblich ist. Es handelt sich hierbei um ein hydrophobes Protein, welches in den Kettengruppenschichten von Lipid-Bilagen einlagern kann.^[103] Dabei zeigt es eine helikale Struktur, wobei sich die hydrophilen funktionellen Gruppen des Proteins im Inneren der Helix befinden. Bei Einlagern in eine Zellmembran, können gegenüberliegende Gramicidine durch eine gestapelte Anordnung einen Ionenkanal über die Membran hinweg ausbilden, welcher spezifisch für monovalente Kationen ist.^[103, 108] Somit wird das Gleichgewicht der Ionenkonzentration im Cytoplasma gestört, was zum Zelltod führt. In der Natur kommen Gramicidine sowohl in verschiedenen linearen als auch in cyclischen Formen vor. Lineare Gramicidine unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur in der ersten und elften Aminosäureposition. Somit sind sechs verschiedene lineare Gramicidine bekannt, das Gemisch derer wird als GramD bezeichnet.^[107] Dieses wurde für die vorliegende Arbeit verwendet.

Da es sich bei GramD um ein Gemisch von wasserunlöslichen Proteinen handelt, musste der Einbau der Proteine bereits bei der Präparation der untersuchten Proben erfolgen und konnte nicht durch anschließende Zugabe zur Flüssigphase dem Membranmodell zugefügt werden. Hierzu wurde analog zu Abschnitt 5.4 ein Gemisch von DMPC und Chol verwendet, wobei ein Teil des Lipid-Gemischs gegen GramD ausgetauscht wurde. Die Präparation erfolgte wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben per Rotationsbeschichtung aus CHCl_3 auf einem frisch gesäuberten ATR-Kristall. Es wurde dabei eine Stoffmengenkonzentration von $14,8 \mu\text{mol/ml}$ verwendet, was einer 10 mg/ml DMPC-Lösung entspricht. Die in den nachfolgenden Abschnitten genannten Anteile des Proteins beziehen sich immer auf die gesamte Stoffmenge. Bei tertiären Mischungen mit DMPC und Chol werden diese zusammen

als Lipid-Anteil des Ansatzes gerechnet. Somit besteht eine beispielhafte Probe von 10% GramD und einem Chol-Gehalt von 20% im Lipid-Anteil aus 10% GramD, 18% ($90\% \cdot 20\%$) Chol und 72% ($90\% \cdot 80\%$) DMPC. Die Proben wurden anschließend über Nacht im Vakuum getrocknet, um Lösungsmittelreste zu entfernen. Erst danach erfolgte der Einbau der präparierten Proben in den Messaufbau zur Untersuchung mit der jeweiligen Messmethode.

In weiteren Versuchen wurde außerdem isoliertes GramD auf einer hydrophoben Oberfläche untersucht. Probenpräparation und Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abschnitt 6.2 zu finden.

6.1. Gramicidin-haltige Lipid-Oligobilagen

Wie bereits in vorigen Kapiteln beschrieben, ist die Untersuchung von biologischen Proben mithilfe von Reflektometrie ein komplexes Unterfangen. Die Anpassung der Reflektometrie-Profile, woraus sich die gesuchten strukturellen Parameter der Probe ergeben, ist nicht trivial und bedarf der Vorkenntnis des ungefähren Aufbaus der Probe, um ein geeignetes Modell zu wählen. Weiter ist insbesondere die zur Verfügung stehende Zeit an NR-Instrumenten für gewöhnlich stark begrenzt, weshalb es wichtig ist, Proben auszuwählen, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit verwertbare Ergebnisse liefern. Somit waren Voruntersuchungen an den Modellsystemen notwendig, welche zunächst mit einfach verfügbaren Messmethoden stattfanden. Vielversprechende Probenzusammensetzungen wurden später mithilfe komplementärer Methoden näher untersucht.

6.1.1. Voruntersuchungen von Gramicidin-haltigen Lipid-Oligobilagen mit ATR-FTIR

Der Einfluss von AuNPs auf GramD-haltige Lipid-Oligobilagen sollte mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie und XRR untersucht werden. Letzteres scheiterte jedoch, da das Befüllen der entsprechenden Flüssigkeitszellen jeweils zu einem Ablösen der Probe führte. Aus diesem Grund werden in dem aktuellen Abschnitt nur Untersuchungen mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie beschrieben.

Erste Untersuchungen fanden an DMPC-Oligobilagen statt, bei denen 10% der Lipide beim Ansetzen der zur Rotationsbeschichtung verwendeten Lösung gegen Proteine ausgetauscht wurden. Ein direkter Vergleich der erhaltenen Spektren, wie in Abbildung 6.1 zu sehen, zeigt einen zusätzlichen Peak bei $\tilde{\nu} = 1630 \text{ cm}^{-1}$, welcher bei Proben ohne Proteine nicht zu erkennen ist. Hierbei handelt es sich um eine charakteristische Schwingungsbande vom Amid-Bindungen. Die Primärstruktur der Proteine ist eine Verknüpfung von Aminosäuren, wobei durch Kondensation der Amin- und Carbonsäuregruppen benachbarter Aminosäuren die Peptidbindung entsteht, die chemisch den Amiden gleicht. Bei der beobachteten Bande handelt es sich explizit um die sogenannte Amid-I Bande.^[192] Lage und Form der Bande ist dabei nicht nur von der Primärstruktur des Proteins abhängig, sondern auch von dessen Sekundärstruktur. Weitere typische Amid-Banden sind die Amid-II ($\tilde{\nu} = (1570 \sim 1470) \text{ cm}^{-1}$) und Amid-III Bande ($\tilde{\nu} = (1350 \sim 1250) \text{ cm}^{-1}$), die jedoch aufgrund der starken Si-Absorptionsbanden des ATR-Kristalls nicht zu erkennen sind.^[192] Eine weitere charakteristische Schwingungsbande von Proteinen ist die Amid-A Bande, welche laut Literatur im Bereich von $\tilde{\nu} = (3500 \sim 3300) \text{ cm}^{-1}$ zu finden ist.^[192] Zwar war in den Spektren der proteinhaltigen Probe in diesem Bereich eine schwache

Absorptionsbande zu erkennen, jedoch kann hier auch die Valenzschwingungsbande von H_2O gefunden werden, welches aufgrund von Luftfeuchtigkeit im Strahlengang oder Kontamination der Flüssigphase in den Spektren auftauchen kann. Somit ist die Herkunft der Absorptionsbande nicht genau bestimmt, weshalb sie für eine zuverlässige Auswertung ungeeignet ist. Weiter ist zu erkennen, dass die CH_2 - und CH_3 -Valenzschwingungsbande im Spektrum der proteinhaltigen Probe bedeutend schwächer verglichen mit denen der proteinfreien Probe sind. Beide Spektren wurden auf $\nu_{\text{CH}_2, \text{asym}}$ normiert, weshalb sich dieser Effekt an den stärkeren Si- und D_2O -Absorptionsbanden der proteinhaltigen Probe bemerkbar macht. Diese Beobachtung entspricht der Erwartung, da ein Teil der Lipide, welche den größten Beitrag zu den genannten Banden liefern, hier ausgetauscht wurde.

In getrennten Versuchen wurden proteinhaltigen Oligobilage daraufhin einer Lösung von AuNPs ausgesetzt, um den Einfluss dieser auf die Probe zu untersuchen. Insbesondere war von Interesse, ob sich die Form der Amid-I Bande signifikant ändern würde, was auf eine Änderung der Proteinfaltung hinweisen würde. Auch sollte so geprüft werden, ob ein stabilisierender Effekt, ähnlich wie bei Zusatz von Chol, wie in Abschnitt 5.4 beschrieben, auftritt. Es wurde eine binäre Probe aus DMPC und GramD untersucht, und eine tertiäre, in welcher zusätzlich 30% des verwendeten Phospholipids gegen Chol ausgetauscht wurde.

Abbildung 6.2 zeigt die basislinienkorrigierten Spektren der untersuchten Chol-freien Probe vor und 2 h nach Zugabe von $10 \mu\text{g/ml}$ 2 nm AuNPs. Es war eine deutliche Abnahme sowohl der CH_2 -Valenzschwingungsbanden als auch der Amid-I Bande nach Einwirken der NPs zu erkennen. Im Einzug ist der zeitliche Verlauf der $\nu_{\text{CH}_2, \text{sym}}$ und Amid-I Bande aufgetragen. Hierzu wurden die Peaks mithilfe von Lorentz-Funktionen angepasst, wobei zur akkuraten Anpassung der Amid-I Bande zwei gefaltete Funktionen verwendet werden mussten. Die eingetragenen Datenpunkte entsprechen den Flächen unter

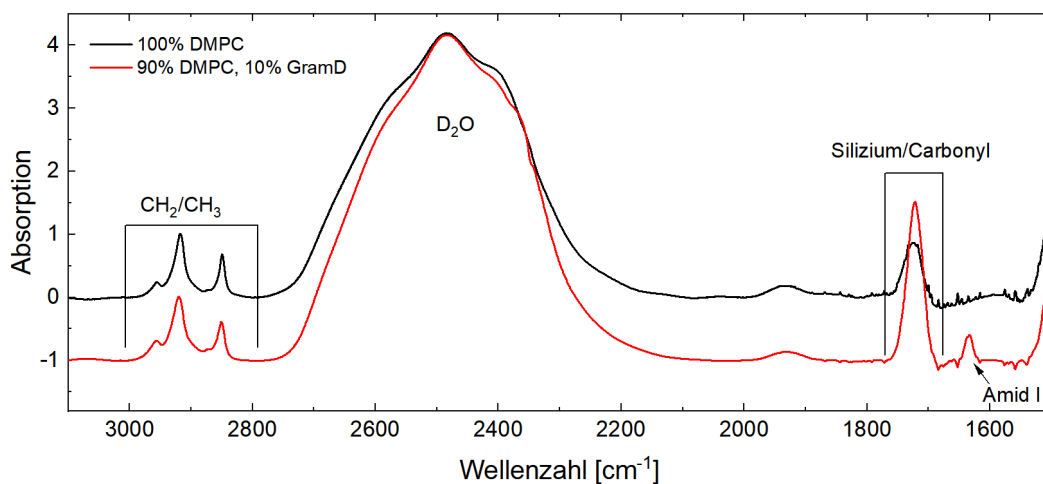


Abbildung 6.1: Vergleich von ATR-FTIR-Spektren einer Probe aus DMPC-Oligobilagen mit einer Probe aus 90% DMPC-Oligobilagen mit 10% GramD, jeweils unter D_2O aufgenommen. Die Spektren wurden basislinienkorrigiert und auf die asymmetrische CH_2 -Valenzschwingungsbande normiert. Durch die Inkorporation des Proteins ist zusätzlich die Amid I Band zu erkennen. Da die Probe weniger Lipid enthält, sind die damit assoziierten Banden verglichen mit den Banden von Silizium und D_2O schwächer als bei der reinen Probe.

den erhaltenen Kurven. Bis etwa 30 min nach Zugabe der AuNPs war keine signifikante Änderung der Peakintensitäten zu erkennen, was in etwa dem Zeitraum entspricht, in dem sich ein Gleichgewicht in der Partikelverteilung der Flüssigphase einstellt. Ab diesem Zeitpunkt war für beide Schwingungsbanden eine Abnahme der Intensität zu beobachten, der bis etwa 45 min nach Beginn der Messungen fast deckungsgleich verlief, woraufhin jedoch eine schnellere Abnahme der Amid-I Bande beobachtet wurde. Die könnte darauf hinweisen, dass Proteine durch Bindung an die AuNPs aus der Probe extrahiert wurden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Abweichung der Intensitätsverläufe zumindest teilweise auf Probleme bei der Basislinienkorrektur der Amid-I Bande zurückzuführen ist. Aufgrund des Auftretens negativer H_2O -Rotationsschwingungsbanden, welche durch eine nicht ausreichende Trocknung bei der Aufnahme des Hintergrundspektrums entstanden, war das Festlegen der Ankerpunkte der verwendeten Spline-Funktion schwierig. Es konnten so nur wenige Ankerpunkte nahe der Bande gesetzt werden, was teilweise erhebliche Einflüsse auf die resultierende Form dieser hatte.

Soll der hier beobachtete Abbau der Absorptionsbanden mit denen der reinen DMPC-Oligobilagen bei Interaktion mit AuNPs, wie in Abschnitt 5.3.2 zu sehen, verglichen werden, muss zunächst angenommen werden, dass die Gesamtdicke der Proben ähnlich ist. Da die Intensität des evaneszenten Feldes mit dem Abstand zur Substratoberfläche exponentiell fällt, sind gleiche Änderungen durch zum Beispiel Ablöseprozesse bei dickeren Proben weniger gut sichtbar als bei dünnen. Aufgrund der identischen Stoffmengenkonzentration der zur Rotationsbeschichtung verwendeten Lösung kann diese Annahme als legitim angesehen werden. Die proteinhaltige Probe verlor über den beobachteten Zeitraum etwa 20~25% ihrer ursprünglichen Bandenintensitäten. Dahingegen wurde bei der proteinfreien Probe in Abschnitt 5.3.2 ein Intensitätsverlust von 15~20% über einen Zeitraum von etwa 3 h beobachtet, was für einen deutlich langsameren Abbau der Probe durch die AuNP spricht. Dahingegen war jedoch kein langsamerer Start wie in Abbildung 6.2 zu erkennen und eine Abnahme war bereits in den ersten Messpunkten zu erkennen. Ein großer Unterschied bestand jedoch in den

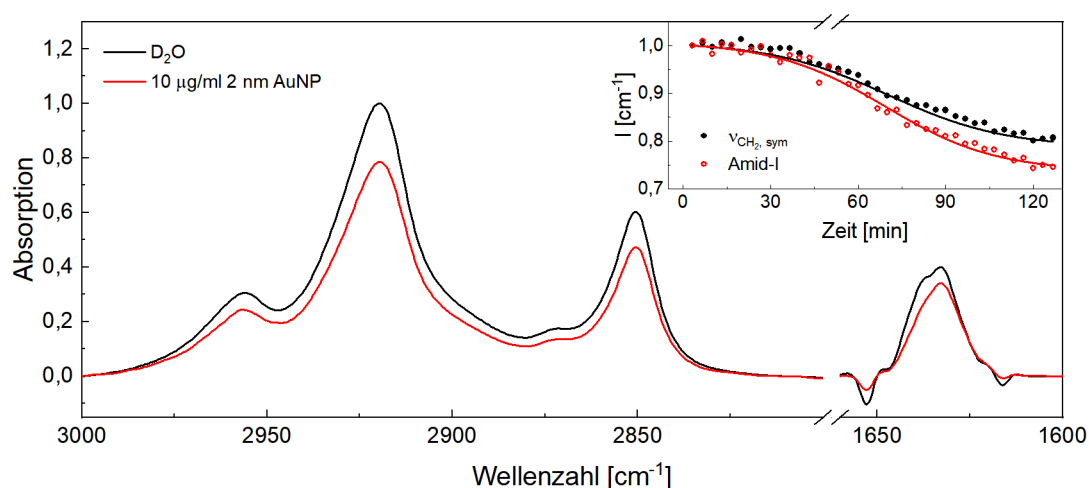


Abbildung 6.2: Einfluss von 2 nm AuNPs auf die CH_2 - und Amid-I-Banden einer Probe von DMPC-Oligobilagen mit 10% GramD-Anteil. Der Einzug zeigt die zeitliche Änderung der symmetrischen CH_2 -Streckschwingungsbande und der Amid-I-Bande nach Zugabe der AuNP. Die Spektren zeigen den Zustand vor Zugabe (schwarz), sowie das letzte gemessene Spektrum nach Zugabe (rot).

verwendeten AuNPs. Während für die an dieser Stelle diskutierten Messserien AuNPs mit einem Durchmesser von 2 nm verwendet wurden, waren die proteinfreien Proben in Abschnitt 5.3.2 5 nm AuNPs ausgesetzt. Dies kann deutliche Einflüsse auf die Art der Interaktion von Oligobilagen und NPs haben.

Um die Geschwindigkeit des Abbaus der proteinhaltigen Probe zu quantifizieren, wurden die Datenpunkte mithilfe einer Boltzmann-Funktion angepasst (siehe Gleichung (5.3)). Hierbei entsprach $A_{1/2}$ dem theoretischen Start-, beziehungsweise Endwert der Bandenintensität, x_0 dem Wendepunkt der angepassten Funktion und dx der Zeitkonstante, welche das Maß für die Geschwindigkeit des betrachteten Prozesses darstellt. Ein großes dx bedeutet hierbei eine langsame Geschwindigkeit. Die so erhaltenen Parameter sind in Tabelle 6.2 aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass sowohl dx als auch x_0 innerhalb ihrer Standardabweichungen für die angepassten Kurvenverläufe übereinstimmen. Weiter kann mithilfe der erhaltenen Parameter berechnet werden, welche Zeit benötigt wird, sodass die Bandenintensität eine Abweichung von A_2 von unter 1% aufweist. Dies kann als Erreichen des Gleichgewichtszustands gewertet werden. Da Gleichung (5.3) zwischen A_1 und A_2 definiert ist, kann diese mit dem Wert von $1,01 \cdot A_2$ gleichgesetzt und nach x umgeformt werden. Somit ergibt sich:

$$x_{GG} = x_0 + dx \cdot \ln \left(100 \cdot \frac{A_1 - A_2}{A_2} - 1 \right) \quad (6.1)$$

Für beide ausgewertete Schwingungsbanden ergibt sich so eine Zeit für das Erreichen des Gleichgewichtszustandes von etwa 137 min, was bedeutet, dass dieser zum Ende der Messung noch nicht erreicht war. Für die Untersuchung der proteinfreien Probe in Abschnitt 5.3.2 kann eine solche Abschätzung des Erreichens des Gleichgewichtszustandes nicht durchgeführt werden, da aufgrund des linearen Verlaufs keine Anpassung der Messdaten nach Gleichung (5.3) möglich ist.

Ein Einfluss der NPs auf die Faltung des Proteins konnte anhand der Form der Amid-I Bande nicht eindeutig nachgewiesen werden. Zwar konnten Änderungen der Bandenform erkannt werden, da die Messung jedoch wie oben erwähnt deutliche H₂O-Rotationsschwingungsbanden aufweist, ist unklar, ob die beobachteten Änderungen aufgrund der Faltung mit diesen oder tatsächlichen strukturellen Änderungen der Proteine verursacht wurden. Auch Methoden, um die Substruktur der Amid-I Bande sichtbar zu machen, wie die Fourier-Selbstentfaltung, benötigen ein Spektrum frei von atmosphärischen Absorptionsbanden, um verlässliche Ergebnisse zu liefern und konnten somit nicht angewandt werden.

6. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit integrealem Gramicidin

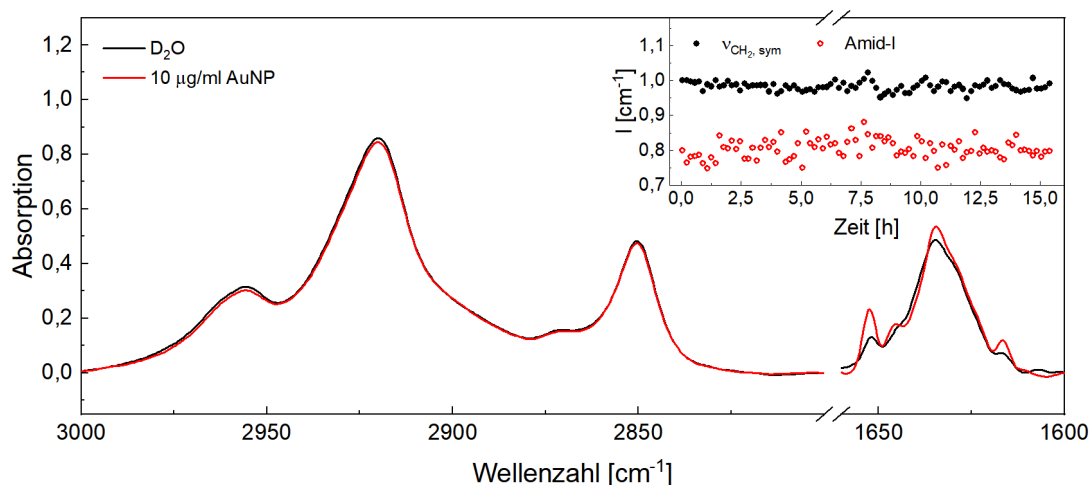


Abbildung 6.3: Einfluss von 2 nm AuNPs auf die CH_2 - und Amid-I-Banden einer Probe von Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD-Anteil. Der Anteil der Lipide besteht zu 70% aus DMPC und 30% aus Chol. Der Einzug zeigt den zeitlichen Verlauf der Intensität der symmetrischen CH_2 -Strettschwingungsbande und der Amid-I-Bande nach Zugabe von AuNPs, wobei die Werte letzterer zugunsten der Übersichtlichkeit versetzt abgebildet werden.

In einer weiteren Messserie wurde eine äquivalente Probe untersucht, deren Lipid-Anteil zu 30% aus Chol bestand. Auch hier wurde die Untersuchung auf ATR-FTIR-Spektroskopie beschränkt. Die erhaltenen Spektren und eine Auswertung der untersuchten Absorptionsbanden sind in Abbildung 6.3 dargestellt. Die Probe zeigte keinerlei signifikante Änderung durch die Zugabe der AuNPs im Bereich der CH_2 -Valenzschwingungsbanden. Zwar waren im Bereich der Amid-I Bande Änderungen bei $\tilde{\nu} = 1635 \text{ cm}^{-1}$ und $\tilde{\nu} = 1645 \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen, jedoch sind diese ebenso wie die entstandenen Absorptionsbanden bei $\tilde{\nu} = 1617 \text{ cm}^{-1}$ und $\tilde{\nu} = 1652 \text{ cm}^{-1}$ wahrscheinlich auf H_2O -Rotationsschwingungsbanden zurückzuführen. Da die Probe unter diesen Bedingungen über 15 h untersucht wurde, ist eine Änderung der Luftfeuchtigkeit im Strahlengang nicht verwunderlich. Über den gesamten Zeitraum wurden keinerlei Änderungen an den Bandenintensitäten oder -formen festgestellt, welche auf eine tatsächliche Änderung an der Probe selbst hinweisen.

Der Einzug in Abbildung 6.3 zeigt hier den zeitlichen Verlauf der Bandenintensitäten, welche analog zu den in Abbildung 6.2 dargestellten Bandenintensitäten erhalten wurden. Es ist naheliegend, dass die

Tabelle 6.1: Erhaltene Parameter nach Anpassung des zeitlichen Verlaufs der in Abbildung 6.2 aufgeführten Bandenintensitäten mithilfe von Boltzmann-Funktionen.

Parameter	$\nu_{\text{CH}_2, \text{sym}}$	Amid-I
$A_1 [\text{cm}^{-1}]$	$0,654 \pm 0,003$	$0,662 \pm 0,005$
$A_2 [\text{cm}^{-1}]$	$0,510 \pm 0,004$	$0,483 \pm 0,006$
$x_0 [\text{min}]$	$70,2 \pm 1,4$	$69,4 \pm 1,7$
$dx [\text{min}]$	$20,2 \pm 1,6$	$18,9 \pm 1,9$
R^2	$> 0,99$	$> 0,99$

Kombination von Chol und GramD die Probe stark genug stabilisierte, dass keine signifikante Wechselwirkung mit den AuNPs stattfinden konnte.

Eine stabilisierende Wirkung wurde für geringere Chol-Anteile bereits in Abschnitt 5.4 beschrieben. Es erscheint daher logisch, dass ein größerer Anteil an Chol den Effekt noch einmal verstärkt. Ähnliche stabilisierende Effekte wurden von Andreas Stöcklin für verschiedene Chol-Konzentrationen in DMPC-Oligobilagen nachgewiesen. Je mehr Chol in den Proben enthalten war, desto geringer war der Einfluss zugegebenen $MgCl_2$ oder AuNPs. Dies wurde mit einer geringeren Affinität der Kopfgruppen durch die eingelagerten Sterole begründet.^[156] Daher muss für weitere Untersuchungen ein geringerer Chol-Gehalt gewählt werden, um eine Interaktion der AuNPs mit den Oligobilagen, insbesondere der eingebetteten Proteine, beobachten zu können. Alternativ könnte auch auf das Sterol verzichtet werden, was jedoch ein Schritt weg von dem Ziel eines realistischen Modellsystems biologischer Zellmembranen ist. Zwar existieren diese auch Chol-frei, jedoch ist die Untersuchung eines allgemeinen Modellsystems attraktiver.

6.1.2. Untersuchung proteinhaltiger Lipid-Oligobilagen mithilfe komplementärer Messtechniken

Aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurden Probenzusammensetzungen ausgewählt, welche mithilfe des in Abschnitt 4.5 beschriebenen Messaufbaus mit NR, ATR-FTIR-Spektroskopie und SE untersucht werden sollten. Entsprechende Messungen fanden am Instrument D17 des ILL statt. Eine Untersuchung mit komplementären Messtechniken bietet hier, wie auch in Abschnitt 5.4 beschrieben, den Vorteil, den Spekulationsraum, welcher bei Interpretation der erhaltenen Ergebnisse vorhanden ist, möglichst weit einzugrenzen. Änderungen an den IR-Absorptionsbanden, die wie in Abschnitt 6.1.1 eine Änderung an der Probe aufzeigen, können somit mittels NR in Einklang mit den daraus erhaltenen Parametern des Probenaufbaus gebracht werden. Im Umkehrschluss kann anhand der Ergebnisse der Untersuchung mit ATR-FTIR-Spektroskopie und SE rückgeschlossen werden, ob das zur Simulation der NR-Profile gewählte Modell die Probe ausreichend gut beschreibt, um die beobachteten Änderungen sinnvoll darzustellen.

Analog zu den in Abschnitt 6.1.1 beschriebenen Ergebnissen wurden zwei Proben mit einem GramD-Anteil von 10% untersucht. Hierbei bestand bei einer Probe der Lipid-Anteil aus reinem DMPC, bei der anderen Probe waren 20% des Lipid-Anteils durch Chol ausgetauscht. Aufgrund experimenteller Probleme wurde jedoch bei der Untersuchung der Cholesterol-freien Probe der Durchfluss des Peristaltik-Systems während der Messungen gestört. Da dies erst spät bemerkt wurde, wurde nach Wiederherstellen des Durchflusses der Flüssigphase der Probe ein Gemisch aus mehreren Fremdstoffen hinzugefügt. Die so beobachteten Änderungen können deshalb nicht der Interaktion mit einer bestimmten Substanz zugeordnet werden, weshalb die Messergebnisse dieser Probe für die vorliegende Arbeit verworfen werden mussten.

Für die hier diskutierten Untersuchungen wurden zwei verschiedene AuNP-Ansätze verwendet. Diese wurden im Vorfeld mithilfe von REM charakterisiert. Die als „2 nm AuNP“ bezeichneten Artikel zeigten hier einen durchschnittlichen Durchmesser von $(3,3 \pm 0,5)$ nm, die als „50 nm AuNP“ bezeichneten Partikel einen von (59 ± 10) nm. Die Bezeichnung bezog sich dabei auf die aufgrund der bei der Synthese verwendeten Tensid-Stoffmengen zu erwartenden Partikelgrößen (siehe Abschnitt

3.3.2). Bei den Untersuchungen wurden zunächst die kleineren Partikel in zwei Konzentrationen verwendet, anschließend wurden die großen Partikel hinzugegeben, ebenso in zwei verschiedenen Konzentrationen.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnisse wurden bereits weniger detailliert im Abschnitt 4.5.1 behandelt, primär hinsichtlich der Eignung des Messaufbaus zur Untersuchung von Proben dieser Art. Hier wiederum soll explizit der Einfluss der verwendeten Partikel und des Salzes auf die Probe diskutiert werden. Zunächst wird hier die mit NR untersuchte Probenstruktur beschrieben. Diese Erkenntnisse werden anschließend mit den Ergebnissen komplementärer Messtechniken in Einklang gebracht.

Das zur Simulation der NR-Profile verwendete Modell ist in Tabelle 6.2 beschrieben. Die einzelnen Lipid-Bilagen enthalten hier neben DMPC sowohl Chol als auch GramD. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Proteins ist naheliegend, dass dieses, ebenso wie das Sterin, hauptsächlich in den Kettengruppen der Bilagen lokalisiert ist.^[193] Die SLD der Kettengruppenschicht konnte somit unter Annahme einer idealen Mischung nach Gleichung (5.1) berechnet werden. Die Struktur der Bilage wird wie in Abschnitt 5.2.2 bereits beschrieben durch die Einlagerung von Chol modifiziert. Auch das Gramicidin beeinflusst die Struktur der Bilage. In gegenüberliegenden Kettengruppen-Schichten eingelagerte Gramicidine können eine energetisch günstige gestapelte Anordnung einnehmen und so einen Ionenkanal über die Bilage bilden.^[193] Somit werden sowohl Dicke, SLD, als auch die Rauigkeit aller Probenschichten beeinflusst. Für die Anpassung des Modells waren somit mehr Parameter vonnöten als bei den bereits diskutierten einfacheren Systemen, auch da Voruntersuchungen wenig Aufschluss lieferten, um den Parameterraum weiter einzugrenzen. Weiter zeigte eine Betrachtung der Bragg-Peaks und Kiessig-Oszillationen des NR-Profiles der Probe unter reinem D₂O keine ganzzahlige Anzahl an Bilagen. Ein einfaches Modell wie zuvor konnte somit nicht mehr zur verlässlichen Simulation genutzt werden. Stattdessen wurde eine Mischung aus zwei Modellen verwendet, die sich in der Zahl ihrer inneren Wiederholeinheiten ($N - 3$) um 1 unterschieden. Beide Modelle wurden dabei gleich gewichtet. Die äquivalenten Parameter zwischen den für eine Messbedingung verwendeten Modellen waren verknüpft. Aufgrund der so gestiegenen Komplexität konnten jedoch unterschiedliche Messbedingungen nicht länger parallel simuliert werden. Stattdessen wurde jeder Zustand separat angepasst, ohne dass äquivalente Parameter zwischen den einzelnen Bedingungen verknüpft waren. Die so erhaltenen Parameter sind in Tabelle 6.3 zu finden, Messpunkte und simulierte NR-Profile in Abbildung 6.4.

Tabelle 6.2: Angewandtes Modell zur Untersuchung von Neutronenreflektometrie-Messungen an Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD-Gehalt. Der Lipid-Anteil bestand aus DMPC und Chol im Verhältnis 4 : 1. Wie auch Chol verzerrt GramD die Bilagenstruktur und ist hauptsächlich in den mit den Kettengruppen assoziierten Schichten lokalisiert. Im Gegensatz zu dem in Abschnitt 5.4 beschriebenen Modell konnte hier jedoch die Dicke der Kettengruppen-Schicht d_{Kette} nicht in Voruntersuchungen ermittelt werden, weshalb dieser Parameter für die Simulation mit angepasst wurde. Die SLD dieser Schicht wurde unter Annahme einer idealen Mischung und vollständigen Lokalisierung des Proteins in der Schicht berechnet. Hierfür wurde die SLD von GramD mithilfe von Literaturwerten berechnet.^[144-145]

		Wiederholungen	d [Å]	SLD [10^{-6}Å^{-2}]	$iSLD$ [10^{-6}Å^{-2}]	ϕ [%]
Si	Silizium	1	—	2,07	0	0
SiO _x	Silizium-oxid	1	15	3,47	0	0
	Kopf	1	d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	Ketten		d_{Kette}	0,14	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	Kopf		d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	D ₂ O 1		d_{w1}	—	—	100
	Kopf	$N - 3$	d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	Ketten		d_{Kette}	0,14	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	Kopf		d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	D ₂ O 2		d_{w2}	—	—	100
	Kopf	1	d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	Ketten		d_{Kette}	0,14	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	Kopf		d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	D ₂ O 2		d_{w3}	—	—	100
	Kopf	1	d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	Ketten		d_{Kette}	0,14	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	Kopf		d_{Kopf}	ρ_{Kopf}	$\rho_{i, lip}$	ϕ_{lip}
	D ₂ O (Bulk)	—	—	—	0	—

Tabelle 6.3: Erhaltene Parameter der Anpassungen von Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD-Anteil bei Interaktion mit AuNP unter Verwendung des in Tabelle 6.2 beschriebenen Modells. Für die einzelnen Probebedingungen wurde eine kohärente Mischung aus unterschiedlichen Bilagenzahlen angenommen. Dabei wurde ein Anteil von jeweils 50% für die einzelnen Bilagenzahlen angenommen und alle äquivalenten Parameter für die anteiligen Modelle verknüpft. Eine Parameterverknüpfung zwischen den Modellen der einzelnen Probebedingungen fand nicht statt. Das kleine χ^2 der Messungen ab der hohen Konzentration der 2 nm AuNP kam durch eine geringere Zahl von Messpunkten zustande, da aufgrund fehlender relevanter Änderungen des Reflexionsprofils auf zeitaufwändige Messungen bis zu hohen Q verzichtet wurde.

Parameter	D ₂ O	10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ 2 nm AuNP	40 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ 2 nm AuNP	10 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ 50 nm AuNP	40 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ 50 nm AuNP
$\chi^2 [10^1]$	5,89	5,65	3,32	0,26	0,01
$\Delta Q/Q [\%]$	$8,96 \pm 0,01$	$7,69 \pm 0,04$	$8,05 \pm 0,05$	$7,15 \pm 0,08$	$9,78 \pm 0,08$
N	13/14	13/14	13/14	13/14	13/14
$d_{w1} [\text{\AA}]$	$0,33 \pm 1,53$	$0,23 \pm 1,41$	$0,65 \pm 1,48$	$3,23 \pm 0,9$	$3,21 \pm 9,8$
$d_{w2} [\text{\AA}]$	$15,4 \pm 1,0$	$15,8 \pm 0,8$	$16,6 \pm 0,8$	$14,7 \pm 0,1$	$16,9 \pm 6,1$
$d_{w3} [\text{\AA}]$	$34,1 \pm 1,5$	$30,2 \pm 1,4$	$28,0 \pm 1,4$	$25,4 \pm 0,7$	$26,8 \pm 9,6$
$d_{Kopf} [\text{\AA}]$	$9,91 \pm 0,93$	$9,81 \pm 0,76$	$10,07 \pm 0,71$	$9,91 \pm 0,93$	$9,03 \pm 3,79$
$d_{Kette} [\text{\AA}]$	$29,4 \pm 2,7$	$28,9 \pm 2,1$	$27,5 \pm 2,0$	$29,4 \pm 2,7$	$28,9 \pm 11,2$
$\rho_{Kopf} [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]$	$2,88 \pm 0,46$	$2,95 \pm 0,42$	$2,92 \pm 0,41$	$2,88 \pm 0,46$	$2,82 \pm 2,35$
$i\rho_{lip} [10^{-8} \text{\AA}^{-2}]$	$1,2 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2$	$5,0 \pm 2,2$
$\rho_w [10^{-6} \text{\AA}^{-2}]$	$6,08 \pm 0,01$	$5,99 \pm 0,01$	$5,90 \pm 0,01$	$5,92 \pm 0,02$	$5,92 \pm 0,02$
$\phi_{w,lip} [\%]$	61 ± 1	59 ± 1	57 ± 1	61 ± 1	59 ± 6
$\sigma [\text{\AA}]$	$10,5 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,4$	$10,5 \pm 0,3$	$10,5 \pm 0,4$	$12,1 \pm 2,2$
S_{w2}	1	$1,03 \pm 0,08$	$1,08 \pm 0,09$	$0,95 \pm 0,06$	$1,10 \pm 0,40$

Durch die Verwendung des gemischten Modells konnten insgesamt zufriedenstellende Anpassungen der Reflexionsprofile erhalten werden. Ein signifikanter Einfluss der NPs war jedoch nicht zu erkennen. Da die gemessenen Profile optisch größtenteils identisch waren, war zu erwarten, dass auch die simulierten Probenparameter keine signifikanten Änderungen durch die Interaktion mit AuNPs zeigen würden. Es fällt außerdem auf, dass die Standardabweichungen der erhaltenen Parameter bedeutend größer ausfielen, als dies bei zuvor beschriebenen Untersuchungen der Fall war. So waren beispielsweise die Standardabweichungen der Schichtdicken Δd_i in etwa eine Größenordnung größer als die der äquivalenten Parameter in den in Kapitel 5 diskutierten Simulationen. Insbesondere die Parameter der Messung nach Zugabe von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 50 nm AuNPs zeigten sehr große Fehlerwerte. Hintergrund war höchstwahrscheinlich der deutlich vergrößerte Parameterraum. Jedoch ist es dennoch möglich, die erhaltenen Parameter mit denen der proteinfreien gemischten Lipid-Oligobilagen aus Abschnitt 5.4 zu vergleichen. Auffällig war, dass die Dicke der ersten Wasserzwichenschicht d_{w1} unter den untersuchten Bedingungen deutlich kleiner ausfiel als bei vorherigen Untersuchungen. Ebenso war d_{w3} im Vergleich deutlich größer. Unter reinem D₂O war lediglich d_{w2} ähnlich groß wie bei den zuvor diskutierten Probenzusammensetzungen. Es kann jedoch nicht eindeutig gesagt werden, ob diese

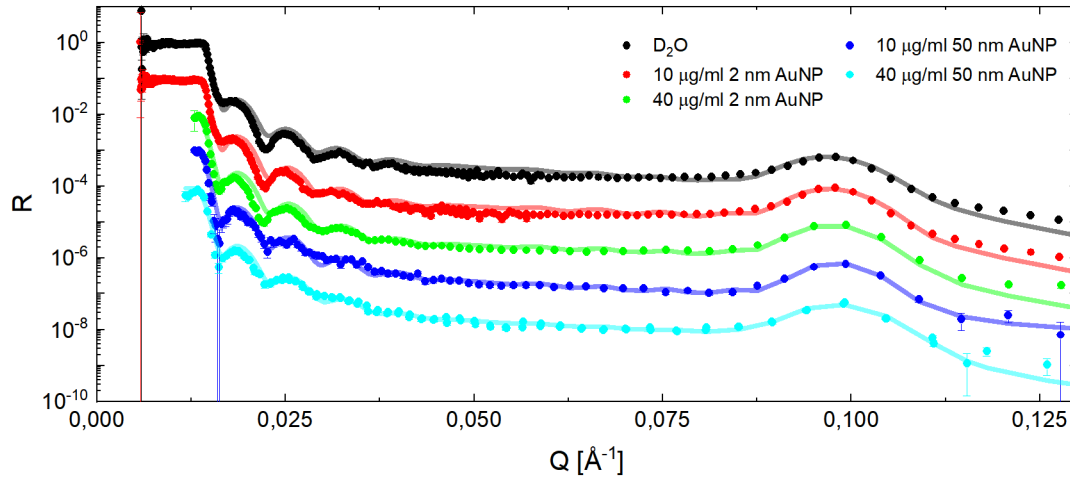


Abbildung 6.4: Erhaltene NR-Profile von Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD auf Si-Substraten unter D_2O und nach Zugabe von AuNP. Der Lipid-Anteil bestand aus einer Mischung von DMPC und Chol im Verhältnis 4 : 1. Anpassungen nach dem in Tabelle 6.2 beschriebenen Modell sind als transparente Linien eingezeichnet. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 6.3 zu finden.

Beobachtung aufgrund des eingebauten GramD auftrat, oder ob es sich lediglich um eine Anomalie der Probe handelte. Wie erwartet wurden für die Dicke der mit den Kopfgruppen assoziierten Schichten d_{Kopf} etwas niedrigere Werte erhalten, was durch die beschriebene Verzerrung der Schichten durch die Einlagerung des Gramicidins erklärt werden kann.

Ein Einfluss auf die Rauigkeit der Schichten durch die Präsenz des Proteins verglichen mit den äquivalenten proteinfreien Proben war nicht zu erkennen. Da dieser Parameter alle Grenzflächen der Probe beschreibt, ist es möglich, dass der Einfluss des Gramicidins hier nicht zum Tragen kommt, da dieser in den einzelnen Grenzflächen unterschiedlich stark zur Geltung kommen kann. Dahingegen zeigte sich jedoch eine deutliche Abnahme der SLD der Kopfgruppen ρ_{Kopf} durch die Inkorporation des Proteins. Dieser Einfluss kann möglicherweise anhand des lateralen Platzbedarfs der eingelagerten Proteine erklärt werden. Somit sind weniger DMPC-Kopfgruppen in der Schicht enthalten. Unter Annahme, dass die Grundfläche, an der die Neutronenstreuung stattfindet unverändert blieb, kann angenommen werden, dass trotz der etwas kleineren Schichtdicke die resultierende SLD geringer ausfällt. Dies wäre jedoch ebenso für die Einlagerung von Chol zu erwarten gewesen, weshalb dieser Erklärungsansatz fraglich erscheint. Da ρ_{Kopf} wie in Abschnitt 5.1 beschrieben abhängig von der Hydratisierung der Kopfgruppen ist, könnte die beobachtete Abnahme des Parameters auf eine unvollständige Hydratisierung hinweisen. Auch dies erscheint durch Messbedingungen, bei denen die untersuchte Probe einer D_2O Flüssigphase ausgesetzt ist, unwahrscheinlich. Da es sich bei Gramicidin jedoch um ein stark hydrophobes Protein handelt, wäre es möglich, dass in dessen Umgebung die Kopfgruppen eine unvollständige Hydratisierung aufweisen. Ob dies ausreicht, um den beobachteten Effekt ausreichend zu beschreiben, ist jedoch fragwürdig. Letztlich kann keine sichere Aussage über die Ursache der beobachteten Abnahme des Parameters getroffen werden. Da es sich hierbei um die Untersuchung einer einzelnen Probe handelte, wären Wiederholungsmessungen sinnvoll, um ein einmalig auftretendes Phänomen auszuschließen.

6. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit integralem Gramicidin

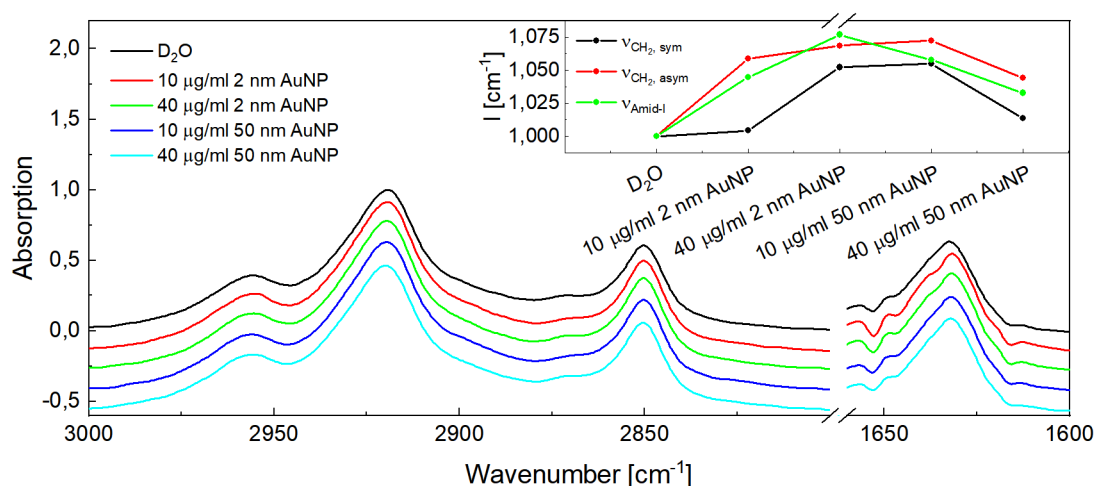


Abbildung 6.5: Erhaltene ATR-FTIR-Spektren von Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD auf Si-Substraten unter D_2O und nach Zugabe von AuNP. Der Lipid-Anteil bestand aus einer Mischung von DMPC und Chol im Verhältnis 4 : 1. Die Spektren wurden mithilfe einer polynomiellen Anpassungen basislinienkorrigiert und anschließend auf die Bandenintensität der asymmetrischen CH_2 -Valenzschwingungsbande normiert. Der Einzug zeigt die Entwicklung beider CH_2 -Valenzschwingungsbanden, sowie der Amid-I-Bande nach Anpassung mit Lorentz-Funktionen, wobei alle Verläufe auf ihren jeweiligen Wert bei der Messung unter D_2O normiert wurden.

Die simultan zu den bis hierhin beschriebenen NR-Profilen gemessenen IR-Spektren wurden wie in vorherigen Abschnitten basislinienkorrigiert und sind in Abbildung 6.5 zu sehen. Die Spektren zeigten eine deutliche Präsenz von Etalons, was die Basislinienkorrektur erschwerte. Ähnlich wie bei den NR-Profilen waren nur geringe Änderungen der mit der Probe assoziierten Absorptionsbanden durch Interaktion mit AuNPs zu erkennen. Eine schwache Zunahme der Bandenintensitäten wurde während Fortschreiten der Messserien beobachtet, die jedoch wahrscheinlich auf eine suboptimale Basislinienkorrektur zurückzuführen sind. Die Form der Amid-I Bande zeigte geringfügige Änderungen, die jedoch auf die Präsenz negativer H_2O -Rotationsschwingungsbanden zurückzuführen ist. Aufgrund des langen Strahlengangs des verwendeten Aufbaus stand vor Messbeginn nicht genug Zeit zur Verfügung, diesen ausreichend mit Stickstoff zu spülen, weshalb die Luftfeuchtigkeit im Inneren des Tubus-Systems über die mehrstündige Messung abnahm. Insgesamt konnte somit kein deutlich abweichendes Verhalten der Probe verglichen mit der in Abschnitt 6.1.1 behandelten Chol-haltigen Probe erkannt werden, obwohl hier ein geringerer Chol-Gehalt gewählt wurde.

Nachdem die Probe auf ihre Interaktion mit AuNPs untersucht wurde, wurde der Flüssigphase 50 mM $MgCl_2$ hinzugefügt. Die so beobachteten Einflüsse auf die NR-Profile und IR-Spektren sind in Abbildung 6.6 dargestellt. Beide Messmethoden zeigten ein Quellen der Probe durch das Salz. Die NR-Profile konnten nicht mehr länger mithilfe des zuvor beschriebenen Modells simuliert werden, jedoch gibt die Lage des Bragg-Peaks Q_{Bragg} Aufschluss über die Dicke der Wiederholeinheiten. Die beobachtete Verschiebung lässt somit auf einen Quellprozess schließen, wobei die Dicke der Wiederholeinheit wie folgt berechnet werden kann:

$$d_{wdh} = \frac{Q_{Bragg}}{2\pi} \quad (6.2)$$

Mithilfe der Dicke der inneren Wiederholeinheiten der Messung unter D₂O (Tabelle 6.3) wurde so der Quellfaktor S_{w2} berechnet, dessen zeitlicher Verlauf im Einzug von Abbildung 6.6 A zu sehen ist. Erste Quellprozesse der Probe waren somit nach etwa 45 min zu erkennen. Es ist anzunehmen, dass die MgCl₂-Konzentration zuvor in der Flüssigkeitszelle zu gering war, als dass ein Effekt zu beobachten gewesen wäre. Über die nächsten 3 h wurde ein Quellprozess bis zu einem Quellfaktor von $S_{w2} \approx 1,75$ beobachtet. Jedoch war auch danach noch ein langsamer Anstieg von S zu erkennen. So wurde nach etwa 10 h $S_{w2} \approx 1,83$ erreicht. Die beobachteten Änderungen zeigen jedoch nicht nur einen Quellprozess, da in diesem Fall ein intensiverer Bragg-Peak zu erwarten wäre, wie in Simulationen eines Modells mit entsprechendem Quellfaktor gesehen werden konnte. Auch eine Reduktion der Bilagenzahl ist nicht ausreichend, um das NR-Profil zu simulieren. Es ist wahrscheinlich, dass durch das starke Quellen in einer größeren Unordnung der Probe resultiert, die einen größeren Parameterraum benötigen würde, um das NR-Profil zufriedenstellend zu simulieren. So könnten zum Beispiel analog zu dem in Tabelle 6.2 beschriebenen Modell weitere Spezies mit unterschiedlicher Bilagenzahl verwendet werden. Aufgrund der Komplexität würde dies jedoch auch zu größeren Ungenauigkeiten der einzelnen Parameter führen.

Im Gegensatz zu den beschriebenen NR-Profilen war der Einfluss des Salzes auf die gemessenen IR-Spektren ab den ersten Messpunkten zu erkennen (siehe Abbildung 6.6 B). Bereits die erste Messung zeigte eine geringere Intensität aller mit der Probe assoziierten Absorptionsbanden. Es wäre möglich, dass dieser Unterschied darauf zurückzuführen ist, dass NR eine regelmäßige Probenordnung benötigt, während mit ATR-FTIR-Spektroskopie alle im evaneszenten Feld angeregten Moleküle zur Absorption beitragen, unabhängig von ihrer Ordnung. Da in den NR-Profilen jedoch zu Beginn der Messserie sowohl Bragg-Peaks als auch Kiessig-Oszillationen zu erkennen waren ist anzunehmen, dass die Ordnung der Probe zu diesem Zeitpunkt noch gegeben ist. Es wäre denkbar, dass die äußeren Wasserzwichenschichten der Proben zuerst zunehmen, was die innere Ordnung zu Beginn der Messungen weniger stark beeinflussen würde. Auch ist der Footprint des IR-Strahls wesentlich kleiner als der des Neutronenstrahls, womit lokale Effekte möglicherweise überrepräsentiert sein könnten. Eine parallele Untersuchung mit SE zeigte einen nicht-monotonen Kurvenverlauf innerhalb der ersten 30 min, was auf lokale Änderungen der Probe hinweisen kann, im weiteren Verlauf der Messserie waren die mit SE erhaltenen Parameter jedoch nicht mehr belastbar (siehe Abschnitt 4.5.1). Die genaue Ursache für das unterschiedliche Verhalten der Probe bei der Untersuchung mit NR und ATR-FTIR-Spektroskopie kann somit nicht geklärt werden.

6. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit integrealem Gramicidin

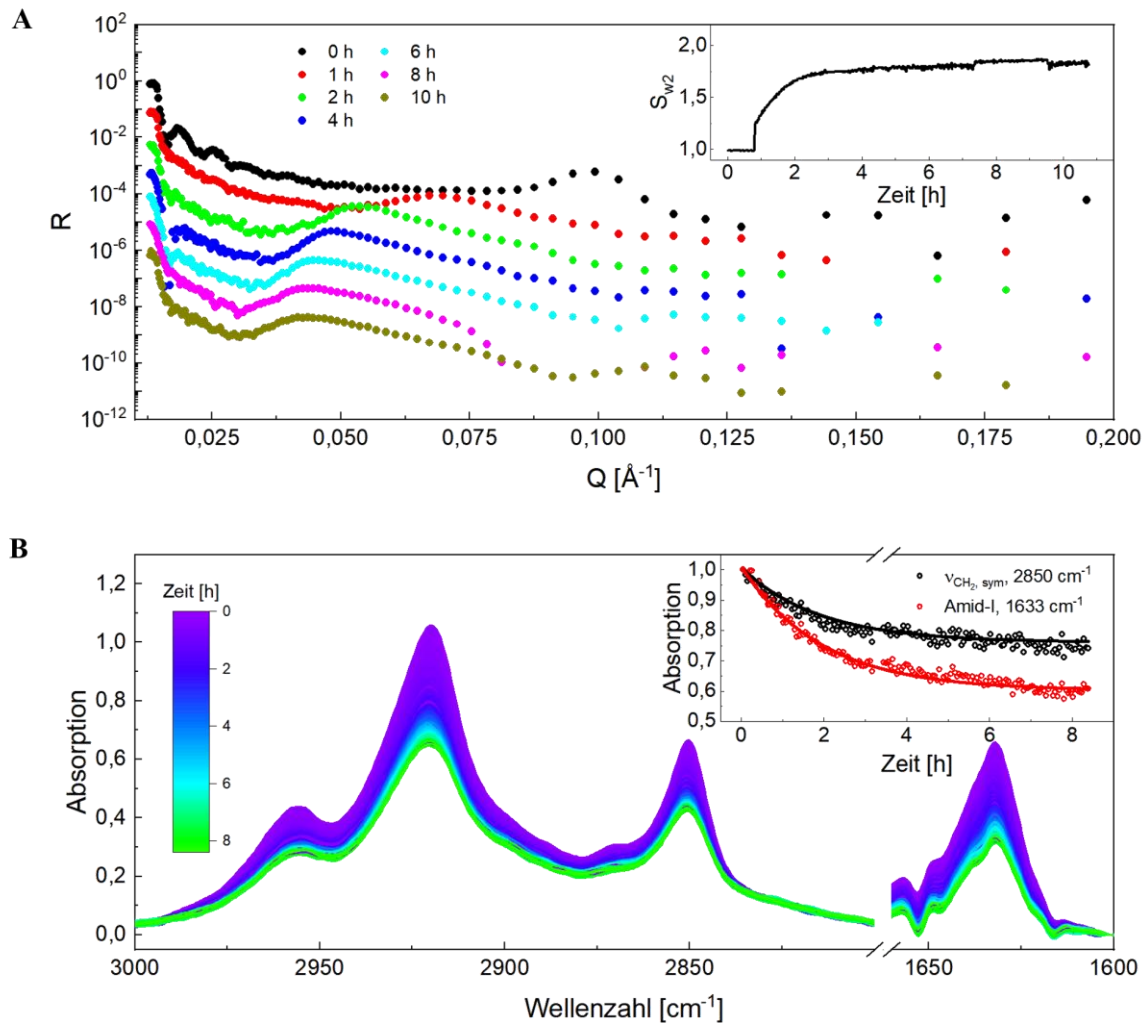


Abbildung 6.6: Einfluss von 50 mM MgCl_2 auf Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD unter D_2O , beobachtet durch simultane Untersuchung mit NR und ATR-FTIR über 10,5 h. Der Lipid-Anteil der Probe bestand aus einer Mischung von DMPC und Chol im Verhältnis 4 : 1. **A** Beobachtete Änderung an NR-Profilen der Probe. Durch an Lipid-Kopfgruppen angelagerte Mg^{2+} -Ionen induziertes Quellen der Probe wird der Bragg-Peak in den NR-Profilen zu kleinen Streuvektoren Q verschoben. Der Einzug zeigt den anhand der Position des Bragg-Peaks bestimmten Quellfaktor S_{w2} der Probe. **B** Entwicklung der simultan gemessenen ATR-FTIR-Spektren. Sowohl die CH_2 -Banden als auch die Amid-I-Bande zeigen eine Abnahme der Bandenintensität, während keine relevanten Änderungen an den Bandenformen zu beobachten sind. Der Einzug zeigt den zeitlichen Verlauf der nach Anpassung mit Lorentz-Funktionen bestimmten Bandenintensitäten der symmetrischen CH_2 -Bande und der Amid-I-Bande. Beide Verläufe wurden mit einem exponentiellen Abfall angepasst, die erhaltenen Verläufe sind als Linien eingezeichnet.

Die gemessenen Absorptionsbanden wurden mithilfe von Lorentz-Funktionen angepasst und die Fläche der so erhaltenen Peaks berechnet. Für die Amid-I Bande wurde dabei wie zuvor eine Faltung zweier Peaks verwendet und deren Summe für die weitere Auswertung betrachtet. Für die im Einzug von Abbildung 6.6 B dargestellte zeitliche Entwicklung wurden die erhaltenen Bandenintensitäten auf den Wert des ersten Messpunktes normiert. Ähnlich wie bei der NR-Messung wurde eine starke Abnahme der Bandenintensitäten in den ersten 3 h beobachtet, welche auf Quell- und Ablöseprozesse der Oligobilagen schließen lassen. Über die restliche Dauer der Messserie wurde auch hier ein langsames

Fortschreiten des Prozesses beobachtet. Die Kurvenverläufe wurden anschließend mit einer Funktion des exponentiellen Abfalls angepasst, welche in OriginPro implementiert war:

$$y(t) = y_{\infty} + A_1 e^{-kt} \quad (6.3)$$

Hierbei entspricht y_{∞} der Absorption bei $t \rightarrow \infty$, A_1 entspricht dem Anfangswert der Absorption und k der Geschwindigkeitskonstante. Diese ist umso größer, je schneller der beobachtete Prozess abläuft. Gleichung (6.3) entspricht dem Zeitgesetz der Reaktionskinetik erster Ordnung, verschoben um y_{∞} . Es muss jedoch angemerkt werden, dass aufgrund des evaneszenten elektrischen Feldes bei ATR-FTIR-Spektroskopie kein trivialer Zusammenhang zwischen Konzentration und Absorption besteht, weshalb es sich bei den beobachteten Prozessen nicht um eine reelle Reaktion erster Ordnung handelt. Die nach Anpassung erhaltenen Parameter sind in Tabelle 6.4 zu finden. Wie zu sehen ist, stimmte k für beide ausgewertete Absorptionsbanden innerhalb der Fehlergrenzen überein. Der geringe Unterschied war wahrscheinlich auf Probleme bei der Basislinienkorrektur der Spektren zurückzuführen, da wie in vorherigen Messungen an der Probe deutliche Etalons und H_2O -Rotationsschwingungsbanden zu sehen waren. Es konnten jedoch deutliche Unterschiede für y_{∞} beobachtet werden. Hier zeigte die Amid-I Bande eine bedeutend stärkere Abnahme der Bandenintensität relativ zum Ausgangswert. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass die inkorporierten Proteine nicht homogen über die Lipid-Oligobilagen verteilt, sondern ihr Anteil in den äußeren Bilagen größer ist als in den inneren war. Somit wären deren Absorptionsbanden stärker vom exponentiellen Verhalten des evaneszenten Feldes betroffen. Ebenso wäre es möglich, dass durch Interaktion mit den AuNP verstärkt Proteine aus den Bilagen herausgelöst wurden. Auch könnte es sich bei dem beobachteten Unterschied um eine Eigenart der Messmethode handeln. Aufgrund der Abhängigkeit der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes von den Brechungsindizes des ATR-Kristalls und der Probe, beziehungsweise Flüssigphase (siehe Gleichung (2.25)), werden Banden bei kleinen Wellenzahlen nichtlinear überrepräsentiert, weshalb hier der Eindruck von stärkeren Änderungen resultieren kann.

Eine detaillierte Untersuchung der Amid-I Bande mithilfe von Fourier-Selbstentfaltung konnte aufgrund der Präsenz von H_2O -Rotationsschwingungsbanden nicht erfolgreich durchgeführt werden. Ebenso konnten die CH_2 -Valenzschwingungsbanden aufgrund fehlender Parameter aus der Modellierung der NR-Profilen bei Salzeinfluss nicht simuliert werden, um hieraus die Schichtdicke zu bestimmen und diese mit den erhaltenen Quellfaktoren direkt in Beziehung zu setzen. Die insgesamt geringe Abnahme der Absorptionsbanden ist jedoch konsistent mit dem laut der Verschiebung des Bragg-Peaks erhaltenen Quellfaktor von $S_{w2} < 2$. Dieser ist weniger als halb so groß wie bei der Interaktion einer äquivalenten proteinfreien Probe mit 50 mM $MgCl_2$ (siehe Abschnitt 5.4). Dahingegen zeigte die rudimentäre Untersuchung der zu Beginn des aktuellen Abschnitts erwähnten Chol-freien Probe mit 10% GramD ähnliche Verschiebungen der Bragg-Peaks und somit ähnliche Quellfaktoren bei Interaktion mit $MgCl_2$.

Tabelle 6.4: Erhaltene Parameter nach Anpassung der in Abbildung 6.6 B dargestellten Absorptionsbanden mit einer Funktion des exponentiellen Abfalls.

Schwingungsbande	$k [h^{-1}]$	$y_{\infty}/y_0 [\%]$
$\nu_{CH_2, asym}$	$0,53 \pm 0,03$	$76,1 \pm 0,3$
Amid – I	$0,51 \pm 0,02$	$60,3 \pm 0,3$

Wie eingangs erwähnt wurde diese Probe jedoch aufgrund experimenteller Schwierigkeiten nicht weiter ausgewertet. Somit ist anzunehmen, dass die geringe Quellung hauptsächlich durch das eingebaute Protein verursacht wurde, während das Sterin eine untergeordnete Rolle spielte. Die Vermutung liegt nahe, dass das hydrophobe Gramicidin die Anlagerung von Mg^{2+} and die Kopfgruppen der Lipide behindert, was zu weniger Repulsion der einzelnen Bilagen führt. Alternativ könnte auch die Ausbildung einer gestapelten Anordnung der in benachbarten Bilagen eingebauten Protein-Helices zu einer attraktiven Wechselwirkung führen, was wiederum die durch Mg^{2+} verursachte Repulsion teilweise aufwiegt.

6.2. Gramicidin auf hydrophoben Oberflächen

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung von Gramicidin bietet dessen Absorption an modifizierten Oberflächen. Da es sich hierbei um ein hydrophobes Protein handelt, sollten Si-Substrate wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben mit einer Octadecylsilan-SAM präpariert werden. Die Ausbildung einer hydrophoben Beschichtung konnte dabei sowohl durch Benetzung mit vollentsalztem Wasser aufgrund des hohen Kontaktwinkels des Wassertropfens als auch mithilfe von IR-Spektroskopie und XRR nachgewiesen werden (siehe Abbildung 6.7). Im IR-Spektrum waren eindeutige Absorptionsbanden im Bereich von CH_2 -Valenzschwingungsbanden zu erkennen. Diese waren jedoch vergleichsweise schwach, weshalb die gemessenen Absorptionsbanden durch H_2O und CO_2 sehr intensiv erscheinen. Darüber hinaus waren auch Etalons deutlich sichtbar. In den gemessenen XRR-Profilen war ein Peak bei $Q = 0,109 \text{ \AA}^{-1}$ zu erkennen, jedoch konnte kein Modell gefunden werden, mit welchem das Profil zufriedenstellend angepasst werden konnte. Die Lage des Peaks lässt jedoch auf eine Probendicke von $(57,4 \pm 0,1) \text{ \AA}$ schließen, was in etwa der Länge zweier Octadecan-Ketten entspricht.^[194] Somit handelt es sich bei der Beschichtung nicht allein um eine SAM, sondern es befindet sich scheinbar noch eine zweite, physisorbierte Schicht auf dieser, die jedoch durch Abspülen mit Ethanol nicht entfernt werden konnte. Somit wird im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit stattdessen von einer Octadecylsilan-Beschichtung gesprochen.

Die Untersuchung adsorbierten Gramicidins erfolgte mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie. Hierzu wurde ein mit einer Octadecylsilan-Beschichtung versehener ATR-Kristall mit einer Lösung von 0,1% GramD in Chloroform für 10 min bei 200 rpm rotationsbeschichtet, was in einem ebenmäßigen Film resultierte. Zuvor wurde getestet, ob der Kontakt mit dem Lösungsmittel die Silan-Beschichtung beschädigt. Nach dem Abspülen eines beschichteten Substrats waren keinerlei Änderungen der hydrophoben Eigenschaften der Oberfläche zu erkennen, weshalb davon auszugehen war, dass die Beschichtung gegen Chloroform resistent war. Als Hintergrundspektrum wurde der Kristall direkt vor der Beschichtung mit dem Protein gegen PBS-Puffer in D_2O gemessen. Zum Ansetzen der Pufferlösung wurde eine PBS-Tablette zerstoßen und in der entsprechenden Menge D_2O gelöst. Die Verwendung der Pufferlösung bietet den Vorteil, Proteine in einer natur-ähnlichen Umgebung untersuchen zu können. Weiter sind die Messbedingungen so besser reproduzierbar, da eine solche Lösung weniger anfällig gegen Kontamination von Fremdsalzen oder Ansäuerung durch gelöstes CO_2 ist.

Ein IR-Spektrum des trockenen Proteins auf der hydrophoben Oberfläche ist in Abbildung 6.8 A zu sehen. Es ist eine starke Amid-I Absorptionsbande im Bereich von $\tilde{\nu} = (1700 - 1600) \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen. Diese zeigte auch hier H_2O -Rotationsschwingungsbanden, weshalb eine Analyse der Substruktur mithilfe von Fourier-Selbstentfaltung nicht durchgeführt werden konnte. Auch der Bereich von

$\tilde{\nu} = (2840 \sim 3010) \text{ cm}^{-1}$, in welchem typischerweise die CH_2 -Valenzschwingungsbanden zu finden sind, zeigt Absorptionsbanden. Jedoch sind diese weniger eindeutig zuzuordnen, als dies bei Lipiden der Fall ist. Das verwendete Protein enthält neben CH_2 - und CH_3 -Gruppen auch aromatische CH -Bindungen, welche in einem ähnlichen Bereich absorbieren. Weiter zeigt das Spektrum eine starke negative D_2O -Bande, was aufgrund der Verwendung eines Hintergrundspektrums unter D_2O zu erwarten war. Darüber hinaus ist eine Absorptionsbande bei $\tilde{\nu} = 3270 \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen. Diese wurde bereits in den in Abschnitt 6.1 beschriebenen Untersuchungen beobachtet. Es ist auch hier unklar, ob es sich hierbei um die Amid-A Bande handelt oder um auf der Probe kondensiertes, beziehungsweise in der Probe eingeschlossenes H_2O . Da bei Befüllen der Zelle mit dem D_2O -Puffer jedoch kaum

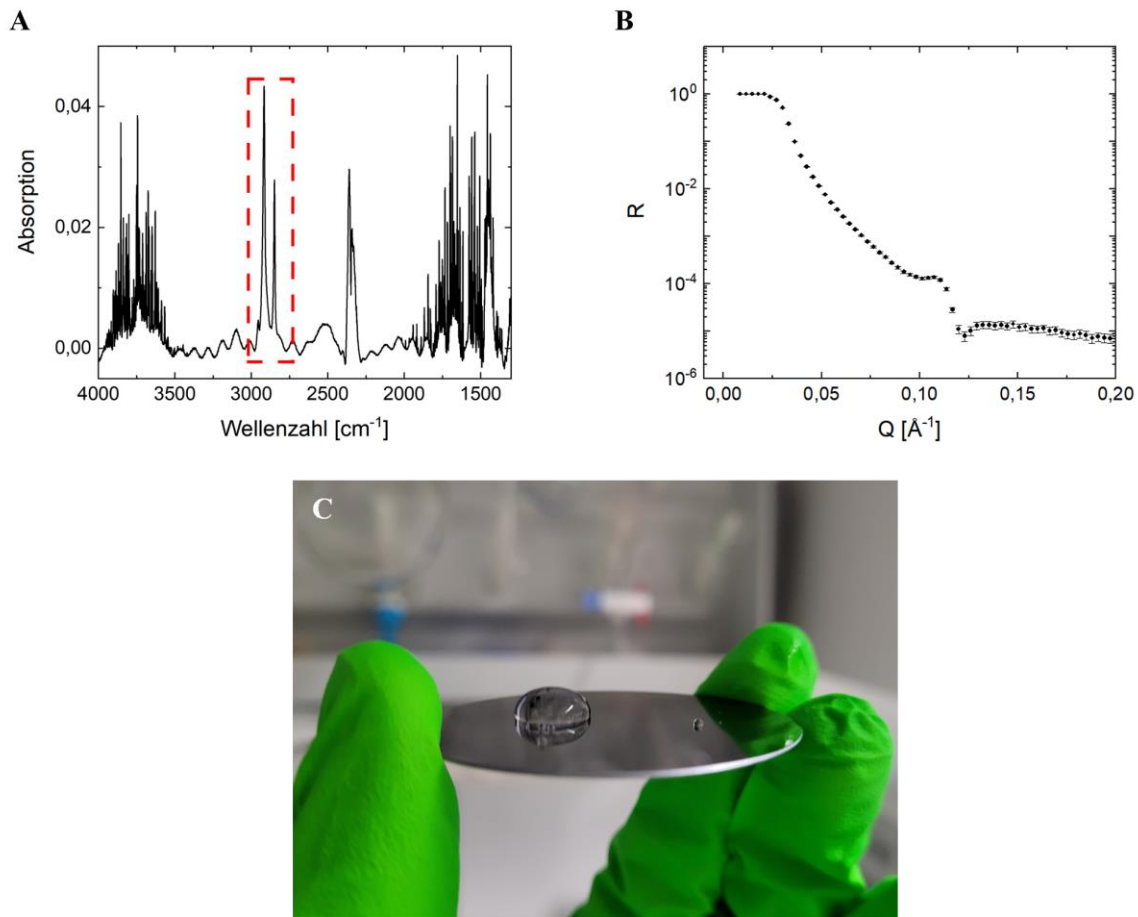


Abbildung 6.7: Beschichtung von Si-Substraten mit Octadecyltrichlorsilan. **A** ATR-FTIR-Spektrum eines ATR-Kristalls nach Beschichtung. Die Octadecyltrichlorsilan-Beschichtung ist anhand der Schwingungsbanden im CH_2 -Bereich zu erkennen. Aufgrund der geringen Dicke der Beschichtung sind auch Etalons, sowie H_2O -Rotationsbanden und CO_2 -Schwingungsbanden deutlich zu erkennen. **B** XRR-Profil einer frisch präparierten Beschichtung zeigt einen Peak bei $Q = 0,109 \text{ \AA}^{-1}$. **C** Bild eines beschichteten Si-Wafers nach Benetzung mit vollentsalztem Wasser. Die Wassertropfen zeigen Kontaktwinkel nahe 90° , was für eine ausgeprägte Hydrophobie der Oberfläche spricht.

6. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit integrelem Gramicidin

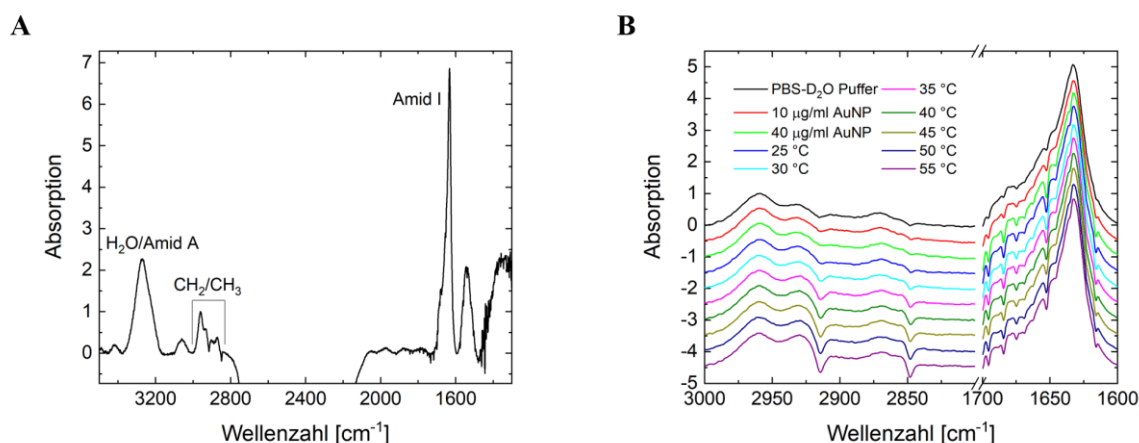


Abbildung 6.8: ATR-FTIR-Spektrum von GramD, adsorbiert auf Beschichtung aus Octadecyltrichlorsilan auf Silizium. **A** Spektrum der Probe in trockenem Zustand mit Bandenzuordnung. **B** Änderung des Spektrums bei Manipulation der Probenumgebung. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurden die einzelnen Spektren versetzt gezeichnet. Die mit der Probe assoziierten Banden zeigten nur vernachlässigbar kleine Änderung bei den untersuchten Messbedingungen.

Änderungen an der Bande beobachtet werden konnten, handelt es sich hier mit hoher Wahrscheinlichkeit tatsächlich um die Amid-A Bande. Aufgrund der verbleibenden Ungewissheit wurde dennoch von einer detaillierten Auswertung dieser Bande abgesehen.

Um den Einfluss von AuNPs auf das adsorbierte GramD zu untersuchen wurde die Probenzelle zunächst mit der beschriebenen PBS-Pufferlösung in D₂O befüllt. Das System wurde 1 h mit einer Persaltik-Pumpe durchspült, um dem System ausreichend Zeit zum Erreichen eines Gleichgewichtszustands zu geben. Das erhaltene IR-Spektrum und die der darauffolgenden Probenbedingungen sind in Abbildung 6.8 B zu sehen. Durch die Befüllung der Probenzelle mit der Pufferlösung kam es zu einem leichten Wachstum der Amid-I und CH₂-Banden, was wahrscheinlich auf die größere Eindringtiefe des evaneszenten Feldes zurückzuführen ist. Durch dessen größere Eindringtiefe in D₂O verglichen mit Luft findet die Absorption durch das Protein in bei einer größeren elektrischen Feldstärke statt. Analog zu Abschnitt 6.1 wurden anschließend 2 nm AuNPs in zwei Konzentrationen hinzugegeben. Dabei wurden keine signifikanten Änderungen in den Spektren beobachtet. Auf die Zugabe weiterer AuNP-Spezies wurde verzichtet, da die Untersuchung mit dynamischer Lichtstreuung zeigte, dass die zuvor verwendeten AuNP-Ansätze zu diesem Zeitpunkt bereits zu stark agglomeriert waren um noch als NPs angesehen zu werden. Stattdessen wurde über den verwendeten Kryostaten die Temperatur der Probe in 5 °C erhöht, um Einflüsse der Temperatur auf das Protein nachzuweisen. Für jede Messung wurde das System 1 h bei der eingestellten Temperatur gehalten, um das Einstellen eines Gleichgewichtszustands zu garantieren. Auch hier konnten bis zu der höchsten einzustellenden Temperatur von 55 °C keine signifikanten Änderungen an den mit der Probe assoziierten Banden beobachtet werden.

In diesem Abschnitt sollte die Interaktion von isoliertem Gramicidin auf einer hydrophoben Oberfläche mit AuNPs nachgewiesen werden. Es wurden hierbei keinerlei Änderungen an den mit ATR-FTIR-Spektroskopie aufgenommenen Spektren beobachtet, was den Schluss zulässt, dass die Interaktion mit den verwendeten AuNPs keinen signifikanten Einfluss auf das adsorbierte Gramicidin hatte. Dies deckt sich mit den in Abschnitt 6.1 detaillierten Untersuchungen an Gramicidin in Lipid-Oligobilagen. Weiter

wurde die Temperaturabhängigkeit der IR-Spektren bis zu einer finalen Temperatur von 55 °C. Auch hier waren keine signifikanten Einflüsse zu erkennen, was auf eine beachtliche Temperaturstabilität der Proteinstruktur hinweist. Zwar konnten somit keine Strukturänderungen von GramD beobachtet werden, die erfolgreiche Präparation der hydrophoben Oberfläche und anschließende Beschichtung des Proteins bietet jedoch eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung isolierter Transmembranproteine. Somit kann in zukünftigen Arbeiten auf Grundlage dieser Methode ein direkter Einfluss gewählter Probebedingungen auf Proteine untersucht werden

7. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit peripherem Zytochrom C

In Kapitel 6 wurde das verwendete Modellsystem von Zellmembranen erstmalig um Membranproteine erweitert. Das dabei verwendete Gramicidin gehört zur Klasse der Transmembranproteine, welche in der Zellmembran integriert sind. Aufgrund dieser Eigenschaft sind sie allgemein hydrophob. Andere Membranproteine sind jedoch aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit nicht in der Membran integriert, sondern befinden sich im Cytoplasma oder an der Außenseite der Zelle. Solche Proteine werden periphere Membranproteine genannt. Auch sie sind essenziell für die Funktionsweise und den Aufbau der Zelle. Die Wechselwirkung peripherer Membranproteine mit der Zellmembran findet über ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Kräfte statt und ist abhängig von Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins, sowie der Art der Membranlipide. Insbesondere die Kopfgruppen der Lipide haben einen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion zwischen Membran und Protein.^[195] In der Literatur finden sich außerdem Hinweise, dass die Präsenz peripherer Membranproteine die Interaktion von Modellmembranen mit NPs begünstigen kann.^[196]

In dem aktuellen Kapitel soll daher das in Kapitel 5 aufgestellte Modellsystem um ein peripheres Membranprotein erweitert werden. Aufgrund seiner guten Verfügbarkeit wurde hierzu CytC ausgewählt, welches in der Natur im Cytoplasma der Mitochondrien vorzufinden ist. Weiter ist das Protein bei allen Säugetieren ähnlich aufgebaut, weshalb es sehr gut als Modell geeignet ist, um zytotoxische Effekte zu evaluieren. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit kann es nicht wie Transmembranproteine bei der Präparation der Lipid-Oligobilagen aus Chloroform mit hinzugegeben werden. Stattdessen wurden proteinfreie Proben präpariert und CytC anschließend der Flüssigphase hinzugegeben, um es in das System einzubringen. Durch die Verwendung von gepufferten Flüssigphasen wird so auch die Ausbildung der natürlichen Proteinfaltung begünstigt. In den nachfolgenden Abschnitten wird die Interaktion von CytC mit unterschiedlichen Lipid-Proben evaluiert.

7.1. DMPC-Bilagen adsorbiertem Zytochrom C

Erste Versuche des Einbringens von CytC fanden an DMPC-Oligobilagen statt. Diese Versuche scheiterten jedoch, da weder mit ATR-FTIR-Spektroskopie noch mit XRR eine Anlagerung des Proteins an die zwitterionischen Lipide beobachtet werden konnte. Eine Beimischung anionischen DMPGs, was die Anlagerung des Proteins durch Coulomb-Anziehung begünstigen sollte, führte wiederum zur Zerstörung der präparierten Oligobilagen bei Kontakt mit der Flüssigphase, weshalb auch mit dieser Art der Proben keine Ergebnisse erzielt werden konnten. Einzig der Einsatz von sehr geringen Anteilen von DMPG und gleichzeitig hohen Anteilen von Chol ermöglichte die Verwendung geladener Oligobilagen. Ein Beispielfperiment an einer solchen Probe ist in Abschnitt 7.2 beschrieben.

Als alternative Präparationsmethode wurde deshalb die Vesikelfusion gewählt. Hierbei handelt es sich um eine einfache Möglichkeit oberflächenadsorbierte Lipid-Bilagen mit hoher Reproduzierbarkeit zu präparieren. Dabei wird eine geeignete Oberfläche einer Lösung von Lipid-Vesikeln ausgesetzt. Die Vesikel adsorbieren an der Oberfläche und können sich dort durch Aufplatzen neu anordnen und so die Oberfläche mit einer Lipid-Bilage bedecken. Oft findet dieser Prozess ohne spezielle äußere Einflüsse

statt, jedoch kann er auch durch experimentelle Bedingungen wie Temperatur oder osmotischen Druck ausgelöst werden.

Die Präparation von Lipid-Vesikeln ist in Abschnitt 3.4.3 beschrieben. Es wurde ein dünner Film der gewünschten Lipid-Zusammensetzung in einem Glasfläschchen durch Eintrocknen einer Lösung in Chloroform präpariert. Dieser wurde anschließend der Pufferlösung ausgesetzt und mit einer Ultraschallsonde behandelt, wodurch die Lipide in die Flüssigphase übergingen und sich aufgrund des hydrophoben Effekts Mizellen und Vesikel ausbildeten. Die Größe und Lamellenzahl der Vesikel ist dabei von vielen Faktoren, wie der Lipidmischung, der Pufferlösung oder der Leistung der Ultraschall-Sonde abhängig, jedoch gut reproduzierbar. Somit konnten neben reinen DMPC-Bilagen auch gemischte Bilagen mit höheren DMPG-Anteilen präpariert werden, als dies mit aus Rotationsbeschichtung hergestellten Oligobilagen möglich ist. Auch eine Beimischung von Chol wurde getestet, jedoch reduzierte das Sterin die Stabilität der Vesikel zu sehr und die Lösung trübte schnell ein, weshalb diese Ansätze nicht zur Präparation von adsorbierten Bilagen verwendet wurde. Als Oberfläche wurden frisch gesäuberte ATR-Kristalle für die Untersuchung der Proben mit ATR-FTIR-Spektroskopie verwendet. Für die Untersuchung mit XRR kamen frisch gesäuberte Si-Wafer zum Einsatz.

Zunächst wurden Untersuchungen an reinen DMPC-Bilagen aus Vesikelfusion durchgeführt. Die Menge des Lipids und das Volumen der Pufferlösung wurden so gewählt, dass die Vesikel-Lösung eine Konzentration von 5 mg/ml aufwies. Bei Zugabe zur Flüssigphase des untersuchten Systems ergab sich eine Konzentration von 0,5 mg/ml. Dabei wurde das System mit einer Peristaltik-Pumpe konstant durchspült, um eine gleichmäßige Verteilung der Vesikel zu erzielen. Dabei wurde das Entstehen von CH_2 -Valenzschwingungsbanden in den IR-Spektren beobachtet, sowie die typischen XRR-Profile oberflächenadsorbierter Bilagen. Die so erhaltenen Daten zeigten erwartungsgemäß bedeutend schwächere Bandenintensitäten, beziehungsweise Kiessig-Oszillationen, als dies aus der Untersuchung von Oligobilagen bekannt war. Jedoch waren die Datensätze aussagekräftig genug, dass etwaige Änderungen durch Zugabe weiterer Komponenten sichtbar sein sollten. Nachdem ein vermeintlicher Gleichgewichtszustand des Systems erreicht war, wurde die Flüssigphase dreimal mit reiner Pufferlösung verdünnt, um lose adsorbierte Vesikel von der Oberfläche zu entfernen. Da die Auswirkungen auf die erhaltenen IR-Spektren und XRR-Profile beim Verdünnen sehr gering ausfielen, konnte das Erreichen des Gleichgewichtszustandes hier nicht überprüft werden. Dies spricht jedoch dafür, dass es die auf die Oberfläche adsorbierten Lipide Bilagen ausgebildet haben, da adsorbierte Vesikel einfacher desorbieren würden.^[197] Stattdessen wurde das System 2 h durchspült, um eine möglichst gleichmäßige Konzentrationsverteilung der Flüssigphase zu gewährleisten. In weiteren Schritten wurden dann weitere Substanzen, wie CytC oder AuNPs zu dieser hinzugegeben und analog zur Präparation der Bilagen wurde durch ausreichende Durchspülung sichergestellt, dass eine gleichmäßige Durchmischung vorlag. Jedoch zeigte weder die Untersuchung mit ATR-FTIR-Spektroskopie noch mit XRR nennenswerte Einflüsse von CytC oder AuNPs auf die Proben. Eine einzelne Probe zeigte zwar einen Einfluss von CytC auf das gemessene XRR-Profil, jedoch konnte aufgrund eines Fehlers beim Speichern der Daten diese Messung nicht verwendet werden. Eine Reproduktion der Messung schlug fehl, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hier um ein anomales Verhalten handelte. Somit ist zu schlussfolgern, dass keine signifikante Adsorption von CytC an den verwendeten zwitterionischen DMPC-Bilagen stattfindet. In den nachfolgenden Abschnitten wird daher die Verwendung geladener Bilagen und modifizierter Oberflächen evaluiert.

7.2. Zytochrom C auf geladenen Lipid-Bilagen

Wie in Abschnitt 7.1 beschrieben, konnte die Adsorption von CytC an zwitterionische DMPC-Bilagen oder -Oligobilagen nicht erfolgreich nachgewiesen werden. Laut Literatur besteht eine erhöhte Affinität des Proteins zu anionischen Lipid-Kopfgruppen,^[195] weshalb für weitere Untersuchungen gemischte Proben aus DMPC und DMPG verwendet wurden. Hierbei erwiesen sich die meisten gemischten Oligobilagen als nicht stabil bei der Benetzung durch Flüssigkeit, was sich durch einen vollständigen Verlust der Bragg-Peaks in XRR-Untersuchungen oder einen fast vollständigen Verlust der CH₂-Valenzschwingungsbanden in ATR-FTIR-Untersuchungen zeigte. Einzig die Verwendung sehr geringer Mengen des anionischen Lipids und gleichzeitige Stabilisierung durch hohe Anteile von Chol führten zu stabilen Proben. Abbildung 7.1 zeigt die IR-Spektren einer solchen Oligo-Bilage unter D₂O-PBS-Pufferlösung und nach Zugabe von 1 mg/ml CytC. Zur Präparation mit Rotationsbeschichtung wurde eine 44,25 µmol/l Lösung des Lipid-Gemischs in Chloroform verwendet. Dies entspricht der Konzentration einer 10 mg/ml Lösung reinen DMPCs. Das Lipid-Gemisch bestand dabei aus 68,6% DMPC, 1,4% DMPG und 30% Chol, was einem Austausch von 2% der zwitterionischen Phospholipide gegen anionische entspricht. Zwar wurden durch diese Mischung Oligobilagen erhalten, welche gegen das Aussetzen der Flüssigphase stabil waren, eine Adsorption von CytC, die sich in einem Entstehen von Amid Banden bemerkbar machen sollte, war jedoch nicht zu erkennen. Ebenso konnte kein Einfluss von AuNPs auf diese Probe nachgewiesen werden (Spektrum aufgrund Identität mit Spektrum vor Zugabe nicht dargestellt). Proben mit hohem Chol-Anteil zeigten auch in vorherigen Untersuchungen weniger Interaktion mit Fremd-Substanzen (siehe Abschnitt 5.4), somit ist das beobachtete Verhalten nicht verwunderlich. Außerdem handelt es sich bei Chol um ein stark hydrophobes Sterin, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass die Verwendung großer Anteile dessen den positiven Effekt, den die Verwendung von DMPG auf die Interaktion mit CytC haben sollte, überwiegt.

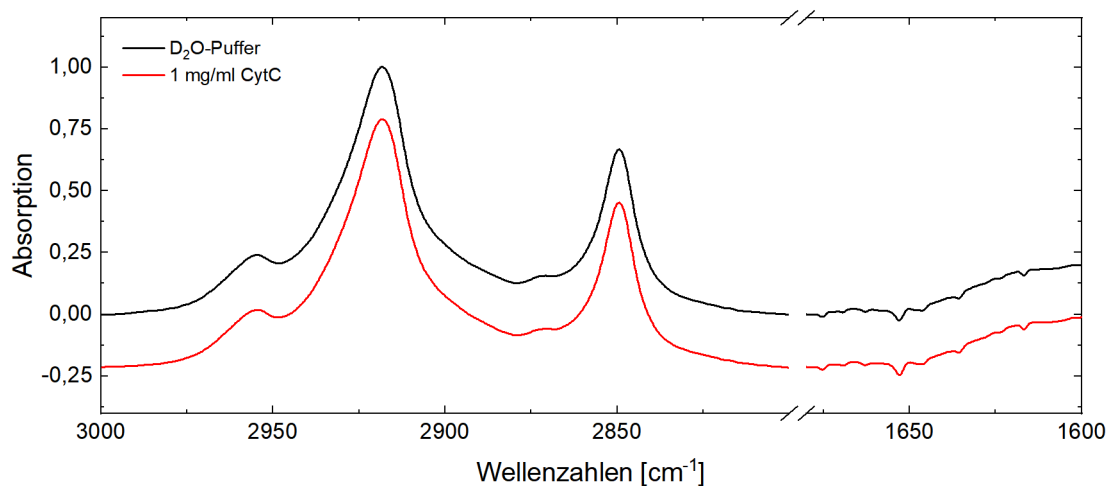


Abbildung 7.1: ATR-FTIR-Spektren einer Probe von 30% Chol, 68,6% DMPC und 1,4% DMPG auf ATR-Kristall, präpariert via Rotationsbeschichtung. Chol stabilisierte die Probe ausreichend, sodass die Lipid-Oligobilagen beim Befüllen der Flüssigkeitszelle mit PBS-Pufferlösung in D₂O erhalten blieb. Trotz Präsenz des negativ geladenen Lipids konnte keine Anlagerung von CytC beobachtet werden.

7. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit peripherem Zytochrom C

Stattdessen wurden geladene Lipid-Bilagen wie in Abschnitt 7.1 beschrieben mit Vesikelfusion präpariert, da dies einen größeren DMPG-Anteil ermöglichen sollte. Eine Untersuchung mit XRR war dabei erfolglos, da die erhaltenen Profile keine Änderung durch die Zugabe der Vesikel zur Flüssigphase zeigten. Dahingegen konnte mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie die Adsorption der Vesikel an die Si-Oberfläche und eine anschließende Anlagerung von CytC eindeutig nachgewiesen werden. Die erhaltenen IR-Spektren sind in Abbildung 7.2 zu sehen. Zur Messung des Hintergrundspektrums wurde der frisch gereinigte ATR-Kristall unter der verwendeten Pufferlösung gemessen. Die Zugabe von 0,5 mg/ml Vesikeln mit einem DMPG-Anteil von 30% zur Flüssigphase zeigte das Entstehen von CH_2 - und Carbonyl-Valenzschwingungsbanden an den bekannten Positionen (siehe Abbildung 7.2 A). Analog zu vorherigen Untersuchungen wurde auch hier das Spektrum einer Basislinienkorrektur

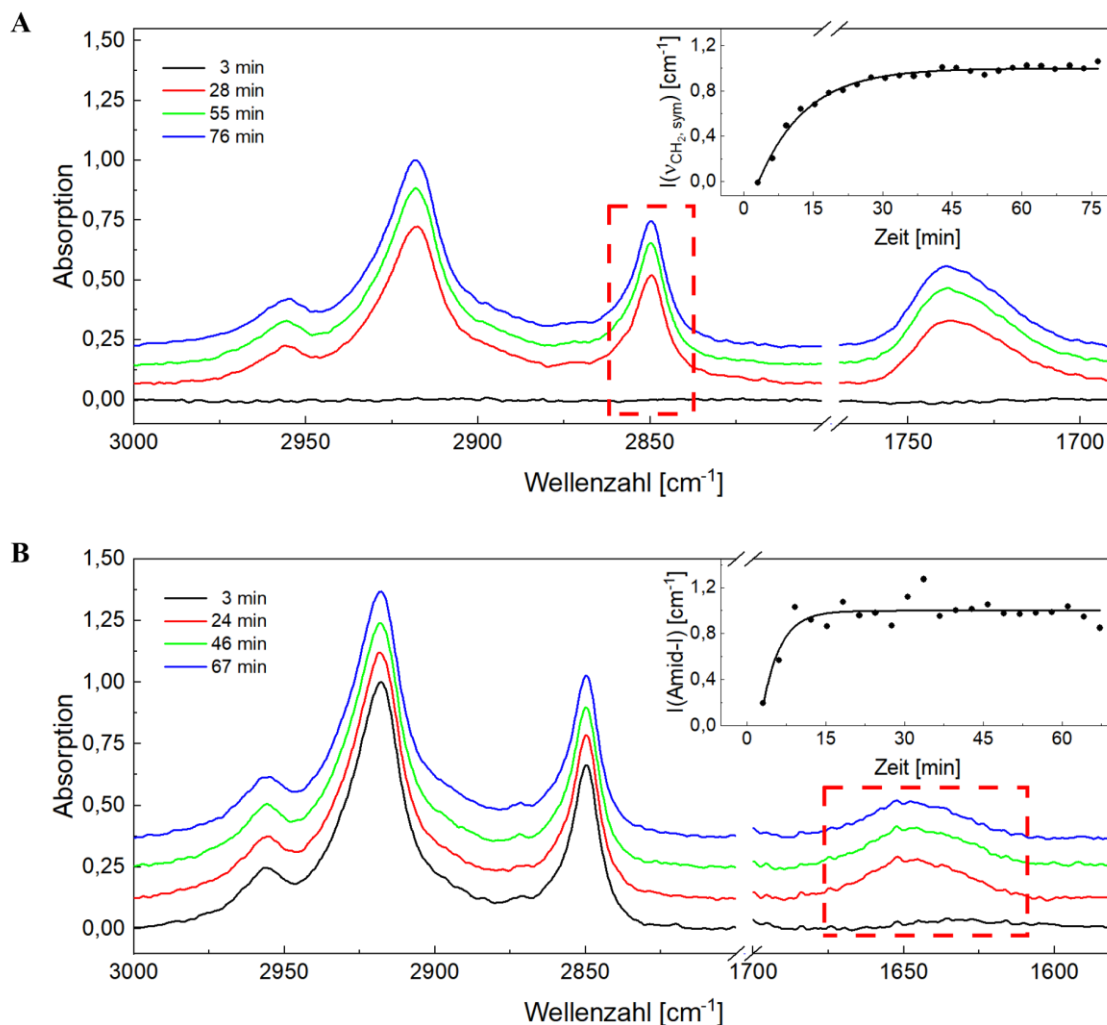


Abbildung 7.2: Adsorption von Lipid-Vesikeln aus 70% DMPC und 30% DMPG auf Silizium-Oberflächen und anschließende Adsorption von CytC, untersucht mit ATR-FTIR-Spektroskopie. **A** Entwicklung der typischen CH_2 - und Carbonyl-Schwingungsbanden von Lipiden nach Zugabe der Vesikel zu der mit dem Kristall in Kontakt stehenden Flüssigphase. Der Einzug zeigt die zeitliche Entwicklung der Intensität der markierten symmetrischen CH_2 -Streckschwingungsbande. **B** Nach Zugabe von CytC wurde das Entstehen von Amid-Banden beobachtet. Der Einzug zeigt die zeitliche Entwicklung der markierten Amid-I-Bande.

Tabelle 7.1: Erhaltene Parameter nach Anpassung der in Abbildung 7.2 dargestellten Absorptionsbanden mit einer Funktion des exponentiellen Abfalls.

Messung	$k [h^{-1}]$	$y_{\infty} [cm^{-1}]$	R^2
Vesikelfusion	$5,87 \pm 0,31$	$0,169 \pm 0,002$	0,99
CytC-Adsorption	$17,7 \pm 4,9$	$0,138 \pm 0,003$	0,76

unterzogen und anschließend die Absorptionsbanden mit Lorentz-Funktionen angepasst. Im Einzug von Abbildung 7.2 A ist der zeitliche Verlauf der Intensität der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingungsbande zu sehen. Die Messpunkte wurden analog zu Gleichung (6.3) mit der Funktion exponentiellen Abfalls angepasst, wobei jedoch ein negativer Wert für A_1 verwendet wurde. Die erhaltenen Anpassungsparameter sind in Tabelle 7.1 zu sehen. Ähnlich wie in Abschnitt 6.1.2 wurde auch hier evaluiert, zu welchem Zeitpunkt die Bandenintensität weniger als 1% von y_{∞} abweicht, was als Erreichen eines Gleichgewichtszustandes angesehen werden kann. Dieser Wert wurde nach 50 min erreicht, deutlich vor Beenden der Messserie. Die im Einzug von Abbildung 7.2 A eingetragenen Messpunkte wurden gegen y_{∞} normiert, womit die eingetragenen Werte als anteiliges Erreichen des Grenzwertes verstanden werden können.

Die Flüssigphase wurde anschließend zweimal mit reiner Pufferlösung verdünnt, wobei jeweils die Hälfte der Flüssigkeit ausgetauscht wurde. Um eine gleichmäßige Verteilung der Vesikel im System zu erhalten, wurde dieses dabei jeweils 30 min durchspült. Die finale Vesikel-Konzentration lag somit bei 0,125 mg/ml. Es wurde keine signifikante Änderung der mit den Lipiden assoziierten Absorptionsbanden beobachtet, was darauf schließen lässt, dass diese nicht mehr als lose Vesikel, sondern als feste Bilage auf der Oberfläche adsorbiert waren. Anschließend wurde der Flüssigphase 1 mg/ml CytC hinzugefügt. Die beobachteten Änderungen der IR-Spektren sind in Abbildung 7.2 B zu sehen. Das Entstehen einer Amid-I Bande bei $\tilde{\nu} \approx 1650 \text{ cm}^{-1}$ war deutlich zu erkennen. Die Bandenintensität lag dabei zum Ende der Messserie bei etwa 76% der Intensität der symmetrischen CH_2 -Valenzschwingungsbande. Dieser Wert war etwas kleiner als der der entsprechenden Bande der in Abschnitt 6.1.1 beschriebenen Probe aus DMPC-Oligobilagen mit einem Gramicidin-Anteil von 10%, die in etwa dieselbe Intensität wie die entsprechende symmetrische CH_2 -Valenzschwingungsbande aufwies. Gleichzeitig war die durch CytC verursachte Amid-I Bande jedoch auch bedeutend breiter, wahrscheinlich aufgrund der Komplexität des Proteins verglichen mit Gramicidin. Der Anlagerungsprozess lief bedeutend schneller ab als der der Vesikelfusion; ein Gleichgewichtszustand war bereits nach 18 min erreicht. Der Verlauf der Amid-I-Bandenintensität ist im Einzug von Abbildung 7.2 B aufgetragen. Analog zu Abbildung 7.2 A wurden auch hier die einzelnen Messwerte nach der Anpassung nach Gleichung (6.3) auf y_{∞} normiert. Es ist unwahrscheinlich, dass zum Zeitpunkt des vermeintlichen Gleichgewichtszustands das Protein durch das Durchspülen mit der Peristaltik-Pumpe bereits gleichmäßig in der Flüssigphase verteilt war. Dies kann in Hinblick auf die in der Literatur beschriebene höherer Affinität des Proteins zur Adsorption an anionische Bilagen^[198] so verstanden werden, dass die Proteine sehr schnell an die Oberfläche adsorbieren, jedoch aufgrund ihrer Größe wenige Adsorptionsplätze verfügbar sind. Somit wird ein Gleichgewichtszustand sehr schnell ausgebildet. Die Anpassung des Verlaufs der Bandenintensität zeigt die etwa dreifache Geschwindigkeitskonstante k verglichen mit der Vesikelfusion. Aufgrund der geringeren Zahl an

7. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit peripherem Zytochrom C

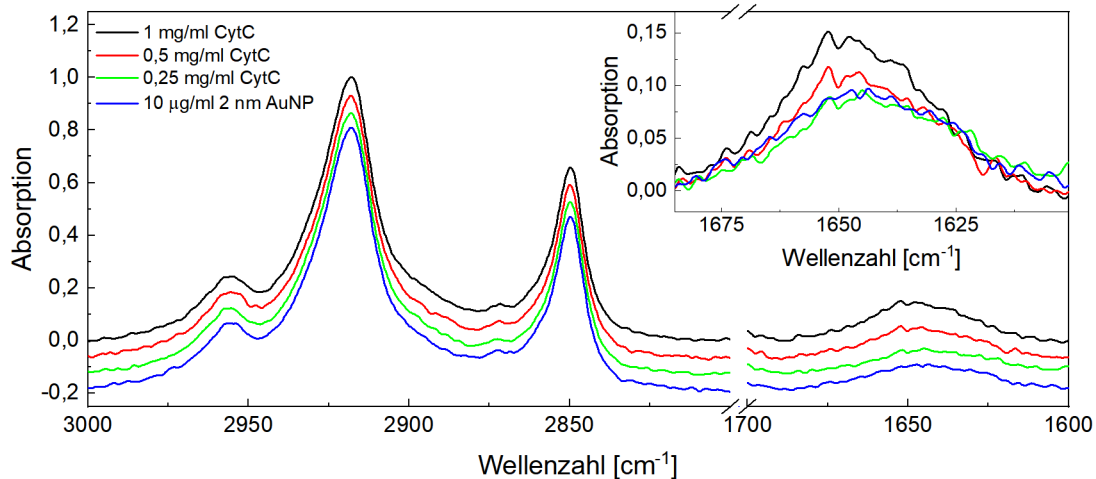


Abbildung 7.3: Auswirkungen der Zugabe und anschließender Verdünnung von CytC auf ATR-FTIR-Spektren von durch Vesikelfusion präparierten Lipid-Bilagen aus 70% DMPC und 30% DMPG. Die Reduktion der Proteinkonzentration auf ein Viertel des ursprünglichen Wertes resultierte in einer Abnahme der Intensität der Amid-I-Bande um 27%, was für eine teilweise irreversible Bindung des Proteins an die Oberfläche der adsorbierten Lipid-Schicht spricht. Der Einzug zeigt die Detailansicht der Amid-I-Bande. Eine anschließende Zugabe von AuNP hatte keinen sichtbaren Effekt auf das gemessene Spektrum.

Messpunkten vor Erreichen des Gleichgewichts und der schwachen Bande wurde jedoch auch eine bedeutend schlechtere Anpassungsgüte R^2 erhalten.

Die Flüssigphase wurde anschließend erneut zweifach verdünnt, bis zu einer finalen Konzentration von CytC von 0,25 mg/ml. Wie in Abbildung 7.3 zu sehen ist, nahm damit die Intensität der Amid-I Bande um etwa 27% ab, was darauf schließen lässt, dass die Bindung der Proteine an die Lipide teilweise reversibel stattfindet. Eine anschließende Zugabe von 10 µg/ml 2 nm AuNPs hatte jedoch keinen sichtbaren Effekt auf das Spektrum.

Die in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnisse belegen die Möglichkeit, CytC auf anionischen Lipid-Bilagen zu untersuchen. Das Protein adsorbiert schnell auf den präparierten Proben, solange ein ausreichend großer Anteil an geladenen Lipiden vorliegt. Diese Adsorption findet zum Teil irreversibel statt, was die Möglichkeit eröffnet die Flüssigkeitsphase ausreichend zu verdünnen, um Effekte der adsorbierten und freien Proteine zu trennen. Die Präparation der Lipid-Bilagen aus Vesikelfusion bietet dabei die Möglichkeit, höhere DMPG-Anteile zu verwenden, als dies mit Rotationsbeschichtung möglich ist. Allerdings können somit nur einzelne Bilagen auf der Oberfläche abgeschieden werden, was die Intensität von NR- und XRR-Profilen deutlich begrenzt. Für die Untersuchung peripherer Membranproteine scheint dies dennoch das Mittel der Wahl zu sein. Die so adsorbierten Proteine zeigten keine Interaktion mit den verwendeten AuNPs. Es ist jedoch denkbar, dass aufgrund der schwachen Amid-I Bande eventuell aufgetretene kleinere Effekte nicht detektiert werden konnten. Somit wäre es sinnvoll, diese Untersuchungen durch komplementäre Messtechniken zu erweitern, was jedoch für die vorliegende Arbeit nicht mehr möglich war. Auch könnte der DMPG-Anteil für zukünftige Untersuchungen noch weiter erhöht werden. Es ist denkbar, dass somit mehr CytC auf den Bilagen

adsorbieren kann, was zu einer stärkeren Bandenintensität führen und somit die möglichen Effekte durch NPs besser zeigen würde. Auch könnte die Verwendung anderer NP-Spezies von Interesse sein.

7.3. Zytochrom C auf hydrophoben Oberflächen

Analog zu den in Abschnitt 6.2 präsentierten Ergebnissen wurde versucht, CytC auf einer modifizierten Si-Oberfläche abzuschneiden. Die Präparation der mit einer Octadecylsilan-Beschichtung versehenen Substrate ist in den Abschnitten 3.4.5 und 6.2 beschrieben. Während für die Untersuchung mit XRR frisch modifizierte Si-Wafer verwendet wurden, wurden für ATR-FTIR-Spektroskopie die modifizierten ATR-Kristalle verwendet, welche zuvor für die Untersuchung von Gramicidin auf hydrophoben Oberflächen präpariert wurden. Diese wurden mit Chloroform und Ethanol gereinigt. Durch Benetzung mit vollentsalztem Wasser, analog zu Abbildung 6.7 C, wurde sichergestellt, dass die Beschichtung dabei intakt blieb und die Oberfläche ihre hydrophoben Eigenschaften nicht verlor. Die Substrate wurden zunächst gegen PBS-Pufferlösungen von H_2O (XRR) beziehungsweise D_2O (ATR-FTIR) vermessen, anschließend wurde der Flüssigphase 1 mg/ml CytC hinzugefügt. Die XRR-Profile zeigten dabei keine Änderung verglichen mit dem in Abbildung 6.7 B dargestellten Profil. Dahingegen konnte mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie die Ausbildung einer schwachen Absorptionsbande im Bereich der Amid-I Banden erkannt werden. Diese ist in Abbildung 7.4 zu sehen. CH_2 -Valenzschwingungsbanden waren dabei nicht zu erkennen, es ist jedoch anzunehmen, dass diese Bande für dieses Protein schwächer ist als die Amid-I Bande und somit nicht gegen das Rauschen zu erkennen ist. Durch die Verdünnung der CytC Konzentration auf 0,25 mg/ml sank die Intensität der Amid-I Bande um etwa 64%, was auf eine reversible Bindung des Proteins an die modifizierte Oberfläche schließen lässt. Gleichzeitig wurden Oszillationen im Bereich der CH_2 -Valenzschwingungsbanden beobachtet. Aufgrund ihrer Form sind diese aber wahrscheinlich nicht auf das Protein zurückzuführen. Ebenso ist es unwahrscheinlich, dass es durch die Verdünnung der Flüssigphase zu Etalons kommt. Eine

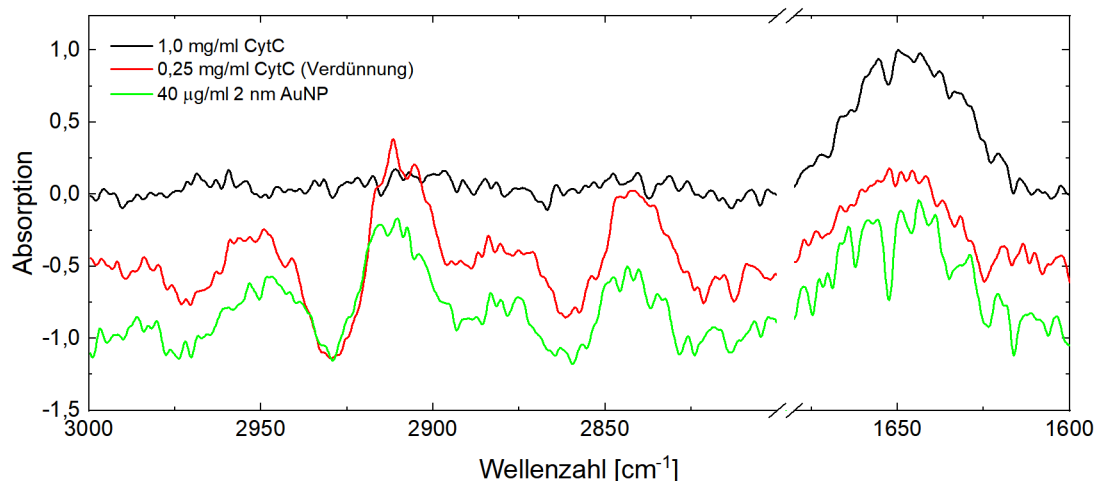


Abbildung 7.4: ATR-FTIR-Spektren von CytC auf einem ATR-Kristall mit Octadecylsilan-Beschichtung. Nach Zugabe des Proteins entstand ein Peak im Bereich der Amid-I-Banden, der nach anschließender Verdünnung abnahm. Gleichzeitig entstanden Oszillationen im Bereich der CH_2 -Banden. Eine Zugabe von AuNPs hatte keinen nennenswerten Einfluss auf das IR-Spektrum.

7. Untersuchungen an Lipid-Bilagen mit peripherem Zytochrom C

Ursache für die beobachteten Signale kann somit nicht genannt werden. Die anschließende Zugabe der in Abschnitt 6.1.2 spezifizierten 2 nm AuNP zeigte erneut keinen Einfluss auf die erhaltenen IR-Spektren.

Im aktuellen Abschnitt wurde die Möglichkeit demonstriert, CytC auf einer hydrophoben Oberfläche abzuscheiden. Trotz der Hydrophilie des Proteins wurde mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie dessen Adsorption an die Oberfläche durch das Auftreten einer Amid-I Bande nachgewiesen. In vorherigen Untersuchungen an nativen Si-Oberflächen war ein solches Verhalten nicht zu beobachten. Die Adsorption erwies sich als größtenteils reversibel und für strukturaufgelöste Verfahren wie XRR oder NR zu schwach. Dennoch demonstrieren die Ergebnisse das Potential der modifizierten Oberfläche, hydratisierte periphere Membranproteine isoliert zu untersuchen.

8. Untersuchung des enzymatischen Abbaus von Proteinen durch Chymotrypsin

In den bisherigen Kapiteln der vorliegenden Arbeit wurden Modellsysteme von Zellmembranen unterschiedlicher Komplexität auf ihre Interaktion mit AuNPs untersucht. Die zentrale Fragestellung war hier, ob die Partikel die Struktur der Membran selbst oder von Membranproteinen stören würden, und ob es zu einer Ein- oder Anlagerung der Partikel kommt. Beides hätte sowohl Implikationen für die Zytotoxizität als auch für potenzielle medizinische Anwendung. Zwar konnten in Kapitel 5 Interaktionen der Partikel mit Membranlipiden nachgewiesen werden, die Untersuchung der Interaktion mit Membranproteinen in Kapiteln 6 und 7 zeigten jedoch keine Einflüsse auf die Proteinstrukturen. Eine natürlich vorkommende Interaktion von Membranproteinen mit Fremdsubstanzen ist der Abbau der Proteine durch Enzyme. Hierbei handelt es sich ebenso um Proteine, welche in biologischen Systemen unterschiedliche Funktionen, wie den Ab- oder Aufbau verschiedener Substanzen, ausüben. Enzyme werden häufig nach ihren Zielmolekülen klassifiziert. So haben beispielsweise Lipasen die Aufgabe, Lipide zu spalten, was sie essenziell für die Verdauung von Membranproteinen macht, während Peptidasen Peptidbindungen in Proteinen spalten. Die Funktion des Enzyms sowie dessen Zielsubstanz wird dabei durch die Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur bestimmt.

Für die vorliegende Arbeit wurde das Enzym Chymotrypsin verwendet, um den enzymatischen Abbau der in Kapiteln 6 und 7 behandelten Membranproteine sowie reeller Zellmembranen zu untersuchen. Es handelt sich hierbei um eine Serinprotease, welche in der Bauchspeicheldrüse von Säugetieren gebildet wird. Sie spaltet bevorzugt Peptidbindungen, deren Carbonylgruppe von aromatischen Aminosäuren stammt. Somit ist die eine der wenigen Proteasen, die dazu geeignet sind Gramicidin zu spalten.^[96, 101]

8.1. Enzymatischer Abbau von Membranproteinen

In Kapiteln 6 und 7 wurde die Präparation von Lipid-Systemen mit integralen und peripheren Proteinen demonstriert sowie deren Interaktion mit AuNPs und Magnesiumchlorid untersucht. Hierbei handelt es sich um Modellsysteme reeller biologischer Zellmembranen, die aufgrund ihrer geringeren Komplexität einfacher zu verstehen sind. Da in biologischen Zellmembranen eine Vielzahl von Membranproteinen vorliegt, sind die Interaktionen dieser mit Fremdsubstanzen oft nicht voneinander zu unterscheiden. Somit sollte auch der enzymatische Abbau durch Chymotrypsin zunächst anhand der etablierten Modellsysteme untersucht werden.

8.1.1. Enzymatischer Abbau von Gramicidin

Mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie sollte zunächst der Abbau von Gramicidin durch Chymotrypsin untersucht werden. Hierzu wurde GramD analog zu Abschnitt 6.2 auf einen mit einer Octadecylsilan-Beschichtung modifizierten ATR-Kristall durch Rotationsbeschichtung aufgebracht und dem Enzym in PBS-D₂O-Pufferlösung ausgesetzt. Der zuvor bereits verwendete Kristall wurde zunächst wie in Abschnitt 7.3 beschrieben mit Chloroform und Ethanol gespült und anschließend die Intaktheit der Beschichtung durch Benetzung mit vollentsalztem Wasser kontrolliert.

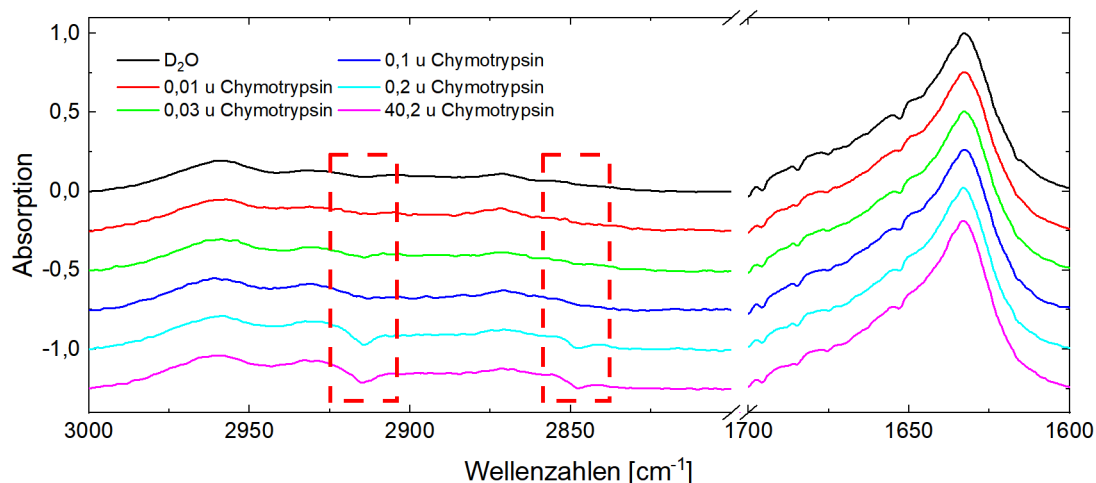


Abbildung 8.1: Interaktion von Chymotrypsin mit GramD auf einem mit einer Octadecylsilan-Beschichtung versehenem ATR-Kristall unter D_2O , untersucht mit ATR-FTIR-Spektroskopie. Die dargestellten Spektren wurden über eine Spline-Anpassung basislinienkorrigiert. Erste negative Absorptionsbanden im Bereich der CH_2 -Streckenschwingungsbanden waren nach Zugabe von insgesamt 0,2 u Chymotrypsin zu erkennen, jedoch blieb die Amid-I-Bande unbeeinflusst. Eine weitere Zugabe des Enzyms hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die erhaltenen IR-Spektren.

Es wurde zunächst das IR-Spektrum des Silan-beschichteten ATR-Kristalls gegen die verwendete Pufferlösung aufgenommen. Das erhaltene Einkanalspektrum konnte so als Hintergrundspektrum für die nachfolgenden Messungen verwendet werden. Nach Rotationsbeschichtung mit Gramicidin wurde der Kristall in die Flüssigkeitszelle eingebaut, welche über ein Peristaltik-System mit der Pufferlösung befüllt wurde. Das System wurde über Nacht ruhen gelassen, um einen Gleichgewichtszustand zu garantieren, wobei mithilfe der Peristaltik-Pumpe ein konstanter Flüssigkeitskreislauf gewährleistet wurde. Abbildung 8.1 zeigt das am nächsten Tag gemessene Spektrum (schwarze Linie). Eine ausgeprägte Amid-I Bande ist zu erkennen, jedoch im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus Abschnitt 6.2 keine signifikanten Absorptionsbanden im Bereich der CH_2 -Valenzschwingungsbanden. Es ist denkbar, dass aufgrund des bereits mehrfach verwendeten ATR-Kristalls Rückstände vorheriger Untersuchungen vorhanden waren und so die schwachen CH_2 -Absorptionsbanden des Proteins durch die Referenzierung auf das Hintergrundspektrum nicht zu erkennen waren. Chymotrypsin wurde anschließend zunächst in kleinen, später in größeren Mengen zugegeben und die spektralen Änderungen über mindestens 45 min beobachtet oder bis keine Änderungen mehr zu erkennen waren. Die in Abbildung 8.1 angegebenen Größen werden Enzymeinheit genannt. Bei Verwendung von Enzymen wird diese meist anstelle der herkömmlichen Konzentrationen verwendet. Sie ist ein Maß für die umgesetzten Substrate pro Minute. Dabei gilt $1\text{ u} = 1\text{ }\mu\text{mol/min}$ Umsatz. Wie anhand der Spektren zu sehen ist, wurden durch Zugabe kleiner Mengen des Enzyms keine nennenswerten Änderungen an den IR-Spektren verursacht. Erst bei einer Erhöhung der Enzymeinheit auf 0,2 u wurden eindeutige Änderungen sichtbar. Entgegen den Erwartungen waren diese jedoch auf die CH_2 -Valenzschwingungsbanden beschränkt, welche negative Bandenintensitäten zeigten. Die Amid-I Bande zeigte dahingegen keine Veränderungen. Da als Einkanalspektrum der ATR-Kristall ohne adsorbiertes Gramicidin verwendet wurde, weisen negative CH_2 -Valenzschwingungsbanden auf ein Abtragen der Silan-Beschichtung oder Probenreste vergangener Messungen hin. Bei Zugabe großer Mengen des

Enzyms waren kaum weitere Änderungen in diesem Bereich zu erkennen, jedoch konnte ein schwacher Anstieg der Amid-I Bandenintensität beobachtet werden, was auf eine Anlagerung des Enzyms an die Oberfläche hinweist.

Es waren insgesamt wenig Einflüsse des verwendeten Enzyms auf das adsorbierte GramD zu erkennen. Es wäre denkbar, dass die Verwendung eines frisch mit einer Octadecylsilan-Beschichtung versehenen ATR-Kristalls aussagekräftigere Ergebnisse geliefert hätte, insbesondere hinsichtlich der zunächst nicht sichtbaren CH₂-Valenzschwingungsbanden. Dies konnte jedoch aus zeitlichen Gründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geprüft werden. Auch wäre für weiterführende Arbeiten die Untersuchung von in Lipid-Oligobilagen mit integriertem Gramicidin von Interesse.

8.1.2. Enzymatischer Abbau von Zytochrom C

Nachdem in Abschnitt 8.1.1 der Abbau von Gramicidin durch Chymotrypsin untersucht wurde, sollte in weiteren Experimenten der Abbau des peripheren Membranproteins CytC mit ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht werden. Hierfür wurde CytC auf einer Lipid-Bilage, welche mit Vesikeln aus 70% DMPC und 30% DMPG präpariert wurde, abgeschieden. Das genaue Vorgehen fand wie in Abschnitt 7.2 beschrieben statt. Die Flüssigphase wurde nach Anlagerung des Proteins zweifach verdünnt, sodass freies CytC die erhaltenen Ergebnisse möglich wenig verfälschen sollte. Die erhaltenen IR-Absorptionsbanden durch Interaktion der Probe mit Chymotrypsin sind in Abbildung 8.2 zu sehen. Als Hintergrundspektrum wurde vor Beginn der Untersuchungen das Einkanal-Spektrum des frisch gereinigten und nicht beschichteten ATR-Kristalls aufgenommen.

Vor Zugabe des Chymotrypsins war eine schwache Amid-I Bande durch CytC zu erkennen. In einem ersten Schritt wurden 0,05 u Chymotrypsin hinzugegeben. Hierbei zeigte sich nach etwa 6 min eine sprunghafte Abnahme der Amid-I Bandenintensität um etwa 38%. Eine gleichzeitige Änderung der CH₂-Valenzschwingungsbande blieb dabei aus. Somit kann die beobachtete Änderung der Verdauung des Membranproteins durch Chymotrypsin zugeordnet werden. Aufgrund der zeitlichen Auflösung von etwa 3 min war eine kinetische Auswertung der Messserie jedoch nicht möglich. Im nächsten Schritt wurde der Flüssigphase eine große Menge des Enzyms hinzugegeben, sodass eine Enzymzahl von 8,2 u erreicht wurde. Hierbei wurde erneut eine sprunghafte Änderung der Amid-I Bande beobachtet, jedoch wuchs die Bandenintensität nach 3 min auf etwa den doppelten Wert an, wobei auch das Bandenzentrum um etwa 3 cm⁻¹ zu niedrigen Wellenzahlen verschoben wurde. Hierbei wurde wahrscheinlich die Verdauung des Membranproteins von einer Anlagerung des Enzyms an die Oberfläche überdeckt. Beide Prozesse wurden etwa 30 min beobachtet, aufgrund der sprunghaften Änderungen ist jedoch davon auszugehen, dass sich das System hier bereits in einem Gleichgewichtszustand befand.

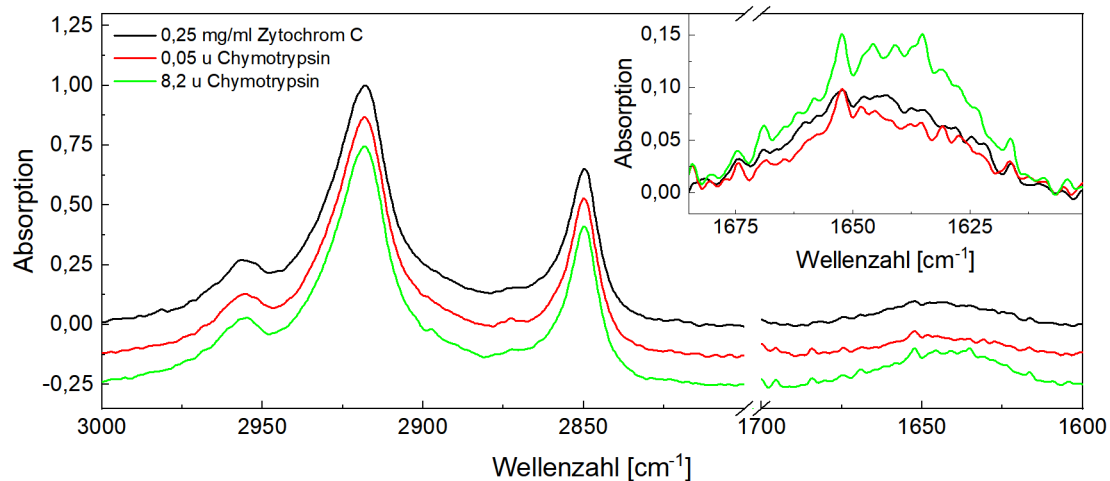


Abbildung 8.2: Interaktion von Chymotrypsin mit CytC auf Lipid-Bilagen, hergestellt durch Fusion von Lipid-Vesikeln aus 70% DMPC und 30% DMPG, untersucht mit ATR-FTIR-Spektroskopie. Alle Messungen fanden unter PBS-Puffer in D_2O statt. Die dargestellten Spektren wurden über eine Spline-Anpassung basislinienkorrigiert. Die Zugabe von Chymotrypsin zur Flüssigphase führte zu einer Abnahme der mit dem adsorbierten Membranprotein assoziierten Amid-I-Bande. Eine weitere Zugabe von Chymotrypsin führte zur deutlichen Zunahme der Bandenintensität, was auf eine Anlagerung des Enzyms an die Lipid-Bilage hinweist. Der Einzug zeigt die Detailansicht der Amid-I-Bande ohne Versatz der drei dargestellten Spektren.

Aufgrund der schwachen Bandenintensitäten ist eine belastbare Interpretation der beobachteten Effekte schwierig. Ähnlich wie in Abschnitt 7.2 ist es naheliegend, dass ein höherer DMPG-Anteil in den zur Vesikelfusion verwendeten Vesikeln eine Anlagerung größerer Mengen des CytC und somit stärkere Amid-I Banden zur Folge hätte, die belastbarere Ergebnisse zuließen. Für weiterführende Untersuchungen sollte darüber hinaus mit einer kleineren Enzymkonzentration gearbeitet werden, um eine kinetische Betrachtung der Bandenänderungen zu ermöglichen. Eine bessere zeitliche Auflösung würde mit einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis einhergehen, was bei den in den hier diskutierten Ergebnissen aufgrund der schwachen Bandenintensitäten nicht sinnvoll gewesen wäre. Sollte die Verwendung größerer DMPG-Anteile jedoch zu einer erheblichen Verbesserung der Bandenintensität führen, wäre dies ein weiterer Ansatzpunkt, um kinetische Untersuchungen des Verdauungsprozesses durchzuführen.

8.2. Enzymatischer Abbau biologischer Zellenmembranen

In den vorigen Kapiteln wurden Modellsysteme unterschiedlicher Komplexität unter anderem auf ihre Interaktion mit AuNPs untersucht. Nun sollen auch Untersuchungen mit ATR-FTIR-Spektroskopie an biologischen Zellmembranen stattfinden. Hierbei handelt es sich um komplexe Systeme aus Membranlipiden und -proteinen sowohl integraler als auch peripherer Natur. Um anhand der Messergebnisse die Auswirkungen der verwendeten Substanzen auf reelle biologische Systeme einschätzen zu können, müssen Untersuchungen unter Bedingungen stattfinden, welche die Begebenheiten in diesen möglichst gut reproduzieren. So sollten Pufferlösungen gewählt werden, welche eine native Proteinfaltung erlauben. Auch kann es nützlich sein, höhere Temperaturen in der

Probenzelle einzustellen, dies birgt jedoch auch die Gefahr von Störungen durch Ausgasen der verwendeten Pufferlösung.

Für die vorliegende Arbeit wurden Zellmembranen verwendet, welche aus dem sarkoplasmatischen Retikulum des Muskelgewebes von Hasen extrahiert wurden. Diese Membranen werden forthin als SR-Membranen bezeichnet. Die Präparation dieser wurde von Dr. Stefan Kaufmann aus der Arbeitsgruppe Tanaka der Universität Heidelberg durchgeführt und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Bis zur Verwendung wurden die SR-Membranen in einer Pufferlösung aus 1 mM Triethanolamin und 100 mM KCl bei pH = 7,4 und einer Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Konzentration der verwendeten Stammlösung wurde in der Arbeitsgruppe Tanaka bestimmt und mit einer Lipidkonzentration von $c_{\text{Lipide}} = 11,8\text{ mg/ml}$ und einer Proteinkonzentration von $c_{\text{Proteine}} = 14,0\text{ mg/ml}$ angegeben. Für die vorliegende Arbeit wurde als Konzentrationsangabe die Gesamtkonzentration der SR-Membranen aus der Summe der Werte verwendet: $c_{\text{SR}} = c_{\text{Lipide}} + c_{\text{Proteine}} = 25,8\text{ mg/ml}$. Die Probenpräparation erfolgte analog zur in Abschnitt 7.2 beschriebenen Vesikelfusion. Hierbei wurde jedoch kein PBS verwendet, sondern der Triethanolamin-Puffer der SR-Membranen-Stammlösung in D_2O reproduziert. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden dabei stark verdünnte Lösungen von KOH und HCl in D_2O verwendet, was jedoch eine Kontamination der Pufferlösung mit H_2O verursacht. Da jedoch auch die Stammlösung in einer H_2O -basierten Pufferlösung vorlag, ist eine Präsenz von H_2O in den Proben ohnehin nicht zu vermeiden, weshalb diese zusätzliche Kontamination vertretbar ist. Als Substrat wurde ein frisch gereinigter ATR-Kristall

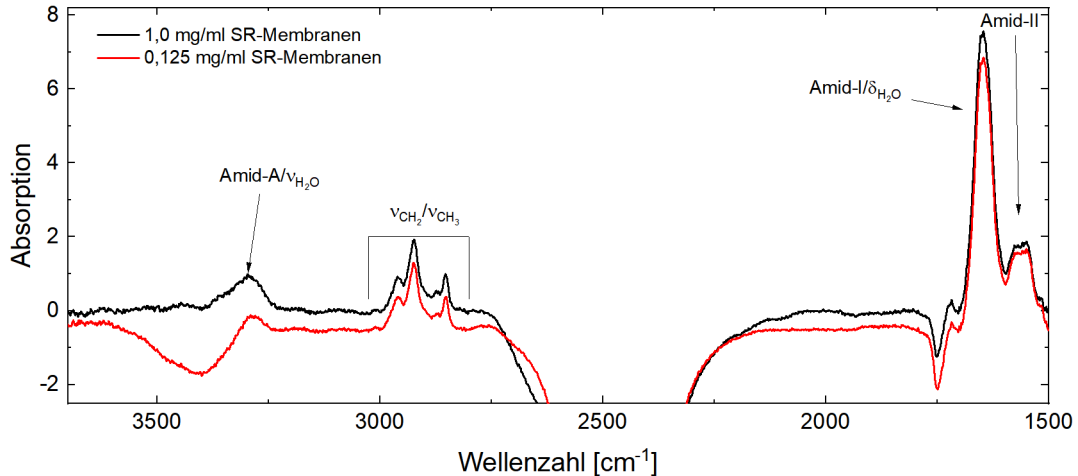


Abbildung 8.3: Spektrum von 1,0 mg/ml SR-Membranen in 1 mM Triethanolamin in D_2O (pH = 7,4) nach Adsorption auf ATR-Kristall. Es sind Schwingungsbanden in den typischen Regionen der CH_2 -Valenzschwingung, sowie der Amid-I-, Amid-II- und Amid-A-Banden zu erkennen. Amid-A- und Amid-I-Banden überlagern dabei mit der Valenz-, respektive Deformationsschwingung von H_2O , welches durch die Stammlösung der Membranen dem System zugeführt wurde. Eine Verdünnung der Flüssigphase auf 0,125 mg/ml SR-Membranen zeigte keine nennenswerten Änderungen im Bereich der Amid-I-Bande, jedoch negative Banden im $\nu_{\text{H}_2\text{O}}$ -Bereich und eine Zunahme der Amid-II-Bande. Die Spektren wurden zur besseren Sichtbarkeit der Banden versetzt eingezeichnet.

8. Untersuchung des enzymatischen Abbaus von Proteinen durch Chymotrypsin

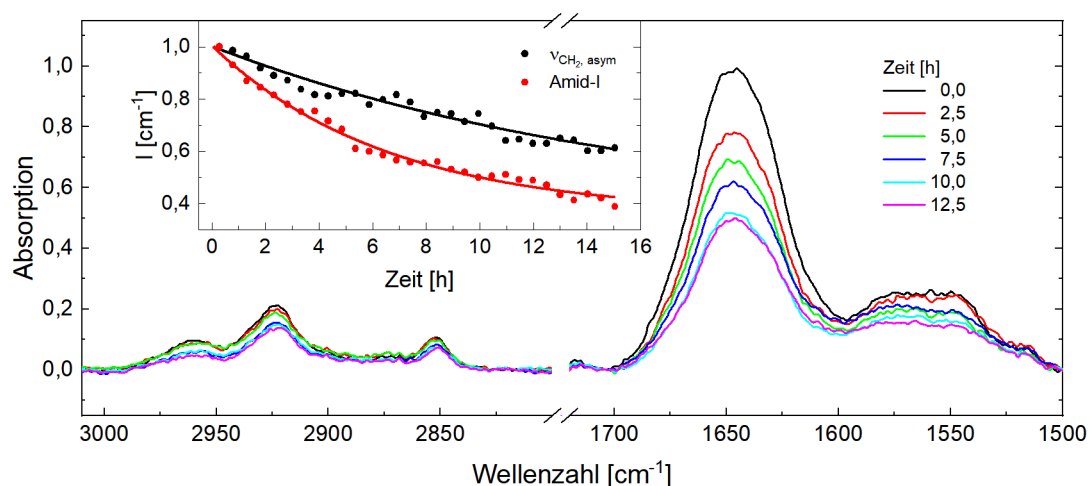


Abbildung 8.4: Abbau auf ATR-Kristall adsorbierter SR-Membranen durch 0,02 u Chymotrypsin, beobachtet über 15 h. Der Einzug zeigt den zeitlichen Verlauf der Absorption der asymmetrischen CH_2 -Valenzschwingungsbande und der Amid-I-Bande, normiert auf die jeweiligen Ausgangswerte, sowie die Anpassung beider Verläufe mit der Funktion eines exponentiellen Abfalls.

gewählt, dessen Einkanalspektrum gegen die Pufferlösung bei 20 °C als Hintergrundspektrum verwendet wurde.

Der Flüssigphase wurden 1,0 mg/ml SR-Membranen hinzugefügt und der Prozess der Anlagerung über 90 min spektroskopisch verfolgt. Das erhaltene basislinienkorrigierte Spektrum ist in Abbildung 8.3 zu sehen. Es konnten starke Absorptionsbanden in den Bereichen der CH_2 -Valenzschwingung und der Amid-I, -II und -A Banden beobachtet werden. Aufgrund der Präsenz von H_2O ist jedoch eine Überlagerung mit dessen Absorptionsbanden zu berücksichtigen. Dieses zeigt typischerweise eine Valenzschwingungsbande im Bereich von $\nu_{\text{H}_2\text{O}} = (3410 \sim 3280) \text{ cm}^{-1}$ und eine Deformationsschwingungsbande bei $\delta_{\text{H}_2\text{O}} = 1650 \text{ cm}^{-1}$.^[199] Somit kommt es zu einer Faltung mit den Amid-I und -A Banden. In späteren Untersuchungen von Pour *et al.* wurde mithilfe von Ellipsometrie gezeigt, dass SR-Membranen bei vergleichbaren experimentellen Bedingungen auf Si-Substraten adsorbieren und aufplatzen, wodurch sie eine einzelne Bilage ausbilden.^[200]

Die Konzentration der SR-Membranen in der Flüssigphase wurde dreimal durch Austausch der Hälfte der Flüssigkeit gegen reine Pufferlösung halbiert, um lose SR-Membranen zu entfernen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Membranen zu gewährleisten, wurde das System dabei je 30 min mit einer Peristaltik-Pumpe durchspült. Die finale Konzentration der SR-Membranen lag somit bei 0,125 mg/ml. Während hierbei keine Änderungen an der CH_2 - und Amid-I Banden zu erkennen waren, zeigte sich eine negative Absorptionsbande bei $\tilde{\nu} = (3600 \sim 3300) \text{ cm}^{-1}$. Es ist naheliegend, dass durch den Austausch von SR-Membranlösung durch reine Pufferlösung trotz deren Kontamination mit H_2O die H_2O -Konzentration in der Flüssigphase abnahm. Somit wird im Einkanalspektrum analog zur negativen D_2O -Valenzschwingungsbande bei $\tilde{\nu} = (2750 \sim 2200) \text{ cm}^{-1}$ weniger Absorption durch H_2O detektiert. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Absorptionsbande bei $\tilde{\nu} = 1650 \text{ cm}^{-1}$ primär die Amid-I Bande darstellt. Gleichzeitig wurde jedoch auch eine schwache Zunahme der Intensität der Amid-II Bande bei $\tilde{\nu} = 1560 \text{ cm}^{-1}$ beobachtet, was höchstwahrscheinlich auf die Nähe zu starken Si-

Absorptionsbanden zurückzuführen ist und erneut zeigt, dass Auswertungen an dieser Bande bei Si-Substraten nicht sinnvoll durchgeführt werden können.

Der Flüssigphase wurde anschließend 0,05 u Chymotrypsin zugefügt. Hierbei trat ein sehr deutlicher Abbauprozess der SR-Membranen auf, welcher anhand der Abnahme der Bandenintensitäten zu sehen war und über die folgenden 14 h spektroskopisch verfolgt wurde. Die erhaltenen basislinienkorrigierten Spektren sind in Abbildung 8.4 zu sehen. Anschließend erfolgte eine Anpassung der Absorptionsbanden mit Lorentz-Funktionen. Da die symmetrische CH₂-Valenzschwingungsbande bei diesen Versuchen recht schwach war, wurde die Auswertung an der asymmetrischen CH₂-Valenzschwingungsbande vorgenommen, um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erzielen. Für die Anpassung der Amid-I Bande wurde eine Faltung zweier Lorentz-Funktionen verwendet. Zur Glättung des Datenverlaufs wurden für beide Absorptionsbanden jeweils 10 aufeinanderfolgende Messpunkte zusammengefasst und deren Durchschnitt aufgetragen, die weitere Auswertung der erhaltenen Werte fand jedoch an den Rohdaten statt. Hierzu wurde erneut die Funktion exponentiellen Abfalls (siehe Gleichung (6.3)) angepasst. Die erhaltenen Anpassungsparameter sind in Tabelle 8.1 angegeben. Die geringere Güte R^2 der Anpassung des zeitlichen Verlaufs der CH₂-Valenzschwingungsbandenintensität ist auf ein deutlich schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis dieser zurückzuführen. Auch zeigt der Verlauf beider Bandenintensitäten, dass eine deutlich längere Messdauer benötigt worden wäre, um einen Gleichgewichtszustand zu erreichen. Analog zu Abschnitt 7.2 wurde für beide Kurvenverläufe anhand der Anpassungsparameter ermittelt, zu welchem Zeitpunkt die Abweichung der gemessenen Bandenintensität weniger als 1% zum erwarteten Grenzwert y_∞ betragen hätte, was bedeuten würde, dass ein Gleichgewichtszustand erreicht worden wäre. Für die Amid-I Bande wurde dabei eine Zeit von 34 h ermittelt, asymmetrische CH₂-Valenzschwingungsbande zeigte wäre erst nach 84 h gegen den Grenzwert konvergiert. Aufgrund des sehr langsam stattfindenden Prozesses konnte dieser Umstand während der Messung jedoch nicht erkannt werden, weshalb die Messserie zu früh abgebrochen wurde. Aus zeitlichen Gründen konnte die Messung für die vorliegende Arbeit jedoch nicht wiederholt werden. Eine langsamere Abnahme der CH₂-Banden erscheint insofern sinnvoll, da Chymotrypsin als Peptidase selektiv Peptidbindungen schneidet. Der Verlust der Lipide ist insofern ein Nebeneffekt des Proteinverlusts der Probe. Trotz der unterschiedlichen Geschwindigkeit erreichen beide Verläufe im Gleichgewichtszustand dieselbe Intensität relativ zum Anfangswert y_∞/y_0 . Dieser Umstand muss jedoch nicht notwendigerweise der Realität entsprechen, da die Auswertung fern des Gleichgewichts stattfand und somit dieser Wert einer fernen Extrapolation entspricht und somit erhebliche Abweichungen von den erhaltenen Parametern auftreten können.

Tabelle 8.1: Erhaltene Parameter nach Anpassung der in Abbildung 8.4 dargestellten Absorptionsbanden mit einer Funktion des exponentiellen Abfalls.

Schwingungsbande	$k [10^{-2} h^{-1}]$	$y_\infty/y_0[\%]$
$\nu_{CH_2, asym}$	$6,0 \pm 1,5$	34 ± 8
Amid – I	$15,2 \pm 0,5$	$35,6 \pm 0,6$

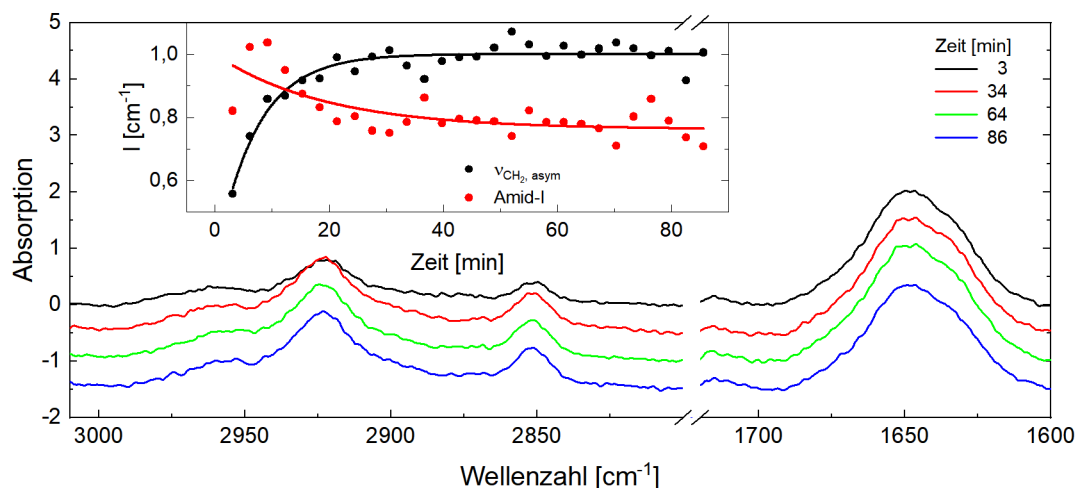


Abbildung 8.5: Abbau auf ATR-Kristall adsorbierter SR-Membranen durch 8 u Chymotrypsin, beobachtet über 1,5 h. Der Einzug zeigt den zeitlichen Verlauf der Absorption der asymmetrischen CH_2 -Valenzschwingungsbande und der Amid-I-Bande, sowie die Anpassung beider Verläufe mit der Funktion eines exponentiellen Abfalls. Der zeitliche Verlauf ersterer wurde gegen den erhaltenen Grenzwert normiert, der letzterer gegen den durch die Anpassung erhaltenen Wert bei $t = 0$.

Die Konzentration des Chymotrypsins wurde anschließend auf 8 u erhöht und der eintretende Prozess für weitere 1,5 h beobachtet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 8.5 zu sehen. Die Basislinienkorrektur der Spektren war bei dieser Messserie schwierig, da die beobachteten Änderungen der Amid-II Bande aufgrund der Nähe zur Si-Absorptionsbande nicht verwertbar waren, die Amid-I Bande jedoch teilweise überlagerten. Aus diesem Grund wurde bei der Spline-Korrektur einer der Ankerpunkte auf das lokale Minimum zwischen Amid-I und -II Bande gelegt, um den starken Einfluss zu unterdrücken. Die Amid-II Bande wurde aus diesem Grund in Abbildung 8.5 nicht mehr abgebildet. In den ersten 20 min der Messserie wurde eine Zunahme beider CH_2 -Valenzschwingungsbanden beobachtet, während die Amid-I Bande leicht abnahm. Wie zuvor wurden die Absorptionsbanden mit Lorentz-Funktionen angepasst, deren zeitliche Intensitätsverläufe im Einzug abgebildet sind. Die nach Anpassung nach Gleichung (6.3) erhaltenen Parameter sind in Tabelle 8.2 eingetragen. Aufgrund der großen Streuung der Messpunkte für den zeitlichen Verlauf der Amid-I Bandenintensität wurde hier eine bedeutend schlechtere Anpassungsgüte als zuvor erhalten. Wie unschwer an den Verläufen zu erkennen ist wurde ein wesentlich schnellerer Prozess als bei Verwendung kleiner Enzymkonzentrationen erhalten, die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten k lagen dabei 2 Größenordnungen über den Werten der vorigen Messserie. Eine Evaluation der theoretischen Gleichgewichtszustände zeigt, dass die CH_2 -Valenzschwingungsbande diesen nach etwa 30 min erreichte, während dies für die Amid-I Bande nach etwa 67 min eintrat. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das System zum Ende der Messserie den Gleichgewichtszustand bereits erreicht hatte. Der Verlust von $(24 \pm 4)\%$ der Amid-I Bandenintensität spricht dabei für einen weiteren Abbau der Membranproteine durch Chymotrypsin. Gleichzeitig erreichte die asymmetrische CH_2 -Valenzschwingungsbande das $(3 \pm 0,7)$ -fache ihrer Anfangsintensität, wobei die Hintergründe für diese Beobachtung nicht eindeutig geklärt werden können. Möglicherweise fand durch die starke Störung des Systems durch die hohe Enzymkonzentration ein Kollaps nicht aufgeplatzter SR-Membranen an der Si-Oberfläche statt. Die verbleibenden Lipide könnten somit näher an der

Tabelle 8.2: Erhaltene Parameter nach Anpassung der in Abbildung 8.5 dargestellten Absorptionsbanden mit einer Funktion des exponentiellen Abfalls.

Schwingungsbande	$k [h^{-1}]$	$y_{\infty}/y_0[\%]$
$\nu_{CH_2, asym}$	$8,5 \pm 1,2$	295 ± 65
Amid – I	$3,1 \pm 1,6$	76 ± 4

Grenzfläche anlagern und wären einer höheren Intensität des evaneszenten Feldes ausgesetzt. Gleichwohl sollte dies jedoch auch zu einem Zuwachs der Amid-I-Bande führen, da die Proteine als Teil der SR-Membran ebenso stärker dem evaneszenten Feld ausgesetzt werden würden. Es ist somit ohne weitere Untersuchungen unklar, ob das beobachtete Verhalten darüber zu erklären ist. Diese konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht mehr durchgeführt werden.

Im aktuellen Abschnitt wurde der enzymatische Abbau von SR-Membranen durch Chymotrypsin mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht. Die Verwendung von 0,02 u des Enzyms führte dabei zu einem langsamen Abbauprozess, welcher erst nach mehreren Tagen den Gleichgewichtszustand erreichen würde. Da dies zum Zeitpunkt der Messung nicht erkannt werden konnte, wurde diese vorzeitig beendet, was für weiterführende Untersuchungen zu vermeiden wäre. Bei der Zugabe einer hohen Enzymkonzentration wurde ein schneller Prozess beobachtet, bei dem die Amid-I Bande weiter an Intensität verlor, was im Einklang mit der Funktion des Chymotrypsins als Peptidase steht. Dahingegen wurde eine deutliche Zunahme der CH_2 -Valenzschwingungsbandenintensität beobachtet. Die Vermutung wurde aufgestellt, dass dies durch Aufplatzen der trotz Spülen verbliebenen SR-Membranen und anschließender Anlagerung dieser an die Oberfläche zu erklären sei, was jedoch anhand der zur Verfügung stehenden Daten nicht zu belegen ist. Für weiterführende Untersuchungen sollten daher strukturaufgelöste Messmethoden wie XRR und NR verwendet werden, um die beobachteten Phänomene zu rationalisieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dies jedoch aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

9. Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von DMPC-Multilagen mit off-spekularer Neutronenstreuung

Arthrose ist eine der häufigsten Gelenkerkrankungen der heutigen Gesellschaft und betrifft etwa die Hälfte der Frauen und ein Drittel der Männer ab 60 Jahren. Insbesondere Gelenke, welche im Alltag größeren Belastungen ausgesetzt sind, wie Hüft-, Knie-, Schulter- Finger- und Wirbelgelenke, sind hiervon häufig betroffen. Dennoch kann Arthrose an allen Gelenken beobachtet werden. Es handelt sich um eine Abnutzungserscheinung des Gelenkknorpels, hervorgerufen durch eine erhöhte Reibung bei Bewegung.^[201] Diese kann verschiedene Ursachen haben, wie Gelenkfehlstellungen und starke Belastung. Auch eine genetische Veranlagung ist möglich.^[202] Die Folge ist eine Entzündung des Gelenks mit oft starken und permanenten Schmerzen, in vielen Fällen mit großen Einschränkungen im Alltag bis hin zur Berufsunfähigkeit.^[201-202] Aufgrund des demographischen Wandels und des in Industrienationen häufig auftretenden Übergewichts und mangelnder Bewegung sind immer mehr Menschen von Arthrose betroffen.^[201-202]

Der Gelenkknorpel ist bedeckt mit einer dünnen Schicht aus Lipiden. Diese trägt zur Gleitfähigkeit des Gelenks bei und verhindert somit den Abrieb des Knorpels. In erkrankten Gelenken sind die Lipide jedoch zumindest teilweise abgetragen, sodass die Reibung bei Bewegung erhöht ist.^[15] Weiter werden auch Änderungen in der Synovialflüssigkeit beobachtet. Diese füllt das Gelenkinnere und hat die Funktion, dieses zu schmieren und zu ernähren.^[202] Einer der wichtigsten Bestandteile der Synovialflüssigkeit ist die HS, ein saures Polysaccharid. Zusammen mit den Knorpel- bedeckenden Lipiden sorgt HS für eine Reduzierung der Reibung im Gelenk.^[202] In erkrankten Gelenken ist sowohl ihre Konzentration als auch die molare Masse erniedrigt. Dies lässt den Schluss zu, dass ein Zusammenhang zwischen dieser Veränderung und dem Abrieb von Lipiden und Knorpelgewebe besteht.^[202-203] Eine konservative Behandlungsmethode der Arthrose ist deshalb die sogenannte Viskosupplementation, bei der eine wässrige Lösung von HS in das Gelenk injiziert wird. Der Nutzen ist jedoch umstritten. Zwar berichten viele Patienten von gelinderten Schmerzen, dieser Effekt hält jedoch oft nur wenige Monate an. Auch ist bislang unklar, welche Konzentration und MW die besten Therapieaussichten verspricht.^[202] Die spezifischen Interaktionen von HS mit dem Lipid-bedeckten Gelenkknorpel, die zur Reibungsverminderung und Gelenkstabilisierung führen, sind außerdem noch nicht vollständig verstanden, was eine durchdachte Weiterentwicklung der Therapie erschwert.^[204]

In Arbeiten der Arbeitsgruppe Dahint wurde die Interaktion von HS mit Lipid-Oligobilagen mithilfe von spekulärer NR untersucht.^[14, 205] Hierbei wurde gezeigt, dass die Zugabe von HS zu einem Quellen der Filme führt, was auf eine An- und Einlagerung des Polymers an beziehungsweise in die Lipide und somit eine elektrostatische Abstoßung zwischen benachbarten Lipid-Bilagen zurückzuführen ist. Gleichzeitig verbesserte sich auch die mechanische Stabilität der Filme, was mithilfe einer Scherapparatur nachgewiesen wurde. Die Zeit, bis ein Lipidfilm in Kontakt mit einer HS-Lösung den Gleichgewichtszustand erreicht, ist in diesen Modellsystemen jedoch mit mehreren Wochen sehr lang. Dies erschwert die strukturellen Untersuchungen der Proben *in vitro*, da die Proben in der Regel vor und nach HS-Inkubation charakterisiert werden und somit entsprechende Inkubationszeiträume an den oft

überbuchten Neutronenreflektometern eingeplant werden müssen. Somit ist die Verwendung geeigneter Ersatzstoffe für die Untersuchung der Lipidstabilisierung sinnvoll. Hierfür wurde unter anderem das synthetische kationische Polyelektrolyt Polyallylamin-Hydrochlorid (PAH) verwendet. Ähnlich wie HS ist auch PAH kommerziell in verschiedenen MW erhältlich, wodurch der Einfluss des Polymerisierungsgrades auf die stabilisierenden Eigenschaften untersucht werden konnte. Es zeigte sich, dass das synthetische Polymer ähnlich stabilisierend auf Lipid-Oligobilagen wirkt und vergleichbare Quellprozesse induziert, sich ein Gleichgewichtszustand jedoch bereits nach einigen Stunden einstellt.^[15] Das Quellen und die Stabilisierung wurde auf eine Kombination von Anlagerung des Polymers an die Lipid-Kopfgruppen in Kombination mit möglichen Verkettungen zwischen den Bilagen zurückgeführt. Für die Untersuchungen mit NR handelt es sich hiermit um einen gut geeigneten Ersatzstoff zu HS.^[14-15, 206]

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zusätzliche Erkenntnisse über die mechanisch stabilisierenden Eigenschaften von polymeren Zusatzstoffen auf Filme von DMPC mithilfe von off-spekularer NR gewonnen werden. Im Gegensatz zur spekularen Reflektometrie, wird bei dieser Methode die Entwicklung der Bragg-Peaks entlang der Komponente des Streuvektors parallel zur Probenoberfläche $Q_{\parallel}$ betrachtet (siehe Abbildung 9.1). Bei der Verwendung ausreichend dicker und regelmäßiger Proben werden entlang dieses Vektors sogenannte Bragg-Sheets beobachtet, welche durch konstruktive Interferenz der von der grundlegenden Ordnung abweichenden Lagen des Schichtsystems entstehen.^[49, 207-208] Anhand der Analyse ihrer Entwicklung entlang $Q_{\parallel}$ kann das Kompressions-Modul B und die Biegesteifigkeit κ der Probe erhalten werden. Diese sollten für DMPC-Filme unter Luft, D₂O und Lösungen von PAH oder HS untersucht werden, um stabilisierende Eigenschaften der Polyelektrolyte nachzuweisen. Es wird dabei eine Zunahme von κ aufgrund stärkerer Intramembran-Wechselwirkungen erwartet. Eine Vorhersage der Änderung von B ist dahingegen schwierig, da sowohl Quelleffekte, welche die Intermembran-Wechselwirkung verringern, als auch Verkettungen durch die Polyelektrolyte gleichzeitig auftreten. Ersteres würde zu einer Reduktion von B führen, während letzteres diesen Parameter erhöhen sollte. Die hier beschriebenen Experimente fanden am Instrument D16 am ILL statt.

9.1. Probenvorbereitung und Analytik

Die Untersuchungen fanden an mit DMPC beschichteten Si-Wafern ($\emptyset (100 \pm 0,5)$ mm, Dicke (650 ± 25) μ m) statt, welche in rechteckige Stücke von 55 mm $\times$ 23 mm Seitenlänge gebrochen wurden. Vor der Beschichtung wurden die Bruchstücke nach dem in Abschnitt 3.4.1 beschriebenen vereinfachten Reinigungsprotokoll gereinigt. Damit die später erhaltenen Bragg-Sheets eine zur Auswertung ausreichende Intensität aufwiesen, wurden - verglichen mit spekulare Reflektivität - deutlich dickere Proben benötigt. Aus diesem Grund konnten diese nicht mit Spin-Coating oder Vesikelfusion präpariert werden. Stattdessen wurde eine 0,5 mg/ml Vesikellösung des Lipids in D₂O wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben hergestellt. Die polierte Seite des gereinigten Waferbruchstücks wurde mit dieser bedeckt und im Trockenschrank bei 70 °C gelagert, bis die Flüssigkeit vollständig verdampft war. Auf diese Weise werden Lipid-Multilagen, bestehend aus etwa hundert Bilagen, erhalten. Zur Vermessung der Proben unter Flüssigkeit wurden beschichtete und unbeschichtete Waferstücke mit der polierten Seite nach innen zusammengesetzt, wobei ein reproduzierbarer Abstand

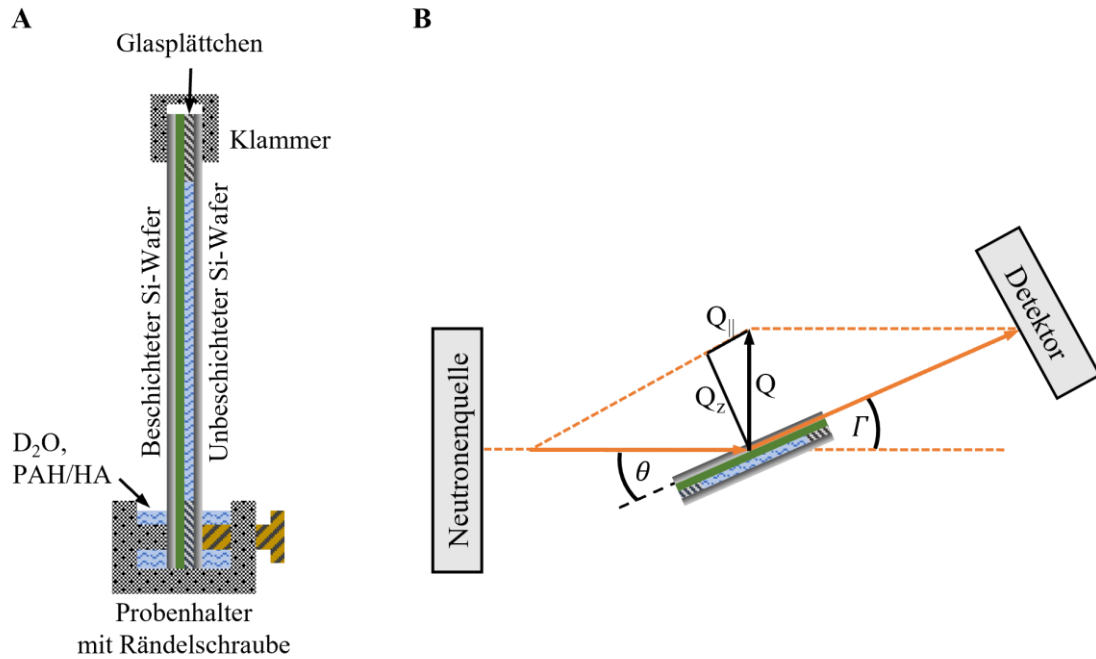


Abbildung 9.1: **A** Seitenansicht der verwendeten Proben im Probenhalter. Durch das Einspannen dünner Glasplättchen wird ein reproduzierbarer, kleiner Abstand der Silizium-Bruchstücke gewährleistet. Die Benetzung der Probe erfolgt durch die so entstehenden Kapillarkräfte. Eine Klammer aus Delrin, sowie ein Probenhalter mit Rändelschraube gewährleisten eine stabile Befestigung der Probe während der Messung. **B** Schematische Aufsicht für eine Messung am Instrument D16. Die Probe wird mittels einer fixierten Neutronenquelle beleuchtet, während der Messung werden der Probenwinkel θ und der Detektorwinkel Γ variiert.^[49]

durch Einsetzen rechteckiger Glasstücke (0,2 mm Dicke) erzielt wurde (siehe Abbildung 9.1 A). Diese wurden in einen Probenhalter gesetzt und an der unteren kurzen Seite mit einer Schraube befestigt. Die obere Seite wurde durch eine Klammer aus Delrin zusammengehalten. Die Benetzung der Probe erfolgte durch Befüllen der Probenhalterung mit der entsprechenden Flüssigkeit, welche danach durch Kapillarkraft zwischen den Waferstücken nach oben wanderte.

Der Probenhalter wurde anschließend in eine am Instrument vorhandene Probenkammer gesetzt. Es konnte sowohl die Temperatur der Probe als auch die Luftfeuchtigkeit (relative humidity, RH) im Inneren der Kammer reguliert werden. Letzteres erfolgte über ein temperierbares Flüssigkeitsreservoir im Kammerinneren. Beide Temperaturen wurden mithilfe externer Kryostaten reguliert. Die Probenkammer wurde in die am Instrument vorgesehene Halterung eingesetzt, Messungen erfolgten sodann durch Verfahren des Probenwinkels Ω und des Detektorwinkels Γ (siehe Abbildung 9.1 B).

Die Auswertung der erhaltenen Datensätze erfolgte mit einem Programm, welches in der Arbeitsgruppe Tanaka in Igor Pro entwickelt wurde. Die Extraktion der gesuchten Daten aus den Rohdaten ist mithilfe eines Beispielsperiments in Abbildung 9.2 gezeigt. Anhand der Experimentparameter wurde hierfür die für die verschiedenen Winkelkombinationen gemessene Reflektivität R in die $Q_z/Q_{\parallel}$ -Ebene übertragen, sowie Beiträge des Direktstrahls, welche durch Überstrahlen der Probe entstehen, korrigiert (Abbildung 9.2 A – C). Die spekulare Reflexion wurde so entlang $Q_{\parallel} = 0$ erhalten (Abbildung 9.2 D). Da jedoch häufig eine Abweichung vom theoretischen Verhalten auftrat, die dazu führte, dass die Bragg-

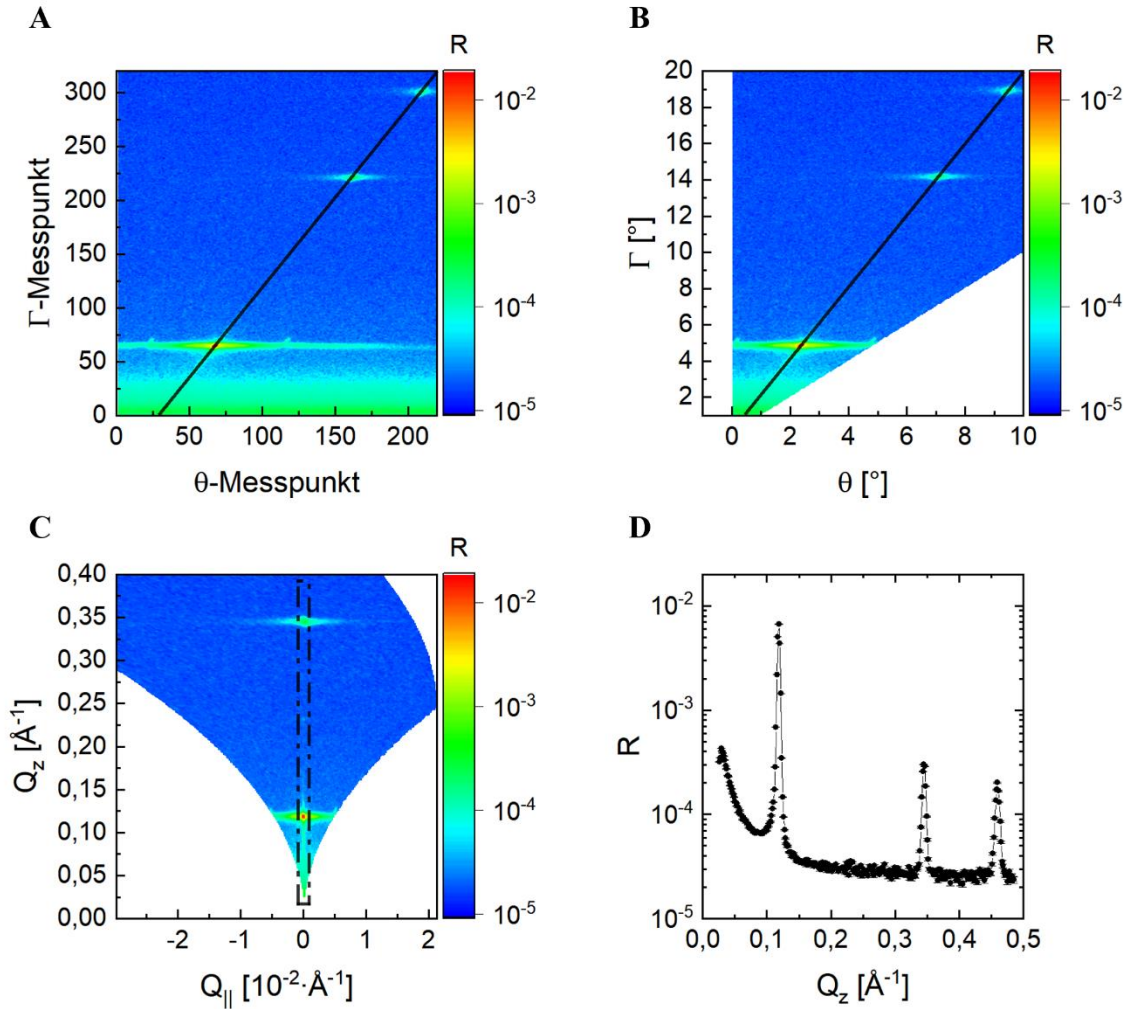


Abbildung 9.2: Beispielfhafte Auswertung einer Messung von DMPC-Multilagen unter 50% RH. **A** Rohdaten. Die eingezeichnete Linie entspricht der Bedingung spekularer Reflexion und wird aus den Messparametern erhalten. Anhand dieser erfolgt anschließend die Kalibration der Ω - und Γ -Achsen für die Darstellung in Abbildung B. **B** Rohdaten nach Kalibration und Löschen der Beiträge des Direktstrahls. **C** Auftragung der kalibrierten Daten in $Q_z/Q_{||}$ -Darstellung. Der Verlauf spekularer Reflexion ($Q_{||} = 0$) ist mit einem gestrichelten Kasten markiert. **D** Extrahierte spekulare Reflexion der Probe.

Peaks bei alleiniger Berücksichtigung der Experimentparameter nicht entlang $Q_{||} = 0$ verliefen, konnte zur Korrektur bei Bedarf noch ein Γ -Offset eingestellt werden.

Um die mechanischen Eigenschaften des Lipid-Filmes zu untersuchen, mussten die Bragg-Sheets der Probe analysiert werden. Diese sind an der Position der Bragg-Peaks $Q_{z,Bragg}$ entlang $Q_{||}$ zu sehen. Jedoch kann die Auswertung nicht an beliebigen Sheets durchgeführt werden, da die anschließende Simulation voraussetzt, dass für diese die Born-Näherung gültig ist. Dies gilt jedoch nur für Streuvektoren von $Q_z > 3 \cdot Q_c$, mit dem kritischen Streuvektor Q_c , der durch die Position der Totalreflexionskante bestimmt ist. Weiter sollte für eine verlässliche Auswertung die Reflektivität des

Bragg-Peaks in spekularer Darstellung nicht mehr als 0,1% der der Totalreflexion betragen.² Während Q_c durch die SLD von Silizium und der Probenumgebung (Luft beziehungsweise D_2O) bestimmt wurde und somit, auch wenn nicht in den Daten sichtbar, bekannt war, war die absolute Reflektivität bei Q_c unbekannt, da die Daten aufbaubedingt nicht auf den Wert 1 an der Totalreflexionskante normiert werden konnten. Werden jedoch Bragg-Peaks höherer Ordnung verwendet, kann deren Intensität mit der des ersten Bragg-Peaks verglichen werden. Da für diesen im normierten Fall notwendigerweise $R(Q_{Bragg,1}) < 1$ gilt, kann abgeschätzt werden, ob die gewählten Peaks die genannten Bedingungen erfüllen. Durch die Auswahl des Peaks konnte weiter direkt anhand dessen Lage und Ordnung die Dicke d der Wiederholeinheiten nach Gleichung (6.2) bestimmt werden.

Nach Auswahl eines Bragg-Peaks geeigneter Ordnung konnte das Bragg-Sheet entlang $Q_{||}$ charakterisiert werden. Hierfür wurde dieses für alle Messpunkte von $Q_{||}$ entlang der Line $Q_z = Q_{z,Bragg}$ mithilfe von Gauß-Funktionen angepasst und so die Intensität $A(Q_{||})$ und Breite $\sigma(Q_{||})$ bestimmt. Um den theoretischen Verlauf dieser Werte zu simulieren, wurden die in Abschnitt 2.1.3 hergeleiteten Formeln verwendet. Für diese Simulation stand kein Anpassungs-Algorithmus zur Verfügung. Somit musste der Caillé-Parameter η und der de Gennes-Parameter λ (siehe Gleichung (2.16)), zusammen mit der unteren Grenze des Integrals der Strukturgrößen R (siehe Gleichung (2.14)(2.12)) und der Zahl der Bilagen N geschätzt, und der Einfluss der gewählten Parameter auf den simulierten Verlauf von $I(Q_{||})$ und $\sigma(Q_{||})$ anhand eines Vergleichs mit den Messdaten evaluiert werden. Anhand von η und λ konnten sodann die Biegesteifigkeit κ und das Kompressions-Modul B bestimmt werden.

9.2. Untersuchungen der mechanischen Eigenschaften von DMPC-Multilagen unter Einfluss von PAH

Das Polyelektrolyt PAH erwies sich in Scherexperimenten als gutes Modellsystem zur Untersuchung stabilisierender Effekte auf Lipid-Oligobilagen. Untersuchte Proben zeigten in Kontakt mit PAH-Lösungen nicht nur eine signifikant verbesserte Stabilität gegenüber Scherkräften, auch konnte ein Gleichgewichtszustand des Gesamtsystems bereits nach wenigen Stunden erreicht werden. HS-Lösungen zeigen ebenso mechanisch stabilisierende Einflüsse auf Oligobilagen, jedoch können Gleichgewichtszustände erst nach mehreren Wochen erreicht werden.^[14-15, 206] Für die vorliegende Arbeit war vorgesehen, nach möglichen Korrelationen zwischen der Stabilisierung von DMPC-Multilagen durch Interaktion mit PAH beziehungsweise HS und der Biegesteifigkeit beziehungsweise dem Kompressions-Modul der Filme zu suchen.

Um einen Einfluss der Polymere zu zeigen, mussten zuerst die Filme ohne diese charakterisiert werden. Hierzu wurden Filme unter Luft bei niedriger und hoher RH, sowie unter reinem D_2O untersucht. Anschließend erfolgte die Zugabe des jeweiligen Polymers, sodass dessen Konzentration in der Flüssigkeitsphase der Probenkammer 3 mg/ml betrug. Versuchsreihen wurden mit unterschiedlichen MW von PAH durchgeführt, jedoch waren die meisten Proben aufgrund schwacher

² Es handelt sich hierbei um einen Erfahrungswert, der von Dr. Wasim Abuillan aus dem AK Tanaka genannt wurde, der bei der Datenauswertung unterstützte.

9. Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von DMPC-Multilagen mit off-spekularer Neutronenstreuung

Bragg-Sheets für die Auswertung ungeeignet. Die hier demonstrierten Auswertungen fanden deshalb alle an einer Probe statt, welche die verlässlichsten Ergebnisse lieferte.

Für Untersuchungen mit HS wurden die Proben etwa zwei Wochen vor den Messungen in der jeweiligen HS-Lösung inkubiert, wobei auch hier unterschiedliche MW eingesetzt wurden. Somit konnten die entsprechenden Proben nicht trocken oder unter reinem D₂O vorcharakterisiert werden. Eine längere Inkubationszeit war aufgrund von Lieferschwierigkeiten der gewünschten MW nicht möglich.

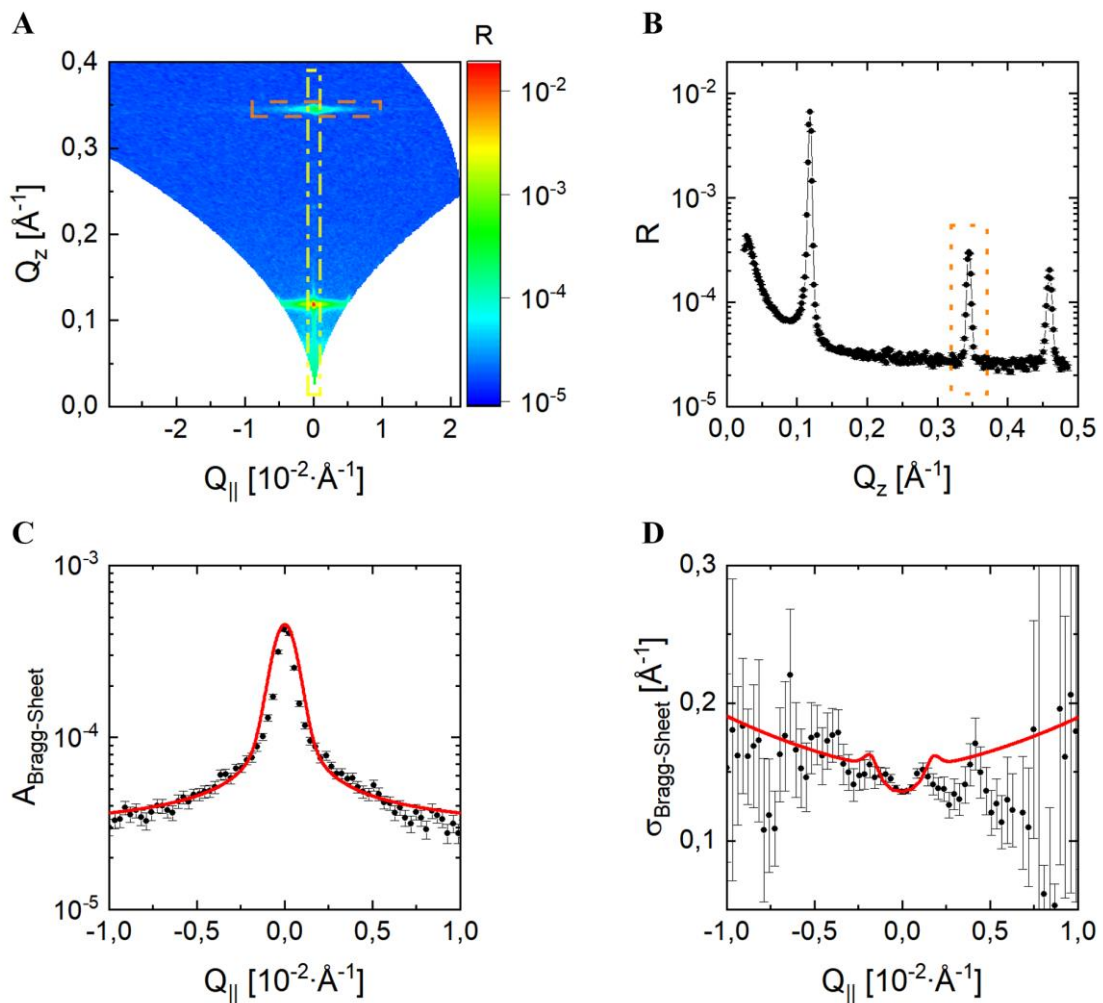


Abbildung 9.3: Auswertung der erhaltenen Daten aus der Messung von DMPC-Multilagen unter 50% RH. Da ein Bragg-Peak 2. Ordnung nicht zu erkennen ist erfolgte die Auswertung am Peak 3. Ordnung. **A** Darstellung Q_z gegen $Q_{\parallel}$. Die spekulare Reflexion ist mit einem gelben Kasten markiert, das untersuchte Bragg-Sheet mit einem orangenen. **B** Spekulares Reflexionsprofil der untersuchten Probe. **C** Erhaltene Bragg-Sheet-Intensitäten und Simulation der Datenpunkte. **D** Erhaltene Bragg-Sheet-Breite und Simulation der Datenpunkte.

9.2.1. Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die mechanischen Eigenschaften von DMPC-Multilagen

Um die Luftfeuchtigkeit im Inneren der Probenkammer zu regulieren, wurde das Flüssigkeitsreservoir der Probenkammer mit D₂O befüllt und nach einer vorliegenden Kalibrationskurve temperiert. Dabei wurde die Probe selbst konstant bei 20 °C gehalten. Die erhaltene RH im Kammerinneren wurde über ein Hygrometer kontrolliert. Vor Start der Messungen wurde die Probe etwa drei Stunden unter diesen Bedingungen inkubiert, womit erreicht werden sollte, dass sich diese zum Zeitpunkt der Messung bereits im Gleichgewichtszustand befand.

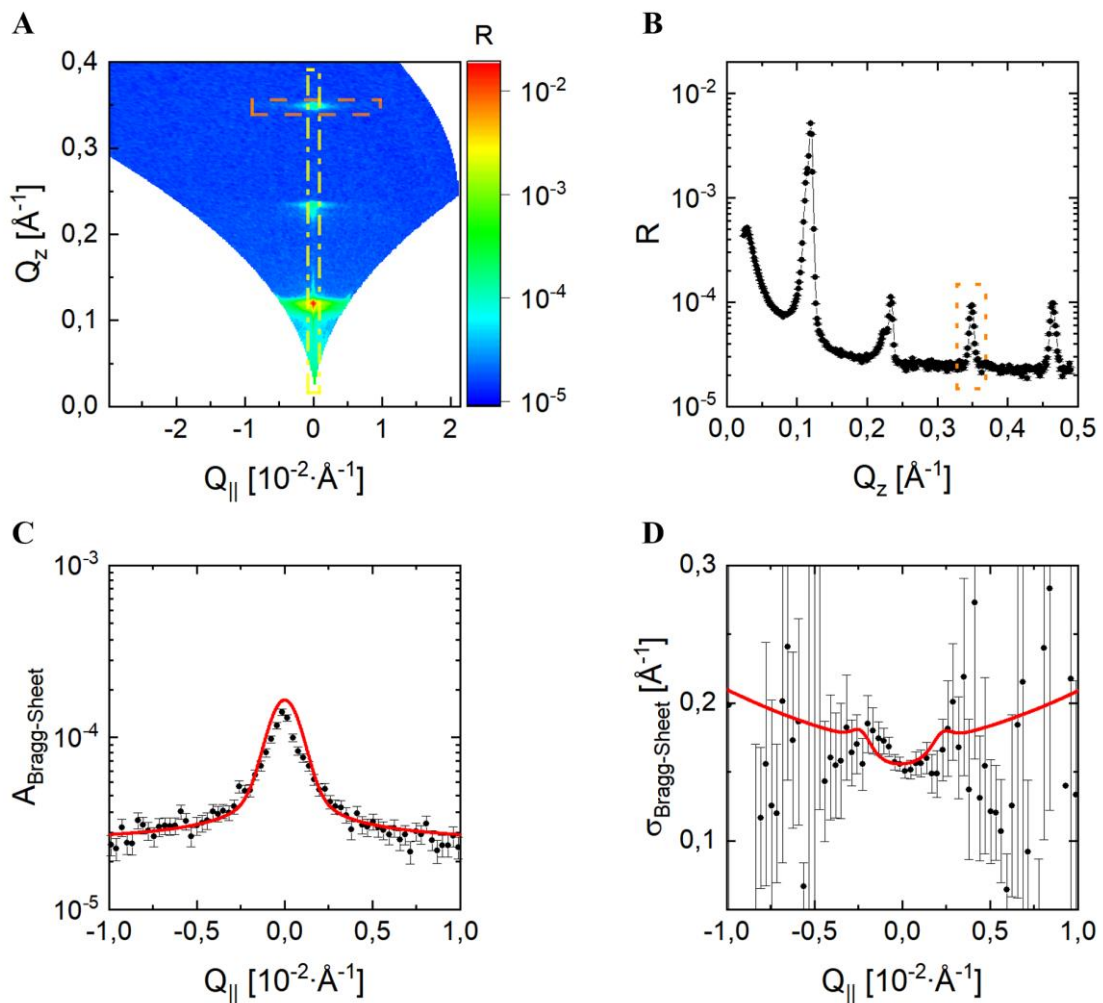


Abbildung 9.4: Auswertung der erhaltenen Daten aus der Messung von DMPC-Multilagen unter 95% RH. Der Bragg-Peak 2. Ordnung zeigt bestand aus zwei nicht isolierbaren Peaks, was die Auswertung erschwerte. Diese erfolgte deshalb am Peak 3. Ordnung. **A** Darstellung Q_z gegen $Q_{||}$. Die spekulare Reflexion ist mit einem gelben Kasten markiert, das untersuchte Bragg-Sheet mit einem orangenen. **B** Spekulares Reflexionsprofil der untersuchten Probe. **C** Erhaltene Bragg-Sheet-Intensitäten und Simulation der Datenpunkte. **D** Erhaltene Bragg-Sheet-Breiten und Simulation der Datenpunkte.

Die erste Messung der DMPC-Multilagen fand bei 50% RH statt, die entsprechende Auswertung ist in Abbildung 9.3 dargestellt. Bei Betrachtung der spekularen Reflexion (Abbildung 9.3 B) ist deutlich zu erkennen, dass der Bragg-Peak, und somit auch das Bragg-Sheet zweiter Ordnung nicht vorhanden ist. Dieser Effekt kann bei bestimmten Verhältnissen von SLD und Dicke der einzelnen Schichten der Lipide auftreten und wird auch in der Literatur beschrieben.^[44] Für die typischen Dicken und SLDs hydratisierter DMPC-Bilagen wäre dies zum Beispiel durch die Anlagerung von 11 D₂O-Molekülen pro Lipid-Kopfgruppe gegeben, was durch Simulation der spekularen Reflexionsprofile einfach zu überprüfen ist. Die Lage der übrigen Bragg-Peaks lässt auf eine Dicke der Wiederholeinheiten von $d_{wdh,50\% RH} = (54,1 \pm 1,0) \text{ \AA}$ schließen, was in guter Übereinstimmung der Ergebnisse von Tristram-Nagle *et al.* für teilweise hydratisierte DMPC-Bilagen ist.^[34] Es ist hier nicht eindeutig zu sagen, ob es zu einer Ausbildung einer Wasserschicht zwischen den einzelnen Bilagen kommt, weshalb an dieser Stelle keine Unterscheidung zwischen diesem Zustand und einer Anlagerung von D₂O-Molekülen an den DMPC-Kopfgruppen gemacht wird. Die weitere Auswertung erfolgte sodann am Bragg-Sheet dritter Ordnung.

Die Bragg-Sheet-Breiten zeigten einen asymmetrischen Verlauf, welcher mit dem verwendeten Programm nicht simuliert werden kann (siehe Abbildung 9.3 D). Während für negative $Q_{\parallel}$ eine Zunahme der Breite zu sehen ist, was dem theoretisch vorhergesagten Verhalten entspricht, ist im Bereich von $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1} < Q_{\parallel} < 0,75 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ eine Abnahme der Breite zu erkennen. Dieser musste somit für die Simulation des Bragg-Sheet ignoriert werden. Dahingegen entsprach der Verlauf der Sheet-Intensitäten sehr gut dem theoretischen Verhalten (siehe Abbildung 9.3 C). Eine vollständige Übereinstimmung mit den Datenpunkten konnte jedoch nicht erzielt werden, da die Simulation der Breiten eine größere Auflösung $\Delta Q_{\parallel}$ benötigte, was zu einer Verbreiterung des simulierten Verlaufs im Bereich von $-0,2 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1} < Q_{\parallel} < 0,2 \cdot 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ geführt hätte. Dennoch kann die erreichte Anpassung als zufriedenstellend angesehen werden. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 9.2 zu finden.

Die Luftfeuchtigkeit im Kammerinneren wurde anschließend auf 95% RH erhöht, indem die Temperatur des Flüssigkeitsreservoirs erhöht wurde. Bis zum Start der Messung wurde erneut etwa drei Stunden gewartet, damit das System den Gleichgewichtszustand erreichen konnte. Die Auswertung der erhaltenen Messdaten ist in Abbildung 9.4 dargestellt. Verglichen mit der Messung bei 50% RH war hier das Bragg-Sheet zweiter Ordnung zwar vorhanden, jedoch zeigte der entsprechende Peak in spekularer Reflexion (Abbildung 9.4 B), ebenso wie der Peak erster Ordnung, eine Doppelpeak-Struktur. Dies weist darauf hin, dass in der Probe zu diesem Zeitpunkt zwei Bereiche vorlagen, deren innere Struktur sich voneinander unterschied. Die Lage der beobachteten Bragg-Peaks und die zugehörigen Dicke der Wiederholeinheiten sind in Tabelle 9.1 aufgeführt. Wie zu sehen ist weichen die Dicken d_1 und d_2 von den übrigen Dicken ab, erstere kann jedoch aufgrund der Überlagerung mit d_1 nicht verlässlich bestimmt werden. Eine durchschnittliche Bilagendicke kann somit an den Werten d_2 , d_3 und d_4 bestimmt werden, wodurch ein Wert von $d_{wdh,95\% RH} = (53,9 \pm 0,2) \text{ \AA}$ erhalten wird. Somit bestand kein signifikanter Unterschied der Dicken der Wiederholeinheiten bei Änderung der Luftfeuchtigkeit. Die abweichenden Peakpositionen könnten durch teilweise Ausbildung von Wasserzwichenschichten oder unterschiedliche Hydratisierung begründet sein.

Tabelle 9.1: Bragg-Peaks und zugehörige Dicke der Wiederholeinheiten, ermittelt anhand der der spekularen Reflexion der Probe unter 95% RH.

Ordnung	Lage des Bragg-Peaks $Q_i [\text{\AA}^{-1}]$	Berechnete Dicke der Wiederholeinheiten $d_i [\text{\AA}]$
1	0,116	54,0
1'	0,120	52,2
2	0,227	55,4
2'	0,234	53,7
3	0,349	54,0
4	0,464	54,1

Die Auswertung der Messdaten fand erneut am Bragg-Sheet dritter Ordnung statt und ist in Abbildung 9.4 dargestellt. Die Wahl des Sheets geschah aufgrund dessen Eigenschaft, im Gegensatz zu den Peaks niedrigerer Ordnung keine Doppelpeak-Struktur zu zeigen. Verglichen mit dem entsprechenden Peak der Messung bei niedriger RH zeigte dieser jedoch eine deutlich verringerte Intensität. Ein Lagenverlust kann bei Messungen unter Luft ausgeschlossen werden, weshalb es sich hierbei wahrscheinlich um ein ähnliches Phänomen wie die Unterdrückung des Bragg-Peaks zweiter Ordnung bei der Messung unter geringer Luftfeuchtigkeit handelt. Zusätzlich konnten bei der Auswertung der Sheet-Intensitäten und -Breiten Unstimmigkeiten beobachtet werden. Während die Auftragung der Intensität (Abbildung 9.4 C) bei $Q_{\parallel} = 0$ ein Maximum zeigte, war das Minimum der Sheet-Breite, welches an derselben Stelle liegen sollte, zu positiven $Q_{\parallel}$ verschoben. Entsprechend musste bei der Prozessierung der Daten ein Γ -Offset verwendet werden, um einen Kompromiss bezüglich beider Peak-Eigenschaften zu erhalten. Ähnlich wie bei der Auswertung der Messungen unter niedriger RH wurden Bragg-Sheet-Breiten im Bereich von $Q_{\parallel} > 0,25 \cdot 10^{-3} \text{\AA}^{-1}$ nicht beachtet (siehe Abbildung 9.4 D). Weiter zeigte die Simulation der Intensitäten nahe $Q_{\parallel} = 0$ etwas größere Werte als die Messung. Eine Variation der Peakhöhe war anhand der im Auswertungsprogramm vorhandenen Parameter nicht möglich, weshalb auf eine Kompensation der Abweichung verzichtet werden musste. Die beobachtete Abweichung könnte auf einer fehlerhaften Normierung der Messdaten beruhen. Jedoch nutzt das hierfür verwendete Programm die Neutronen-Zahl, welche während der Messung am Referenz-Monitor gemessen wurde und in den Daten abgespeichert wurde. Eine Anpassung dieses Werte widerspräche also den vor Ort gegebenen Bedingungen und ist somit nicht sinnvoll. Die verringerte Intensität muss demnach probebedingt entstanden sein. Möglicherweise ist dies anhand obengenannter Unterdrückung der Peak-Intensität zu erklären. Die geringe Intensität des Bragg-Sheets führt auch zu größeren Ungenauigkeiten in der Bestimmung der entsprechenden Sheet-Breiten, was die verglichen mit der vorherigen Messung deutlich größeren Fehlerbalken erklärt (vergleiche Abbildung 9.3 D und Abbildung 9.4 D). Dennoch konnte mit den zur Verfügung stehenden Parametern insbesondere in der Mitte des Bragg-Sheets eine zufriedenstellende Simulation erreicht werden. Die erhaltenen mechanischen Parameter sind in Tabelle 9.2 eingetragen und unterscheiden sich von denen der Messung bei niedriger RH nur wenig.

9.2.2. Einfluss von D₂O und PAH auf die mechanischen Eigenschaften von DMPC-Multilagen

Die in Abschnitt 9.2.1 untersuchte Probe wurde im Anschluss an die Messungen unter Luft in D₂O-Umgebung vermessen. Hierzu wurde die Probezelle mit der Flüssigkeit gefüllt, sodass durch Kapillarkräfte zwischen den Si-Bruchstücken die gesamte Lipid-Multilage benetzt wurde. Im Inneren der Probenkammer wurde eine Luftfeuchtigkeit von 95% RH eingestellt, was auch für nachfolgende Experimente beibehalten wurde. Die erhaltene Messung und deren Auswertung sind in Abbildung 9.5 dargestellt. Die Messung zeigte ein Quellen der Probe auf eine Dicke der Wiederholeinheit von $d_{D_2O} = (62,6 \pm 1,2) \text{ \AA}$. Dies entspricht den Erwartungen auf Grundlage von Literatur- und Erfahrungswerten und ist durch eine Einlagerung von Wasserschichten zwischen den Lipid-Bilagen zurückzuführen. Gegenüber den vorherigen Messungen wurde eine deutlich geringere Intensität der Bragg-Sheets höherer Ordnung beobachtet, wobei der Peak zweiter Ordnung deutlich schwächer ausgeprägt und der Peak dritter Ordnung gar nicht mehr vorhanden war. Da der Bragg-Peak erster Ordnung jedoch noch stark ausgeprägt war, ist ein Lagenverlust kein ausreichender Erklärungsansatz für diese Umstände. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine Kombination von teilweisem Lagenverlust und Kontrastverlust aufgrund der Löchrigkeit des Films. Dies ist jedoch mit dem verwendeten Auswertungsprogramm nicht zu bestimmen.

Die Intensitäten des verwendeten Bragg-Sheets entlang $Q_{\parallel}$ waren entsprechend schwach ausgeprägt, was die Anpassung dieser mit Gauß-Funktionen erheblich erschwerte. Insbesondere bei Betrachtung der Bragg-Sheet-Breiten (Abbildung 9.5 D) fiel ein starkes Rauschen der Datenpunkte auf, was auf schlechte Anpassungen hinweist. Ein Einschränken der Anpassungs-Parameter konnte dieses Problem etwas verbessern, jedoch nicht beheben. Aus diesem Grund wurde der Simulation der Bragg-Sheet-Breiten bei der Auswertung weniger Gewicht zugesprochen und sich vermehrt auf den Verlauf der Intensitäten (Abbildung 9.5 C) konzentriert. Wie auch bei der Messung unter 95% RH war hier die Intensität nahe $Q_{\parallel} = 0$ kleiner, als dies simuliert werden konnte. Die Abweichung war bei der hier diskutierten Messung jedoch höher als bei der vorigen. Es könnte sich erneut um einen Hinweis auf Unterdrückung der Peaks durch die Kombination von Schichtdicken und SLDs handeln. Auffällig ist auch, dass bei $Q_{\parallel} = \pm 0,66 \text{ \AA}^{-1}$ schwach ausgeprägte lokale Maxima existieren. Diese können bei der Simulation berücksichtigt werden. Der Parameter R des Auswertungsprogramms gibt den Radius der kleinsten Strukturen an, welche auf der Oberfläche der Probe bei der Berechnung berücksichtigt werden (siehe Gleichung (2.14)). Wird dieser unter den als Standard eingestellten Wert von $10.000 \text{ \AA}$ gesenkt, so entstehen die beobachteten lokalen Maxima. Zwar nimmt er somit keinen direkten Einfluss auf die gesuchten mechanischen Parameter, jedoch schränkt er den Parameterraum für λ und η ein und führt somit zu einer verlässlicheren Simulation. Wie in Abbildung 9.5 C zu sehen ist, konnten die lokalen Maxima so gut beschrieben werden, jedoch blieb weiterhin die zu geringe Intensität bei $Q_{\parallel} = 0$ vorhanden. Weiter ist zu erkennen, dass die Intensitäten bei $Q_{\parallel} \approx \pm 0,16 \text{ \AA}^{-1}$ etwas unterschätzt wurden. Dies könnte durch Anpassung der übrigen Parameter zwar behoben werden, jedoch würde somit der Verlauf nahe $Q_{\parallel} = 0$ deutlich breiter werden als dass es der Datenlage entspricht, weshalb darauf verzichtet werden musste. Wie in Abbildung 9.5 D zu sehen beschreibt die Simulation der Bragg-Sheet-Breiten die Datenlage nicht. Zwar sind einzelne Aspekte, wie zum Beispiel lokale Minima bei

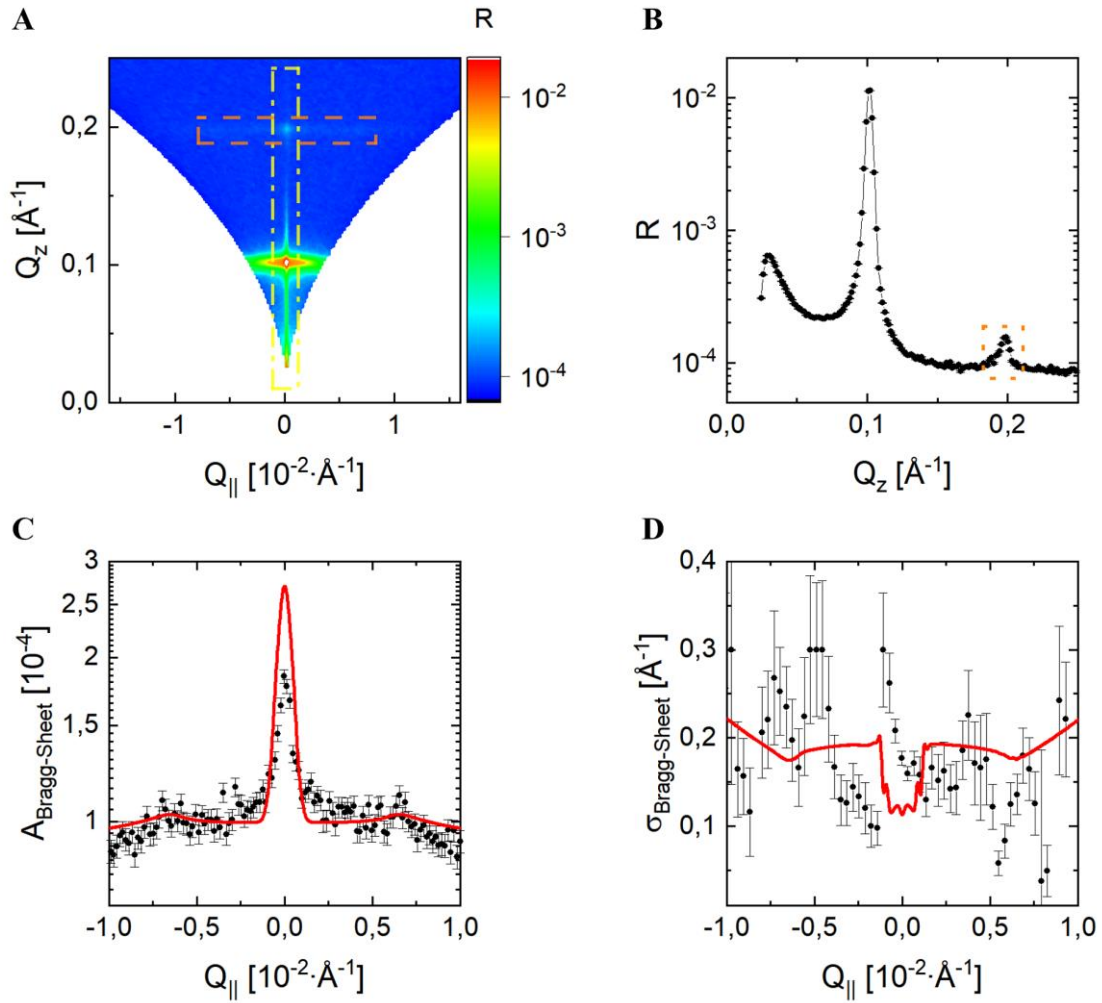


Abbildung 9.5: Auswertung der erhaltenen Daten aus der Messung von DMPC-Multilagen unter D₂O. Der zur Auswertung geeignete Bragg-Peak 2. Ordnung zeigt eine geringe Intensität, die durch die Simulation nicht angepasst werden kann. Die Auswertung ist somit nicht verlässlich möglich. **A** Ausschnitt der Darstellung von Q_z gegen $Q_{\parallel}$. Die spekulare Reflexion ist mit einem gelben Kasten markiert, das untersuchte Bragg-Sheet mit einem orangenen. **B** Spekulares Reflexionsprofil der untersuchten Probe. **C** Erhaltene Bragg-Sheet-Intensitäten und Simulation der Datenpunkte. **D** Erhaltene Bragg-Sheet-Breiten und Simulation der Datenpunkte. Die aus den Rohdaten extrahierten Daten sind stark verrauscht.

$Q_{\parallel} = \pm 0,66 \text{ \AA}^{-1}$, zu erkennen, jedoch sind diese in den Datenpunkten deutlich stärker ausgeprägt. Aufgrund der schlechten Datenqualität ist eine verlässlichere Simulation jedoch nicht möglich. Die so erhaltenen mechanischen Parameter der Probe, wie sie in Tabelle 9.2 zu sehen sind, liegen deutlich unterhalb derer der Messungen unter Luft. Dies entspricht den Erwartungen, da durch die Wasserzwichenschichten die Beweglichkeit der einzelnen Bilagen steigt, was mit einem Absenken des Kompressions-Moduls und der Biegesteifigkeit einher geht.

Die Flüssigkeit im Reservoir des Probenhalters wurde anschließend durch eine 3 mg/ml Lösung von PAH (58 kDa) ausgetauscht. Die erste anschließende Messung der Probe fand etwa drei Stunden danach statt. Anschließend fanden weitere Messung im Abstand von drei Stunden statt. Dies wurde wiederholt, bis keine relevanten Änderungen der spekularen Reflexion mehr beobachtet wurden, was als Kriterium

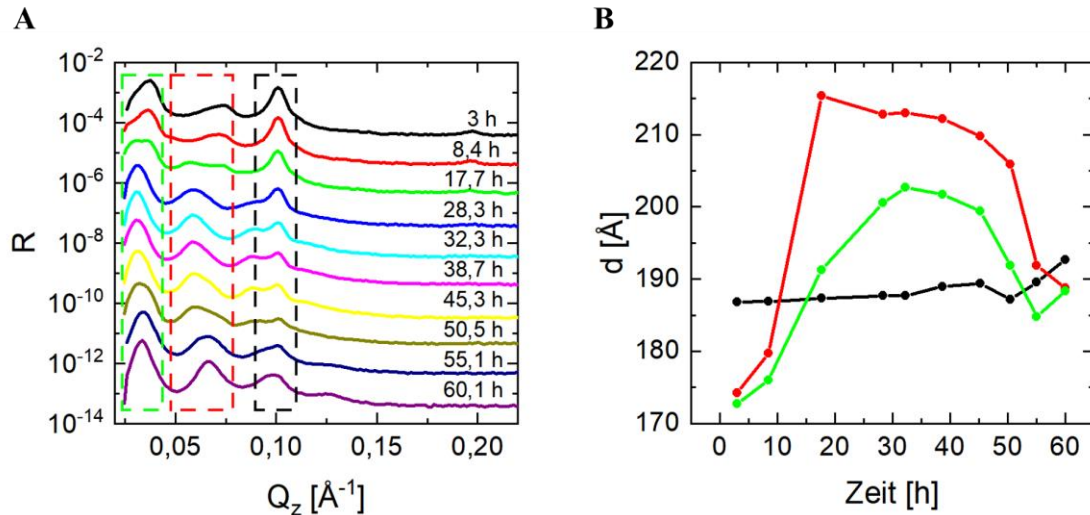


Abbildung 9.6: **A** Auftragung aller spekularen Messungen der DMPC-Multilagen unter PAH. Die drei Bereiche, in denen Bragg-Peaks gefunden wurden sind mit farbigen Kästen markiert. **B** Bilagenabstände der nach A bestimmten Peakpositionen unter der Annahme, dass es sich bei den mit gleicher Kastenfarbe umrandeten Peaks um dieselbe Bragg-Peak Ordnung handelt. Die Farben der Kurven entsprechen denen der Kästen in A.

für das Erreichen des Gleichgewichtszustands angesehen wurde. Die letzte Messung fand 60 h nach dem Einfüllen der Polyelektrolytlösung statt und zeigte, verglichen mit der vorherigen Messung, nur noch geringfügige Änderungen (siehe Abbildung 9.6 A). Zeigten die ersten Messungen noch Überreste des Bragg-Peaks zweiter Ordnung der Messung unter reinem D_2O bei $Q_z = 0,20 \text{ \AA}^{-1}$, waren später nur noch Peaks bei niedrigeren Streuvektoren zu erkennen. Die Position und damit die zugehörige Dicke der Wiederholeinheiten änderten sich über den betrachteten Zeitraum fortwährend, wie in Abbildung 9.6 B zu sehen ist. Hierbei fällt auf, dass die Bragg-Peaks erster und zweiter Ordnung (grüne und rote Linien) einen ähnlichen nichtmonotonen Verlauf beschrieben, der Peak erster Ordnung jedoch allgemein kleinere Bilagendicken suggerierte. Dahingegen zeigte der Peak dritter Ordnung (schwarze Linie) einen größtenteils monotonen Anstieg. Da nach 60 h eine gute Übereinstimmung der Dicke der Wiederholeinheiten für alle drei Peaks gegeben ist, ist davon auszugehen, dass es sich hier um die Bragg-Peaks der gequollenen Probe im Gleichgewichtszustand handelt. Das unterschiedliche Verhalten des Peaks dritter Ordnung ist durch eine Überlagerung mit dem Bragg-Peak erster Ordnung der Probe vor Einfluss des Polyelektrolyts zu erklären. Die Abnahme des Peaks der Spezies der vorherigen Umgebungsbedingungen und die gute Übereinstimmung der drei Peaks der gequollenen Probe lassen darauf schließen, dass diese zum Zeitpunkt der letzten Messungen nicht mehr signifikant vorhanden war. Bemerkenswert war hierbei auch die Zeitskala, auf der Änderungen beobachtet wurden. Während bei Experimenten mit DMPC-Oligobilagen in Kontakt mit PAH-Lösungen ein Gleichgewicht bereits nach wenigen Stunden erreicht werden konnte,^[14] benötigte dies in den hier präsentierten Experimenten an DMPC-Multilagen mehrere Tage. Es ist anzunehmen, dass die benötigte Zeit mit der Zahl der Bilagen allgemein stark zunimmt, was insbesondere hinsichtlich langsamerer Prozesse beachtet werden muss.

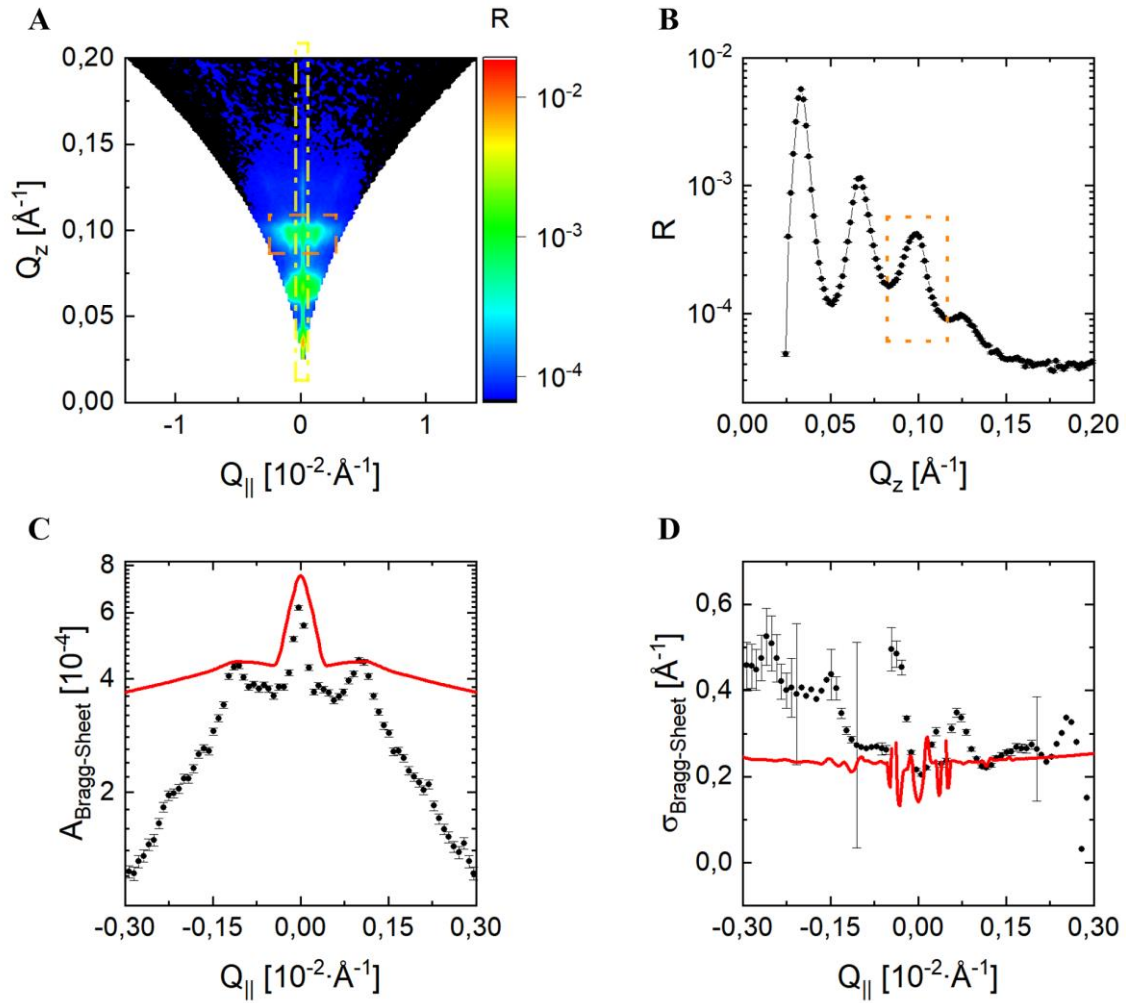


Abbildung 9.7: Auswertung der erhaltenen Daten aus der Messung von DMPC-Multilagen unter PAH (58 kDa) nach 60 h. Die Probe zeigt starkes Quellen. Aufgrund der nahe zusammenliegenden Bragg-Peaks ist eine verlässliche Auswertung nicht möglich. **A** Darstellung Q_z gegen $Q_{||}$. Die spekulare Reflexion ist mit einem gelben Kasten markiert, das untersuchte Bragg-Sheet mit einem orangenen. **B** Spekulares Reflexionsprofil der untersuchten Probe. **C** Erhaltene Bragg-Sheet-Intensitäten und Simulation der Datenpunkte. **D** Erhaltene Bragg-Sheet-Breiten und Simulation der Datenpunkte.

Die Evaluierung der Messung, welche 60 h nach Zugabe der Polyelektrolyt-Lösung gestartet wurde, fand anhand des Bragg-Sheets dritter Ordnung statt. Die Bragg-Peaks erster und zweiter Ordnung konnten hierbei nicht verwendet werden, da sie die in Abschnitt 9.2 genannten Voraussetzungen nicht erfüllten. Es war jedoch unklar, ob die Reflektivität des Peaks dritter Ordnung für die Auswertung nicht auch zu hoch war, da diese immerhin noch etwa 7% der Intensität des ersten Bragg-Peaks betrug. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser nicht weiterhin mit dem Bragg-Peak erster Ordnung von Überresten der nicht-gequollenen Probe überlagerte. Da jedoch der Peak vierter Ordnung für die Auswertung deutlich zu schwach war, blieb nur diese Möglichkeit übrig. Die Auswertung ist in Abbildung 9.7 dargestellt. Aufgrund der starken Quellung des Filmes und damit einhergehenden Lage des Bragg-Sheets in Q_z , konnten diese nur zwischen $Q_{||} = \pm 0,3 \text{ \AA}^{-1}$ aufgenommen werden (siehe Abbildung 9.7 A). Erneut wurden die Bragg-Sheet-Intensitäten nahe $Q_{||} = 0$ durch die Simulation

Tabelle 9.2: Erhaltene Bilagenabstände und mechanische Parameter der untersuchten Probe bei Interaktion mit PAH.

	Bilagendicke d [Å]	Cut-off Radius R [Å]	De Gennes- Parameter λ [Å]	Caillé- Parameter η	Kompress- ions- Modul B [MPa]	Biege- steifigkeit κ [$k_B T$]
50% RH	$54,1 \pm 1,0$	10000	9	0,012	19,7	21,6
95% RH	$53,9 \pm 0,2$	10000	10	0,012	18,1	24,2
D ₂ O	$62,6 \pm 1,2$	1000	20	0,18	0,44	2,75
3 mg/ml	193 ± 8	6500	20	0,075	0,11	2,18
PAH (58 kDa)						

überschätzt (siehe Abbildung 9.7 C). Um die lokalen Maxima bei $Q_{\parallel} = \pm 0,10 \text{ Å}^{-1}$ zu berücksichtigen war es nötig, R und λ gegenüber der Messung unter D₂O zu erhöhen, und gleichzeitig η zu verringern. Hierdurch konnte jedoch der zu sehende Abfall bei $|Q_{\parallel}| < 0,13 \text{ Å}^{-1}$ nicht mehr zufriedenstellend simuliert werden. Ebenso ließen sich die erhaltenen Bragg-Sheet-Breiten mithilfe des so eingeschränkten Parameterraums nicht simulieren. Während nahe $Q_{\parallel} = 0$ noch recht geringe Abweichungen der Simulation von den Messdaten zu sehen waren, zeigten insbesondere Werte im Bereich von $Q_{\parallel} < -0,13 \text{ Å}^{-1}$ deutliche Diskrepanzen.

Zusammen mit den bereits beschriebenen Problemen hinsichtlich des analysierten Bragg-Sheets müssen die hier erhaltenen Parameter somit kritisch betrachtet werden. Diese zeigen im Vergleich zur vorherigen Messung unter reinem D₂O eine Abnahme sowohl der Biegesteifigkeit als auch des Kompressions-Moduls. Somit konnten stabilisierenden Eigenschaften des Polyelektrolyts bei Einwirkung auf DMPC-Multilagen mithilfe von off-spekularer Streuung nicht nachgewiesen werden. Die erhaltenen Parameter sind zusammen denen der anderen untersuchten experimentellen Bedingungen in Tabelle 9.2 eingetragen.

9.3. Untersuchungen der mechanischen Parameter von DMPC-Multilagen unter Einfluss von HS

Zusätzlich zu den gezeigten Experimenten zur Untersuchung der Interaktionen von DMPC-Multilagen mit PAH sollten auch Einflüsse von HS auf die mechanischen Parameter eines ebensolchen Filmes untersucht werden. Da in vorherigen Experimenten an DMPC-Oligobilagen bereits beobachtet wurde, dass ein solches System mehrere Wochen bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes benötigt,^[205] wurden zwei wie in Abschnitt 9.1 beschrieben präparierte Proben bereits einige Zeit vor Beginn der Experimente in einer Lösung von 3 mg/ml HS (730 kDa) in D₂O inkubiert. Da die HS zum Zeitpunkt der Planung der Experimente nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand und sich die Lieferung stark verzögerte, konnte eine Inkubation erst etwa 12 Tage vor Beginn der ersten Messungen stattfinden. Die entsprechenden spekularen Reflexionen sind in Abbildung 2.4 zusammen mit der in Abschnitt 9.2 untersuchten Probe unter D₂O dargestellt. Hierbei war der Peak der nicht-gequollenen Probe noch deutlich vorhanden. Jedoch waren durch die Wechselwirkung mit HS neue Bragg-Peaks bei

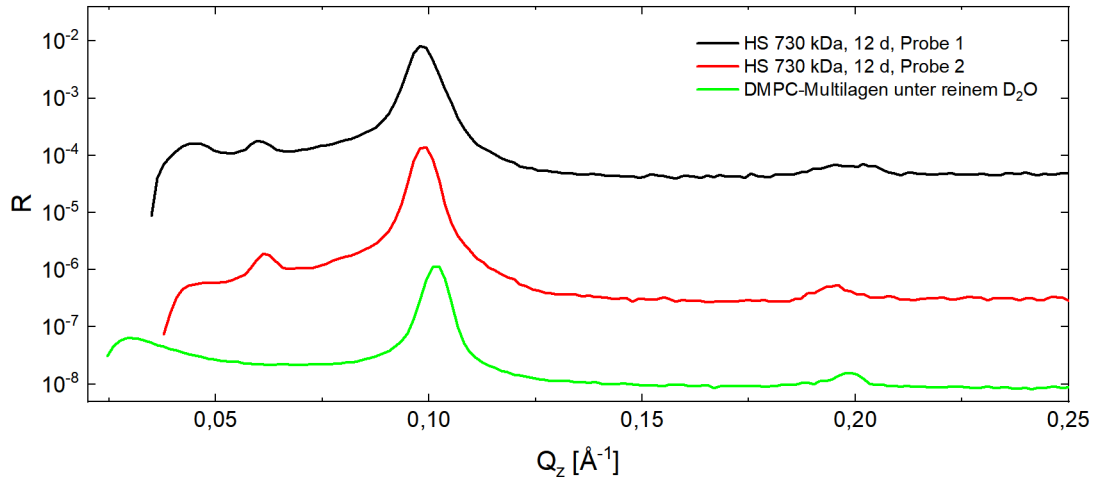


Abbildung 9.8: *Spekulare Reflexion der untersuchten Proben nach zwölf tägiger Inkubation mit HS. Zum Vergleich ist die spekulare Reflexion der in Abschnitt 9.2 beschriebenen Probe unter D₂O dargestellt.*

$Q_z \approx 0,06 \text{ \AA}^{-1}$ zu erkennen. Diese weisen auf die Koexistenz von gequollenen und nicht-gequollenen Teilen der Probe. Für eine detaillierte Auswertung des entsprechenden Bragg-Sheets lag der Peak jedoch bei einem zu kleinen Q_z . Es ist anzunehmen, dass mit weiterer Zeit die Peaks der nicht-gequollenen Spezies abgenommen und die der gequollenen Spezies zunehmend an Intensität gewonnen hätten.

9.4. Diskussion der Untersuchungen mechanischer Parameter an DMPC-Multilagen

Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente war es, mithilfe von off-spekularer Neutronenstreuung die mechanischen Parameter von DMPC-Multilagen zu bestimmen. Hierbei sollten insbesondere stabilisierende Eigenschaften des synthetischen Polyelektrolyts PAH und des natürlichen Polysaccharids HS auf die Lipide untersucht werden. Für beide Polymere wurde in vorherigen Experimenten ein stabilisierender Effekt auf DMPC-Oligobilagen gegenüber Scherkräften nachgewiesen. Es wurde vermutet, dass dies auf Verkettungen der einzelnen Bilagen über eingelagerte Polymere zurückzuführen ist.^[205-206] Im Falle der HS wurden mehrere Wochen zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes benötigt, wohingegen bei Verwendung von PAH nur wenige Stunden vonnöten waren. Dennoch konnten in Scherexperimenten vergleichbare stabilisierende Eigenschaften nachgewiesen werden. Somit ist PAH als Ersatzstoff für die Untersuchung dieser Effekte geeignet. Alternativ zur direkten Untersuchung durch mechanische Belastung der Proben können mithilfe der off-spekularen Neutronenstreuung die durch Rauigkeiten und Fluktuationen der Wiederholeinheiten entstehenden Bragg-Sheets untersucht werden. Anhand derer Entwicklung in $Q_{||}$, der Streuvektorkomponente parallel zur Probenoberfläche, kann das Kompressions-Modul und die Biegesteifigkeit der Probe, also die vertikale und laterale Beweglichkeit der DMPC-Bilagen, evaluiert werden. Die erhaltenen Werte und zugehörige Modellvorstellungen der Probe sind in Abbildung 9.9 dargestellt und werden im Folgenden diskutiert.

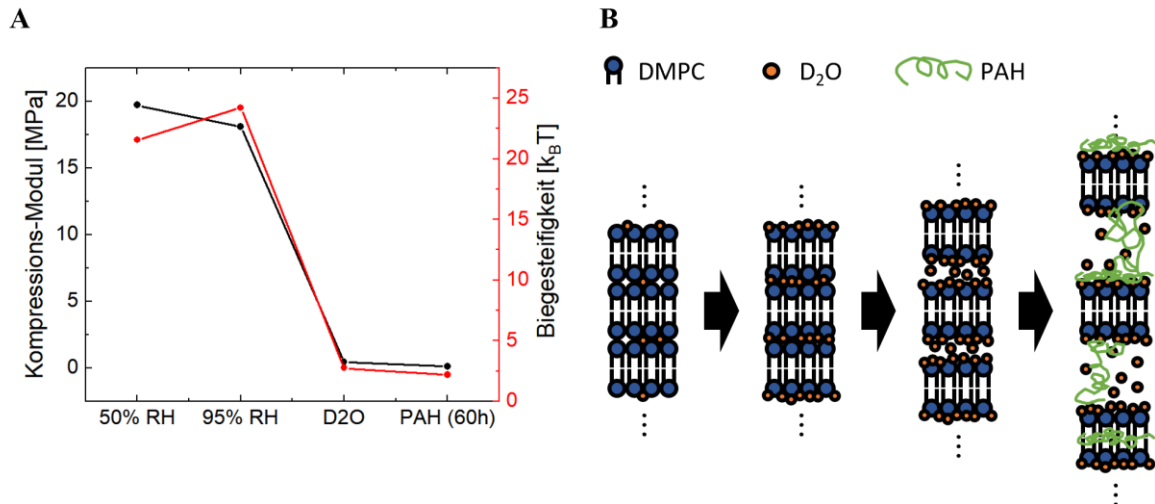


Abbildung 9.9: **A** Auftragung der mechanischen Parameter der in Abschnitt 9.2 untersuchten Probe unter unterschiedlichen Bedingungen. **B** Zugehörige Modellvorstellungen zu den experimentellen Bedingungen. Durch erhöhte RH sind die DMPC-Kopfgruppen stärker hydratisiert, unter D₂O kommt es zur Ausbildung von Wasserzwichenschichten. Die Zugabe von PAH führt zu einem weiteren Quellen des Filmes, wobei sich die Polyelektrolyte an die Bilagen anlagern, in die Kettenschichten einlagern sowie sich in den Zwischenräumen aufhalten.^[209]

Um einen besseren Eindruck über die Einflüsse der verschiedenen experimentellen Bedingungen zu erhalten, wurde eine Proben zunächst unter niedriger und hoher Luftfeuchtigkeit untersucht. Biegesteifigkeit und Kompression-Modul waren in der Größenordnung, wie sie von Schenk *et al.* für Glykolipid-Multilagen unter hoher Luftfeuchtigkeit berichtet wurden.^[44] Diese sind bedeutend größer, als die berichteten Werte für äquivalente Proben unter D₂O, was für eine geringe Beweglichkeit der einzelnen Bilagen in lateraler beziehungsweise vertikaler Richtung spricht.^[44, 48] Die durch erhöhte Luftfeuchtigkeit anzunehmende stärkere Hydratisierung der Lipide hatte nur einen geringen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften. Die spekulare Reflexion der Probe zeigte jedoch einen starken Einfluss durch die geänderten experimentellen Bedingungen. Hier wurden bei 95% RH Anzeichen von mehreren simultan existenten Probenbereichen mit unterschiedlichen Bilagenabständen gefunden.

Durch die Zugabe von reinem D₂O zum Flüssigkeitsreservoir der Probenhalterung wurden starke Einflüsse auf die Reflektivität der Probe sowie deren mechanischen Parameter beobachtet. Die Bragg-Sheets waren verglichen mit den vorherigen Messungen zu kleineren Q_z verschoben, was die Quellung des Multilagensystems durch Ausbildung von Wasserzwichenschichten zeigt. Im Vergleich zu den vorherigen Messungen war die Intensität des zweiten Bragg-Sheets sehr gering, was wahrscheinlich auf eine Kombination von teilweisem Lagenverlust und Effekten der Peak-Unterdrückung zurückzuführen war. Bragg-Sheets höherer Ordnung waren nicht zu erkennen. Somit war auch die Auswertung der Messung in Hinsicht auf die mechanischen Eigenschaften schwierig, da die Auswertung der Sheet-Breiten stark streuende Werte lieferte. Die Simulation wurde deshalb hauptsächlich unter Berücksichtigung der Sheet-Intensitäten durchgeführt, wobei die nach Simulation erhaltenen Verläufe zumindest auch einige Charakteristiken der Sheet-Breiten abbilden konnte. Somit sind die erhaltenen mechanischen Parameter kritisch zu betrachten. Diese zeigten eine deutliche Abnahme verglichen zu den vorherigen Messungen in gasförmiger D₂O-Umgebung. Dies weist auf eine deutlich verbesserte

Beweglichkeit der Bilagen hin. Da diese unter diesen Bedingungen nicht mehr im direkten Kontakt stehen und somit nur noch schwach interagieren, erscheint diese Erkenntnis plausibel. Eine vergleichbare Abnahme der Parameter durch Bulk-D₂O wurde von Schenk *et al.* bei der Untersuchung von Glykolipid-Multilagen beobachtet.^[44]

Die anschließende Zugabe von PAH führte zu einem starken Quellen der Probe. Dies wurde bereits in vorherigen Experimenten beobachtet, jedoch benötigte das Multilagensystem deutlich länger bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustandes. Es ist anzunehmen, dass die hierfür benötigte Zeit mit der Zahl an vorhandenen Bilagen steigt. Die spekulare Reflexion zeigte vor allem in frühen Messungen eine Mischung des durch PAH gequollenen Filmes und des Filmes unter D₂O. Dies erwies sich als problematisch, da das einzige zur Auswertung geeignete Bragg-Sheet so mit einer der vorherigen experimentellen Bedingungen überlagerte. Nach 60 h war das entsprechende Sheet jedoch nicht mehr zu erkennen, wohingegen vier Ordnungen der Bragg-Sheets durch Einwirkung von PAH zu erkennen waren. Eine zufriedenstellende Simulation der Intensitäten und Breiten des gewählten Sheets war dennoch nicht möglich. Während die Simulation ersterer allgemein zu große Werte zeigte, zeigte die Simulation der Sheet-Breiten wenig Ähnlichkeit zur den gemessenen Datenpunkten. Es wurde dennoch versucht, über vorsichtige Wahl der im Auswertungsprogramm zur Verfügung stehenden Parameter die Abweichungen so gering wie möglich zu halten, um eine Aussage über die mechanischen Parameter treffen zu können. Diese waren verglichen mit den aus der Messung unter reinem D₂O erhaltenen Parametern etwas verringert, was auf eine höhere Beweglichkeit schließen lässt. Der entstandene Unterschied ist jedoch angesichts der starken Quellung der Probe erstaunlich gering. Dies könnte ein Hinweis auf Verkettungen der Bilagen durch PAH-Moleküle sein. Eine fundierte Aussage ist jedoch aufgrund der begrenzten Qualität der zugrundeliegenden Auswertungen nicht möglich.

Zur Untersuchung der Einflüsse von HS auf DMPC-Multilagen wurden entsprechende Proben etwa zwölf Tage vor den Messungen in einer Lösung des Polysaccharids in D₂O inkubiert. Eine längere Inkubation war aufgrund von Lieferschwierigkeiten der HS nicht möglich. Die Messungen zeigten zwar ein teilweises Quellen der Probe, jedoch entsprach der Großteil der erhaltenen Reflektivität dem Verhalten einer Probe unter reinem D₂O. Die beobachteten Bragg-Sheets der gequollenen Spezies lagen außerdem bei sehr kleinen Q_z weshalb nur ein sehr kleiner Bereich von $Q_{||}$ gemessen wurde. Somit konnte zwar die Interaktion des Polysaccharids mit dem Multilagensystem nachgewiesen werden, eine detaillierte Auswertung war jedoch nicht möglich. Es ist denkbar, dass durch eine längere Inkubation der Proben bessere Ergebnisse erzielt werden können. In Anbetracht der deutlich gestiegenen Zeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts bei der Interaktion von DMPC-Multilagen mit PAH ist anzunehmen, dass auch für die Interaktion von HS deutlich mehr Zeit benötigt wird als in den vorherigen Experimenten mit Oligobilagen.

Das Ziel, stabilisierende Eigenschaften von DMPC-Multilagen unter Einwirkung von PAH und HS mithilfe von off-spekularer Neutronenreflexion zu untersuchen konnte nicht erreicht werden. Zwar waren die erhaltenen mechanischen Parameter konsistent mit den Modellvorstellungen der Proben unter den verschiedenen Bedingungen, die der Auswertung zugrundeliegenden Simulationen waren jedoch gerade unter Flüssigkeiten kritisch. Somit waren auch die erhaltenen Parameter wenig verlässlich. Da für die Simulation der Bragg-Sheets deren Intensitäten und Breiten benötigt werden, ist für zukünftige Untersuchungen dafür Sorge zu tragen, dass die erhaltenen Werte möglichst wenig Rauschen zeigen.

9. Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von DMPC-Multilagen mit off-spekularer Neutronenstreuung

Hierfür ist vor allem eine gute Qualität der Messung vonnöten, was zum Beispiel durch eine längere Aufnahme der einzelnen Datenpunkte erreicht werden könnte. Auch die Präparation von Proben mit einer größeren Zahl an Lipid-Bilagen könnten die Datenqualität verbessern. Somit wäre für zukünftige Untersuchungen eventuell auch die Auswertung der bei der Interaktion von HS mit dem Multilagensystem beobachteten Bragg-Sheets möglich. Die Präparation von dickeren Proben würde jedoch wahrscheinlich auch die benötigte Zeit zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes erhöhen. Gerade bei der Interaktion mit HS wäre dies problematisch, da hierfür wahrscheinlich bereits für Proben, wie sie in den hier beschriebenen Experimenten verwendet wurden, einige Monate Inkubationszeit benötigt werden, um brauchbare Ergebnisse zu erzielen.

10. Zusammenfassung und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zwei kombinierte Messaufbauten für simultane Untersuchungen mittels NR, ATR-FTIR-Spektroskopie und SE zu entwickeln. Diese Messtechniken finden breite Anwendung in der Untersuchung weicher Materie, haben jedoch ihre individuellen Vor- und Nachteile. So erlaubt zum Beispiel NR die Untersuchung des inneren Aufbaus von Proben, sowie ihrer chemischen Zusammensetzung, jedoch ist die Auswertung komplex und die dafür verwendeten Modelle häufig nicht eindeutig. NR, ATR-FTIR-Spektroskopie und SE können jedoch komplementär genutzt werden, um ihre jeweiligen Stärken zu kombinieren, wodurch detaillierte Aussagen über die untersuchten Proben getroffen werden können. Insbesondere die parallele Nutzung ist hierbei von Interesse, da so mögliche Unterschiede, welche bei gleich präparierten aber separat gemessenen Proben auftreten können, vermieden werden. Die Eignung der Messmethoden für *in situ* Studien in wässriger Umgebung ermöglicht ferner Untersuchungen unter biologisch relevanten Bedingungen.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die zentralen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefasst. Hierbei wird zunächst die Entwicklung der kombinierten Messaufbauten beschrieben, wie sie in Kapitel 4 zu sehen ist. Auch werden in diesem Abschnitt die Pilotexperimente rekapituliert, welche in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Aufbauten durchgeführt wurden. Anschließend werden wichtige Erkenntnisse der in Kapitel 5 beschriebenen Untersuchungen zur Interaktion von AuNPs mit Lipid-Oligobilagen zusammengefasst. Der nächste Abschnitt beschreibt dann die Erkenntnisse aus den in den Kapiteln 6 bis 8 beschriebenen Untersuchungen an biomimetischen Membranen mit Membranproteinen. Zuletzt werden auch die in Kapitel 9 präsentierten Untersuchungen zu den mechanischen Eigenschaften von Lipid-Multilagen dargestellt.

10.1. Entwicklung kombinierter Messapparaturen

Die kombinierten Messaufbauten sollten für zwei verschiedene Neutronenreflektometer des ILL konzipiert werden, sodass sowohl die Untersuchung von horizontalen als auch vertikalen Probenorientierungen ermöglicht wird. Es war keine feste Installation an den Reflektometern vorgesehen, stattdessen sollte es sich bei den Aufbauten um mobile Aufsätze auf deren Probentischen handeln. So sollte gewährleistet werden, dass die Messapparaturen an verschiedenen Reflektometern genutzt und flexibel an unterschiedliche experimentelle Erfordernisse angepasst werden können. Weiter können solche Aufbauten anderen interessierten Forschungsgruppen zur Verfügung gestellt werden, die so von den Vorteilen der parallelen Charakterisierung ihrer Proben durch die komplementären Messtechniken profitieren können.

Für erste Tests eines Prototyp-Systems für den Aufbau in horizontaler Probenorientierung wurde das IR-Spektrometer, dessen Detektor sowie die Strahlführung und Probenhalter zu Anpassungszwecken auf einer Holzplatte montiert und am Reflektometer FIGARO des ILL installiert. Hierbei wurde festgestellt, dass bei den für NR typischen Verkipnungen des Probentisches keine signifikanten Einflüsse auf die IR-Spektren auftreten und der vorhandene Platz am Instrument für den geplanten Aufbau ausreichend war. Somit wurde sichergestellt, dass in den anschließenden Entwicklungsstadien der Aufbauten keine vermeidbaren Probleme auftraten.

Aufbauend auf den durch das Prototyp-System gewonnenen Erkenntnissen wurde ein Aufbau für NR und ATR-FTIR-Spektroskopie erstellt, bei welchem die für die IR-Spektroskopie nötigen Komponenten auf einer modularen Aluminium-Plattform montiert waren. Es wurden Änderungen am Strahlengang vorgenommen, welche dessen mechanische Stabilität verbesserten und außerdem die Möglichkeit eröffneten, diesen mit Trockengas zu spülen, um atmosphärische Absorptionsbanden zu minimieren. In Pilotexperimenten wurde die Interaktion von AuNPs mit Chol-haltigen DMPC-Oligobilagen untersucht. Hierbei wurde das Quellverhalten und der teilweise Abbau der Probe übereinstimmend mit NR und ATR-FTIR-Spektroskopie zu beobachten. Die Experimente zeigten jedoch auch grundlegende Probleme des Aufbaus auf, welche Anlass für weitere Verbesserungen gaben.

So war der Verbrauch an Trockengas sehr hoch, weshalb bei der Spülung mit Stickstoff aus einer Gasflasche diese mindestens einmal täglich gewechselt werden musste, wobei der Spülvorgang unterbrochen wurde. Ebenso gestaltete sich der Probenwechsel aufgrund der Schlauchanordnung und -führung als problematisch und führte darüber hinaus zum Auftreten von Störsignalen in den IR-Spektren. Weiter war zu diesem Zeitpunkt die Möglichkeit der parallelen Nutzung von SE noch nicht gegeben. Die Entwicklung der dafür nötigen Probenzelle sowie die Integration des Ellipsometers in die Messapparatur waren Aufgabe der Kooperationspartner um Thomas Ederth (Universität Linköping, Schweden) und zu diesem Zeitpunkt noch in Entwicklung.

Basierend auf den vorhergehenden Erkenntnissen wurde der finale Aufbau für horizontale Probenorientierungen entwickelt. Hierfür wurde die Grundplatte des Aufbaus mit einem Wasserverteiler ausgestattet, welcher die Probenzellen per Schnellverbinder mit Kühlwasser versorgte und somit die Zahl der festen Schlauchanschlüsse an diesen halbierte. Auch wurden Änderungen an den Teilen der IR-Strahlführung vorgenommen, welche für die Reflexion des Strahls aus der Detektor-Ebene hin zur Probe sorgten, sodass zusammen mit den zuvor genannten Änderungen der Kühlwasserzufuhr der Probenwechsel erheblich vereinfacht wurde und außerdem die Stabilität der Strahlführung erhöht wurde. Da zu diesem Zeitpunkt die Dimensionen des Ellipsometers und der Probenzelle bekannt waren, konnten diese bereits in die Planung mit einbezogen werden. Hierfür wurden die IR-Komponenten höher gesetzt und der Probentisch des Aufbaus mit einer Adapterplatte für den SE-Aufsatz ausgestattet.

In Pilotexperimenten mit dem finalen Aufbau wurde die Zerstörung von DMPC-Oligobilagen durch AuNPs untersucht. Die verwendeten NPs waren dabei deutlich größer als solche, die an anderen Stellen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, was zu einer deutlich abweichenden Interaktion mit den Lipidfilmen verglichen mit kleinen Partikeln führte. Die Abbauprozesse wurden in kinetischen Messungen untersucht, wobei die Ergebnisse der drei Messtechniken unterhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipide in guter Näherung übereinstimmende Ergebnisse lieferten. Oberhalb der Phasenübergangstemperatur waren dagegen Abweichungen zu erkennen, insbesondere SE zeigte hier einen bedeutend schnelleren Abbau der Probe. Dies wurde dem geringen Unterschied der Brechungsindizes von Probe und Flüssigphase zugeschrieben, was die Verlässlichkeit der Auswertung der SE-Daten einschränkt. Zum Zeitpunkt der Experimente stand außerdem eine fest installierte Stickstoffzufuhr am Reflektometer zur Verfügung, die von einem Flüssigstickstoff-Reservoir abgezweigt wurde und eine kontinuierliche Spülung des Strahlengangs mit Trockengas ermöglichte. Die komplementären Messtechniken zeigten insgesamt vergleichbare Ergebnisse und demonstrierten die Möglichkeit, durch den Vergleich miteinander die Interpretation der einzelnen Datensätze zu verfeinern.

Der Aufbau für vertikale Probenorientierungen war für das Reflektometer D17 des ILL vorgesehen. Mithilfe der Vorkenntnisse des Aufbaus für horizontale Probenorientierungen konnte ohne Konstruktion von Prototypen eine vollständige Plattform für NR, ATR-FTIR-Spektroskopie und SE entworfen werden, in welcher IR-Spektrometer, Probenhalterung und IR-Detektor auf separaten Ebenen platziert waren. Diese Konstruktion bedurfte nur minimaler Anpassungen vor Ort. Aufgrund des Gewichts des Ellipsometers war die verwendete Hebebühne einem großen seitlichen Drehmoment ausgesetzt, weshalb diese gegen einen Aluminiumblock ausgetauscht wurde. Aufgrund sehr guter Reproduzierbarkeit der Probenposition durch die verwendeten Adapter- und Magnetplatten der Probenhalterung war die so eingebüßte Justage der Probenposition jedoch vertretbar.

In den Pilotexperimenten zum Aufbau für vertikale Probenpositionen wurde die Interaktion von AuNPs verschiedener Größen sowie Mg^{2+} -Ionen mit proteinhaltigen Lipid-Oligobilagen untersucht. Hierbei erwies sich die Länge des Strahlengangs als problematisch für dessen Spülung mit Trockengas. Während in den Experimenten zunächst gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus den drei verwendeten Messtechniken beobachtet wurde, waren im weiteren Verlauf bei starker Quellung der Proben erhebliche Abweichungen von SE zu den komplementären Messtechniken zu erkennen. Dies wurde erneut dem schlechten Kontrast zwischen Probe und Flüssigphase zugeordnet. Darüber hinaus konnte der Aufbau ebenso auf den Probentisch des Reflektometers SuperADAM des ILL installiert und erfolgreich betrieben werden. Dies benötigte minimale Anpassungen der Grundplatte und ermöglicht die Nutzung der charakteristischen Vorteile des Instruments gegenüber anderen Reflektometern.

Das Ziel der Konstruktion zweier Messaufbauten für die kombinierte NR, ATR-FTIR-Spektroskopie und SE war somit erreicht. Es handelt sich um die ersten Messaufbauten weltweit, die die gleichzeitige Probencharakterisierung mit den obigen Untersuchungsmethoden ermöglichen. Die Pilotexperimente demonstrierten den Nutzen komplementärer Messtechniken zur besseren Interpretation der erhaltenen Ergebnisse. Weitere Verbesserungen des Aufbaus könnten über eine Reduktion des Volumens der IR-Strahlführung durch eine Verkleinerung deren Durchmessers erreicht werden. Somit würde die Spülung mit Trockengas verbessert werden, was die Analyse von Absorptionsbanden, welche mit denen atmosphärischer Gase überlagern, ermöglicht. Insbesondere hinsichtlich der Untersuchung von Proteinstrukturen wäre eine genaue Analyse der Amid-I Bande vorteilhaft, welche allerdings mit Rotationsschwingungsbanden von H_2O überlagert.

Eine Verkleinerung des Strahlengang-Durchmessers würde jedoch auch mit einem Verlust an IR-Strahlintensität einhergehen, was zu einer längeren benötigten Messdauer zum Erreichen eines guten Signal-zu-Rausch Verhältnisses führen würde. Dies wäre jedoch für die meisten in der vorliegenden Arbeit untersuchten Prozesse vertretbar. Lediglich kinetische Messungen mit hoher zeitlicher Auflösung wären möglicherweise erschwert. Weiter müsste beachtet werden, dass eine Verkleinerung des Durchmessers zu ungewollten Kollisionen des Strahls mit den Innenwänden der zur Strahlführung genutzten Tuben führen und somit verfälschten Spektrum führen kann. Es wäre somit wichtig, auch den Strahldurchmesser zu reduzieren, um solche Störungen zu vermeiden.

Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion des zu spülenden Volumens wäre eine Verkürzung des Strahlengangs. Im Falle des Aufbaus für horizontale Probenpositionen wäre eine deutliche Verkürzung des Strahlengangs möglich, indem der IR-Strahl die Probenposition von der Spektrometer- anstelle der Detektorseite erreichen würde. Die für den beschriebenen Aufbau verwendete Strahlführung und der

darin enthaltene Zusatzweg stammte aus der Konstruktion des ersten Prototypen. Hierin war eine Teleskopapparatur zu Beginn des Strahlengangs enthalten, was sich später als nachteilig herausstellte. Zwar wurde diese entfernt, die allgemeine Form des Strahlengangs jedoch beibehalten. Somit könnte die Länge des Strahlengangs für zukünftige Arbeiten verringert werden.

Für den Aufbau für vertikale Probenpositionen wäre eine Verkürzung des Strahlengangs durch Erhöhung der Position des Spektrometers möglich. Hierbei müsste dafür Sorge getragen werden, dass es zu keinerlei Kollision mit Bauteilen des Reflektometers kommt. Eine Verkürzung des Strahlengangs hätte für beide Aufbauten höchstwahrscheinlich keine negativen Nebenerscheinungen, jedoch wäre die Reduktion des gespülten Volumens für den Aufbau für vertikale Probenpositionen verglichen mit der zuvor genannten Methode eher gering. Es sollte zusätzlich dafür Sorge getragen werden, dass die Spülung des Aufbaus mit Trockengas bereits einige Zeit vor Beginn der Messungen startet, um so atmosphärische Gase aus dem Strahlengang und den Gehäusen von Spektrometer und Detektor bestmöglich zu verdrängen.

Das beobachtete Problem der Störsignale in den IR-Spektren nach Probenwechsel ist schwierig zu beheben. Solange Untersuchungen entsprechend planbar sind, sollte auf den Probenwechsel zwischen einzelnen Messserien verzichtet werden. Da die beobachteten Signale aufgrund stehender Wellen durch Reflexionen an den einzelnen optischen Elementen zustande kommen, könnte auch der Einsatz von fokussierenden Optiken Verbesserungen mit sich bringen, was die Justage jedoch erheblich komplexer machen würde. Aktuell sind sie Aufbauten somit besonders für Untersuchungen geeignet, welche ohne Probenwechsel auskommen, wie zum Beispiel kinetische Prozesse.

10.2. Interaktionen von Gold-Nanopartikeln mit Lipid-Oligobilagen

Die in den kombinierten Aufbauten verwendeten Messtechniken wurden verwendet, um biomimetische Membranen und deren Interaktion mit AuNPs zu untersuchen. Untersuchungen an diesen fanden sowohl mit den kombinierten Messaufbauten als auch mit separaten Messungen mittels NR, XRR, ATR-FTIR-Spektroskopie und SE am HZB, dem KIT und in den Laboren in der Arbeitsgruppe Dahint in Heidelberg statt. Für die Verwendung von ATR-FTIR-Spektroskopie ohne gleichzeitige Nutzung komplementärer Messtechniken wurde die Plattform und Strahlführung des kombinierten Messaufbaus für horizontale Probenorientierungen verwendet.

Es wurden Membranen verschiedener Komplexität untersucht. Erste Voruntersuchungen von DMPC-Oligobilagen zeigten gute Übereinstimmung der gemessenen Probeneigenschaften mit Literaturwerten. Mithilfe von NR und ATR-FTIR wurde eine Interaktion von AuNPs und MgCl_2^{2+} mit hydratisierten Oligobilagen nachgewiesen, was jeweils mit einer teilweisen Zerstörung der Lipid-Probe, aber auch mit einem Quellprozess einherging. Zusätzlich war mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie eine Änderung der Lipid-Struktur anhand der Lage der CH_2 -Valenzschwingungsbande durch Interaktion mit AuNPs nachzuweisen, welche aus den NR-Messungen nicht hervorging. Aufgrund der separaten Untersuchung zweier verschiedener Proben kann es jedoch sein, dass die Abweichungen aufgrund von Probe-zu-Probe Unterschieden zustande kamen. Ebenso könnte das Alter der verwendeten AuNPs die Ergebnisse beeinflusst haben.

Die strukturellen Einflüsse eingelagerten Chols in den DMPC-Oligobilagen wurden in Voruntersuchungen bestimmt und entsprachen den nach der Literatur zu erwartenden Effekten. Auch bei diesen Proben konnte eine Interaktion von AuNPs und MgCl_2 auf die Oligobilagen nachgewiesen werden. Die Effekte waren hierbei jedoch schwächer als bei reinen DMPC-Proben, was auf stabilisierende Einflüsse des eingelagerten Sterols schließen lässt. Hier zeigten sich trotz simultaner Messungen Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus NR und ATR-FTIR-Spektroskopie. IR-Spektren zeigten deutlich geringere Einflüsse der AuNPs auf die CH_2 -Valenzschwingungsbanden als dies aus den Ergebnissen der NR-Messungen zu erwarten gewesen wäre. Es wird vermutet, dass die Abschwächung der CH_2 -Valenzschwingungsbanden durch Quellen und Abtragen der Probe zumindest teilweise durch angelagerte AuNPs und deren oberflächenadsorbierte Tenside kompensiert wird. Darüber hinaus wurden spektrale Abweichungen aufgrund der Probenwechsel zwischen den einzelnen Messungen vermutet. Neben der Stabilität gegen AuNPs und MgCl_2 war auch die allgemeine Stabilität der aufgetragenen Proben erhöht, weshalb diese seltener als reine DMPC-Oligobilagen beim Befüllen der Probenzelle mit Flüssigkeit zerstört wurden. Insbesondere aufgrund der begrenzten Messzeiten an Neutronenreflektometern ist dies eine wünschenswerte Eigenschaft.

10.3. Untersuchungen an Lipidfilmen mit Membranproteinen

Die biomimetischen Membranen wurden in den nächsten Schritten um typische Membranproteine erweitert. Als integrales Protein wurde dabei beispielhaft GramD verwendet, welches in die DMPC-Oligobilagen eingebracht wurde. Hierbei wurden sowohl Proben ohne als auch mit Chol verwendet. Die Amid-Banden des Proteins konnten mithilfe von ATR-FTIR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Änderungen der Sekundärstruktur des Proteins sollten sich in einer Änderung der Amid-I-Bandenform bemerkbar machen. Chol-freie Proben zeigten mit ATR-FTIR-Spektroskopie zwar eine Interaktion mit AuNPs, jedoch war dies ähnlich wie bei der Untersuchung proteinfreier Oligobilagen allein ein Quellen und wahrscheinlich teilweises Abtragen der Probe, wohingegen keine signifikante Änderung der Amid-I-Bandenstruktur beobachtet wurde. Proben, welche zusätzlich Chol enthielten und sowohl mit NR als auch ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht wurden, zeigten dahingegen keine signifikanten Einflüsse durch AuNPs und ein verringertes Quellverhalten durch MgCl_2 . Letzteres war auch bei einer rudimentären Untersuchung von Chol-freien proteinhaltigen Oligobilagen mit NR zu beobachten, weshalb davon vermutet wurde, dass GramD die Affinität der Lipid-Kopfgruppen zur Anlagerung von Mg^{2+} -Ionen verringert und somit weniger Coulomb-Repulsion zwischen den Bilagen auftritt. Weiter wurde isoliertes GramD auf hydrophoben Si-Substraten mit ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht. Auch hier wurde kein Einfluss der AuNPs auf die Proteinstruktur festgestellt. Ebenso zeigte dieses beachtliche Stabilität gegen erhöhte Temperaturen. Bis zu einer final gemessenen Temperatur von 55 °C konnten keinerlei Einflüsse auf die Amid-I-Bande nachgewiesen werden, was für eine außergewöhnliche Stabilität der Sekundärstruktur spricht.

Die Untersuchungen von GramD-haltigen Lipid-Oligobilagen zeigten somit eine insgesamt geringere Interaktion sowohl mit Fremdsalzen als auch AuNPs, was für eine Stabilisierung der Filme durch die Einbettung der Proteine spricht. Diese wiederum zeigten eine große Stabilität sowohl gegenüber der zugegebenen NPs und Salzlösung als auch Hitze. Eine Änderung der Amid-I-Bandenstruktur, welche

wiederum auf eine Änderung der Sekundärstruktur des Proteins hinweisen würde, konnte in keinem Fall beobachtet werden. Für weitere Untersuchungen an Lipid-Oligobilagen mit GramD sollten Interaktionen mit AuNPs an bereits durch Salzlösung gequollenen Proben stattfinden. Dies könnte es den NPs erlauben, sich auch zwischen tieferliegenden Bilagen einzulagern und somit die beobachteten Interaktionen verstärken. Da die antibiotischen Eigenschaften von GramD auf dessen Fähigkeit basieren als Ionenkanal für monovalente Ionen zu agieren, könnte die Verwendung entsprechender Salze möglicherweise stärkere Quelleffekte auslösen, als es durch die für die vorliegende Arbeit verwendeten Mg^{2+} -Ionen der Fall war. Jedoch ist die Affinität der DMPC-Kopfgruppen für diese Ionen insgesamt geringer, weshalb die Effekte gegenläufig sein könnten. Für die allgemeine Untersuchung integraler Proteine in biomimetischen Membranen wäre auch die Verwendung anderer Membranproteine interessant. Deren Isolierung ohne Verlust der nativen Struktur ist jedoch aufwändig, sodass für die vorliegende Arbeit keine Alternative gefunden wurde, welche in ausreichender Menge erhältlich gewesen wäre.

Zur Untersuchung von Membranmodellen mit peripheren Proteinen wurden Lipid-Oligobilagen Lösungen von CytC ausgesetzt welches an diesen adsorbieren sollte. Reine DMPC-Proben zeigten keine Anlagerung des Proteins. Gemischte Proben mit anionischem DMPG, das eine Anlagerung von CytC fördern sollte, waren nur bei sehr kleinen Anteilen des letztgenannten Lipids und hohem Chol-Gehalt stabil gegen Flüssigphasen, so dass Oligobilagen für diese Untersuchungen nicht verwendet werden konnten. In durch Vesikelfusion präparierten Bilagen konnte jedoch ein höherer Anteil geladener Lipide und damit eine Anlagerung des Proteins erreicht werden. Durch Verdünnung der Flüssigphase konnte eine teilweise Reversibilität der Anlagerung beobachtet werden. Bei Zugabe von AuNPs konnte jedoch keine Interaktion des Proteins mit diesen festgestellt werden, was jedoch möglicherweise der geringen Probendicke und entsprechend schwachen Absorptionsbanden in ATR-FTIR-Spektroskopie geschuldet war. Für weitere Untersuchungen mit CytC wäre ein größerer Anteil an geladenen Lipiden eine Möglichkeit die Bandenintensitäten des Proteins zu verstärken, da so eine größere Anlagerung und damit intensivere Absorptionsbanden zu erwarten wären. Eventuelle Interaktionen mit NPs wären somit ebenso deutlicher sichtbar. Auch die Anlagerung isolierter Proteine auf Si-Substraten mit hydrophober Oberfläche konnte demonstriert werden. Die Bandenintensitäten waren hierbei jedoch noch schwächer als bei geladenen Bilagen. Außerdem zeigten die IR-Spektren nach Verdünnen der Flüssigphase Absorptionsbanden unbekannten Ursprungs. Diese Methode der Probenpräparation ist somit für die Untersuchung peripherer Membranproteine weniger gut geeignet.

Die Interaktion von AuNPs mit biomimetischen Membranen unterschiedlicher Komplexität wurde anhand mehrerer Untersuchungen demonstriert. Dabei konnten sowohl strukturelle Einflüsse der Partikel als auch verwendeter Salzlösung nachgewiesen werden. Die Verwendung in die Membranen integrierten Chols und des integralen Proteins GramD zeigte dabei stabilisierende Effekte. Eine Untersuchung von Membranen mit einem peripheren Protein war bei Verwendung von Oligobilagen nicht möglich, jedoch konnten die Proteine bei Verwendung von aus Vesikelfusion präparierten Lipid-Bilagen mit einem größeren Anteil geladener Lipide nachgewiesen werden. Die verwendeten NPs zeigten jedoch keine Einflüsse auf die Amid-I-Banden und damit die Sekundärstruktur von GramD oder CytC.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Untersuchungen zu erreichen, sollten möglichst ähnliche AuNPs verwendet werden. Deren physikochemischen Eigenschaften werden durch ihre Größe und adsorbierte Tenside beeinflusst, weshalb verschiedene Ansätze der Partikel zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Da die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse jedoch über einen langen Zeitraum entstanden und die Synthese der Partikeln in späteren Stadien der Arbeit größere Probleme bereitete, war dies nicht möglich. Die Hintergründe der missglückten Synthesen konnte nicht geklärt werden, jedoch konnten gekaufte AuNPs erfolgreich funktionalisiert werden, sodass diese eine brauchbare Alternative zu vollständig selbst synthetisierten AuNPs darstellten. Auch hinsichtlich der Reproduzierbarkeit erscheint dies für zukünftige Untersuchungen ein sinnvoller Ansatz zu sein.

In weiteren Untersuchungen wurde der enzymatische Abbau von Membranproteinen durch die Serinprotease Chymotrypsin mit ATR-FTIR-Spektroskopie demonstriert. Während isoliertes GramD wenig Interaktion mit dem Enzym zeigte, war eine Abnahme der Amid-I-Bande von auf geladenen Lipid-Bilagen adsorbiertem CytC zu erkennen, was auf eine teilweise Verdauung des Proteins hinweist. Bei Erhöhung der Enzymkonzentration wurde dies jedoch durch eine Anlagerung dessen überdeckt. Auch wurde der enzymatische Abbau von SR-Membranen untersucht. Hierbei handelte es sich um biologische Membranen, die aus Muskelgewebe von Hasen isoliert wurden. Bei Zugabe des Enzyms zeigte sich ein langsamer Abbauprozess, welcher nach etwa 1,5 Tagen abgeschlossen gewesen wäre. Aufgrund der geringen Geschwindigkeit war dies jedoch während der Messung nicht zu erkennen, weshalb die Untersuchungen zu früh beendet wurden. Die IR-Spektren zeigten eine stärkere Abnahme der Amid-I-Bande als der CH₂-Valenzschwingungsbanden, was im Einklang mit der Funktion von Chymotrypsin als Peptidase steht. Bei hohen Enzymkonzentrationen wurde eine Zunahme der CH₂-Valenzschwingungsbanden beobachtet, was nicht abschließend erklärt werden konnte. Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um Überreste aufgeplatzter Membranen auf der Oberfläche handelt, wobei die Proteine schnell abgebaut wurden und somit nicht zu einer Zunahme der Amid-I-Bande führten.

Da sowohl die Untersuchungen an CytC als auch SR-Membranen zum Ende der Arbeit durchgeführt wurden, konnten sie im Rahmen dieser nicht mehr wiederholt werden. Sie zeigten jedoch das Potential, diese Mechanismen mit ATR-FTIR-Spektroskopie zu untersuchen. Für weitere Erkenntnisse sollten die Untersuchungen durch komplementäre Messtechniken unterstützt werden. Die Ergebnisse der Untersuchung von SR-Membranen wurden im Anschluss von der Arbeitsgruppe Tanaka aufgegriffen, mit komplementären Untersuchungen gestützt und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dahint publiziert.^[200]

10.4. Untersuchung der mechanischen Eigenschaften von Lipid-Multilagen

In weiteren Experimenten wurde mittels off-spekularer NR die Einflüsse von Polyelektrolyten auf DMPC-Multilagen untersucht. Es wurden starke Quelleffekte bei Interaktion der Multilagen mit dem Polyelektrolyt PAH festgestellt. Der Prozess lief dabei über einen bedeutend größeren Zeitraum ab, als dies bei vorherigen Untersuchungen an Oligobilagen der Fall war. Dies erschien in Anbetracht der deutlich größeren Bilagenzahlen verständlich. Eine verlässliche Simulation der Messdaten Parameter war jedoch nur bedingt möglich, weshalb keine fundierten Aussagen über die Einflüsse des

10. Zusammenfassung und Ausblick

Polyelektrolyts auf die mechanischen Parameter der Multilagen getroffen werden können. Für zukünftige analoge Untersuchungen sollten Anstrengungen unternommen werden, die Datenqualität zu verbessern und so eine Simulation zu ermöglichen. Hierzu könnte die Bilagenzahl oder die Messdauer erhöht werden.

11. Literaturverzeichnis

- [1] Y. Gerelli, *EPJ Web Conf.* **2020**, 236, 04002.
- [2] F. Cousin, G. Fadda, *EPJ Web Conf.* **2020**, 236, 04001.
- [3] F. Cousin, A. Menelle, *EPJ Web of Conferences* **2015**, 104, 01005.
- [4] A. McCluskey, **2020**.
- [5] M. Strobl, R. Steitz, M. Kreuzer, M. Rose, H. Herrlich, F. Mezei, M. Grunze, R. Dahint, *Rev Sci Instrum* **2011**, 82, 055101.
- [6] M. Al-Jawad, G. Fragneto, J. Liu, S. R. Chang, B. Clarkson, *The European Physical Journal E* **2009**, 30, 175.
- [7] J. A. Dura, C. A. Richter, C. F. Majkrzak, N. V. Nguyen, *Applied Physics Letters* **1998**, 73, 2131-2133.
- [8] F. Sebastiani, R. A. Campbell, C. Pfrang, *RSC Advances* **2015**, 5, 107105-107111.
- [9] C. Jing, Z. Gu, Y.-L. Ying, D.-W. Li, L. Zhang, Y.-T. Long, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 4284-4291.
- [10] N. Karra, S. Benita, *Current drug metabolism* **2012**, 13, 22-41.
- [11] P. K. Jain, I. H. El-Sayed, M. A. El-Sayed, *Nano Today* **2007**, 2, 18-29.
- [12] C. Contini, S. Matthew, G. Simon, N. and Quirke, *Journal of Experimental Nanoscience* **2018**, 13, 62-81.
- [13] M. Roller, *Inhal Toxicol* **2009**, 21 Suppl 1, 144-157.
- [14] F. Schwörer, *Charakterisierung von Lipid-Oligolagen nach Zugabe von Hyaluronsäure und polymeren Ersatzstoffen zur Aufklärung möglicher Wirkmechanismen in der Viskosupplementation*, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität (Heidelberg), **2017**.
- [15] F. Schwörer, M. Trapp, X. Xu, O. Soltwedel, J. Dzubiella, R. Steitz, R. Dahint, *Langmuir* **2018**, 34, 1287-1299.
- [16] C. Busch, B. Nagy, A. Stöcklin, P. Gutfreund, R. Dahint, T. Ederth, *Review of Scientific Instruments* **2022**, 93.
- [17] M. Delcea, C. A. Helm, *Langmuir* **2019**, 35, 8519-8530.
- [18] T. P. Russell, *Materials Science Reports* **1990**, 5, 171-271.
- [19] X.-L. Zhou, S.-H. Chen, *Physics Reports* **1995**, 257, 223-348.
- [20] C. Fermon, F. Ott, A. Menelle, in *X-ray and Neutron Reflectivity: Principles and Applications* (Eds.: J. Daillant, A. Gibaud), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2009**, pp. 183-234.
- [21] T. Salditt, *Journal of Physics: Condensed Matter* **2005**, 17, R287.
- [22] X. M. Du, K. F. Zheng, Y. Wang, X. X. Li, M. P. Wang, G. Zhang, E. D. Wu, *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures* **2017**, 12, 265-272.
- [23] T. Salditt, C. Li, A. Spaar, U. Mennicke, *The European Physical Journal E* **2002**, 7, 105-116.
- [24] F. Abelès, *Ann. Phys.* **1948**, 12, 504-520.
- [25] L. G. Parratt, *Physical Review* **1954**, 95, 359-369.
- [26] R. A. Campbell, H. P. Wacklin, I. Sutton, R. Cubitt, G. Fragneto, *The European Physical Journal Plus* **2011**, 126.
- [27] A. R. J. Nelson, S. W. Prescott, *J. Appl. Crystallogr.* **2019**, 52, 193-200.
- [28] A. Nelson, *Applied Crystallography* **2006**, 39, 273-276.
- [29] P. Kienzle, J. Krycka, N. Patel, I. Sahin, *College Park, MD: University of Maryland* **2023**.
- [30] A. Glavic, M. Björck, *Applied Crystallography* **2022**, 55, 1063-1071.
- [31] A. McCluskey, J. Cooper, T. Arnold, T. Snow, *Machine Learning: Science and Technology* **2020**, 1.
- [32] V. F. Sears, *Neutron News* **1992**, 3, 26-37.
- [33] P. A. Kienzle, *periodictable v1.5.0*, Zenodo, **2017**.
- [34] S. Tristram-Nagle, Y. F. Liu, J. Legleiter, J. F. Nagle, *Biophys. J.* **2002**, 83, 3324-3335.
- [35] K. Mortensen, W. Pfeiffer, E. Sackmann, W. Knoll, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1988**, 945, 221-245.
- [36] M. Schalke, M. Lösche, *Advances in Colloid and Interface Science* **2000**, 88, 243-274.

- [37] S. Dante, T. Hauß, R. Steitz, C. Canale, N. A. Dencher, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, 1808, 2646-2655.
- [38] M. Steinhauer, M. Stich, M. Kurniawan, B.-K. Seidlhofer, M. Trapp, A. Bund, N. Wagner, K. A. Friedrich, *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, 9, 35794-35801.
- [39] M. Strobl, R. Steitz, M. Kreuzer, A. Nawara, F. Mezei, M. Rose, p. Amitesh, M. Grunze, R. Dahint, *Journal of Physics: Conference Series* **2010**, 251, 012059.
- [40] A.-J. Dianoux, G. Lander, *Neutron Data Booklet*, 2nd ed., OCP Science, **2003**.
- [41] Z. Kelman, *Isotope Labeling of Biomolecules–Applications*, Vol. 566, Academic Press, **2016**.
- [42] A. Yamamoto, W. Abuillan, A. S. Burk, A. Körner, A. Ries, D. B. Werz, B. Demé, M. Tanaka, *The Journal of Chemical Physics* **2015**, 142.
- [43] A. H. Hafner, P. Gutfreund, B. P. Toperverg, A. O. F. Jones, J. P. de Silva, A. Wildes, H. E. Fischer, M. Geoghegan, M. Sferrazza, *J. Appl. Crystallogr.* **2021**, 54, 924-948.
- [44] E. Schneck, F. Rehfeldt, R. G. Oliveira, C. Gege, B. Demé, M. Tanaka, *Physical Review E* **2008**, 78, 061924.
- [45] R. Richardson, J. Webster, A. Zarbakhsh, *Applied Crystallography* **1997**, 30, 943-947.
- [46] A. Castel, P. Gutfreund, B. Cabane, Y. Rharbi, *Langmuir* **2020**, 36, 12607-12619.
- [47] K. A. Lavery, V. M. Prabhu, E. K. Lin, W. I. Wu, S. Satija, M. Wormington, *AIP Conference Proceedings* **2007**, 931, 185-190.
- [48] E. Schneck, R. G. Oliveira, F. Rehfeldt, B. Demé, K. Brandenburg, U. Seydel, M. Tanaka, *Physical Review E* **2009**, 80, 041929.
- [49] A. Yamamoto, Y. Higaki, J. Thoma, E. Kimmle, R. Ishige, B. Demé, A. Takahara, M. Tanaka, *Polymer Journal* **2022**, 54, 57-65.
- [50] T. Salditt, C. Münster, J. Lu, M. Vogel, W. Fenzl, A. Souvorov, *Physical Review E* **1999**, 60, 7285-7289.
- [51] N. Lei, C. R. Safinya, R. F. Bruinsma, *J. Phys. II France* **1995**, 5, 1155-1163.
- [52] G. G. Politano, C. Versace, *Spectroscopy Journal* **2023**, 1, 163-181.
- [53] H. Riegler, *Advanced Materials* **1993**, 5, 778-778.
- [54] J. Woollam, J. Hilfiker, T. Tiwald, C. Bungay, R. Synowicki, D. Meyer, C. Herzinger, G. Pfeiffer, G. Cooney, S. Green, *Variable angle spectroscopic ellipsometry in the vacuum ultraviolet*, Vol. 4099, SPIE, **2000**.
- [55] D. Gonçalves, E. A. Irene, *Química Nova* **2002**, 25.
- [56] B. Hajduk, H. Bednarski, B. Trzebicka, *The Journal of Physical Chemistry B* **2020**, 124, 3229-3251.
- [57] A. Barth, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2007**, 1767, 1073-1101.
- [58] Y. Ozaki, *Analytical Sciences* **2021**, 37, 1193-1212.
- [59] C. Mitra, *Infrared Spectroscopy: Principles, Advances, and Applications* **2019**, 57.
- [60] H. Deng, R. Callender, in *Methods in Enzymology*, Vol. 308, Academic Press, **1999**, pp. 176-201.
- [61] L. K. Tamm, S. A. Tatulian, *Quarterly Reviews of Biophysics* **1997**, 30, 365-429.
- [62] S. A. Tatulian, L. R. Jones, L. G. Reddy, D. L. Stokes, L. K. Tamm, *Biochemistry* **1995**, 34, 4448-4456.
- [63] P. Wong, H. Mantsch, *Chem. Phys. Lipids* **1988**, 46, 213-224.
- [64] J. M. Chalmers, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy* (Ed.: P. Griffiths), Wiley & Sons, Ltd, **2006**.
- [65] A. Barth, C. Zscherp, *Quarterly reviews of biophysics* **2002**, 35, 369-430.
- [66] E. Hecht, *Optics*, 5th ed., Pearson Education, **2016**.
- [67] K. Fahmy, *Recent research developments in biophysical chemistry* **2001**, 1-17.
- [68] O. Ali, A. Szabó, *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, 24, 15693.
- [69] P. A. Janmey, P. K. Kinnunen, *Trends Cell Biol* **2006**, 16, 538-546.
- [70] T. Harayama, H. Riezman, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, 19, 281-296.
- [71] G. van Meer, *The EMBO journal* **2005**, 24, 3159-3165.
- [72] H. Watson, *Essays Biochem* **2015**, 59, 43-69.

- [73] G. Van Meer, D. R. Voelker, G. W. Feigenson, *Nature reviews Molecular cell biology* **2008**, 9, 112-124.
- [74] E. Fahy, D. Cotter, M. Sud, S. Subramaniam, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2011**, 1811, 637-647.
- [75] B. A. Hills, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H* **2000**, 214, 83-94.
- [76] V. Goss, A. N. Hunt, A. D. Postle, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2013**, 1831, 448-458.
- [77] A. D. Bangham, in *Advances in Lipid Research*, Vol. 1 (Eds.: R. Paoletti, D. Kritchevsky), Elsevier, **1963**, pp. 65-104.
- [78] A. Zhukov, V. Popov, *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, 24, 11226.
- [79] R. P. Giri, A. Chakrabarti, M. K. Mukhopadhyay, *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, 121, 4081-4090.
- [80] J. Frallicciardi, J. Melcr, P. Siginou, S. J. Marrink, B. Poolman, *Nature communications* **2022**, 13, 1605.
- [81] F. de Meyer, B. Smit, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106, 3654-3658.
- [82] G. W. Feigenson, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2009**, 1788, 47-52.
- [83] J. F. Nagle, *Annual Review of Physical Chemistry* **1980**, 31, 157-196.
- [84] M. Kranenburg, B. Smit, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, 6553-6563.
- [85] S. L. Veatch, S. L. Keller, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2005**, 1746, 172-185.
- [86] J. Kurniawan, J. F. Ventrici de Souza, A. T. Dang, G.-y. Liu, T. L. Kuhl, *Langmuir* **2018**, 34, 15622-15639.
- [87] T. K. Lind, M. W. A. Skoda, M. Cárdenas, *ACS Omega* **2019**, 4, 10687-10694.
- [88] U. Mennicke, T. Salditt, *Langmuir* **2002**, 18, 8172-8177.
- [89] D. D. Lasic, *Biochem J* **1988**, 256, 1-11.
- [90] A. Maestro, P. Gutfreund, *Advances in Colloid and Interface Science* **2021**, 293, 102434.
- [91] L. Saunders, J. Perrin, D. Gammack, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1962**, 14, 567-572.
- [92] D. Hunter, B. Frisken, *Biophys. J.* **1998**, 74, 2996-3002.
- [93] P. H. B. Aoki, P. Alessio, D. Volpati, F. V. Paulovich, A. Riul, O. N. Oliveira, C. J. L. Constantino, *Materials Science and Engineering: C* **2014**, 41, 363-371.
- [94] H. Amenitsch, M. Rappolt, C. V. Teixeira, M. Majerowicz, P. Laggner, *Langmuir* **2004**, 20, 4621-4628.
- [95] J. G. Kleingardner, K. L. Bren, *Accounts of Chemical Research* **2015**, 48, 1845-1852.
- [96] Y. P. Ow, D. R. Green, Z. Hao, T. W. Mak, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**, 9, 532-542.
- [97] R. Swanson, B. L. Trus, N. Mandel, G. Mandel, O. B. Kallai, R. E. Dickerson, *Journal of Biological Chemistry* **1977**, 252, 759-775.
- [98] I. Bertini, G. Cavallaro, A. Rosato, *Chemical Reviews* **2006**, 106, 90-115.
- [99] W. D. Butt, D. Keilin, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **1962**, 156, 429-458.
- [100] L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, G. Varani, *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* **1999**, 4, 824-837.
- [101] L. Banci, I. Bertini, H. B. Gray, C. Luchinat, T. Reddig, A. Rosato, P. Turano, *Biochemistry* **1997**, 36, 9867-9877.
- [102] J. Hansen, W. Pschorn, H. Ristow, *European Journal of Biochemistry* **1982**, 126, 279-284.
- [103] D. A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2007**, 1768, 2011-2025.
- [104] R. J. Dubos, *The Journal of experimental medicine* **1939**, 70, 1.
- [105] H. L. Van Epps, *The Journal of experimental medicine* **2006**, 203, 259.
- [106] J. P. Segrest, R. J. Feldmann, *Journal of Molecular Biology* **1974**, 87, 853-858.
- [107] O. S. Andersen, R. E. Koeppe, B. Roux, *IEEE Transactions on NanoBioscience* **2005**, 4, 10-20.
- [108] J. Antoinette Killian, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1992**, 1113, 391-425.

- [109] S. Hladky, D. Haydon, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1972**, 274, 294-312.
- [110] A. Aghebati-Maleki, S. Dolati, M. Ahmadi, A. Baghbanzhadeh, M. Asadi, A. Fotouhi, M. Yousefi, L. Aghebati-Maleki, *Journal of Cellular Physiology* **2020**, 235, 1962-1972.
- [111] K. Kusada, H. Kitagawa, *Chemical Reviews* **2025**, 125, 599-659.
- [112] N. Parvin, S. W. Joo, T. K. Mandal, *Antibiotics* **2025**, 14, 207.
- [113] S. Sharma, R. K. Sharma, K. Gaur, J. F. Catala Torres, S. A. Loza-Rosas, A. Torres, M. Saxena, M. Julin, A. D. Tinoco, *Materials* **2019**, 12, 2317.
- [114] Y. Du, H. Sheng, D. Astruc, M. Zhu, *Chemical Reviews* **2020**, 120, 526-622.
- [115] E. Inshakova, A. Inshakova, A. Goncharov, in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Vol. 971, IOP Publishing, **2020**, p. 032031.
- [116] I. Freestone, N. Meeks, M. Sax, C. Higgitt, *Gold Bulletin* **2007**, 40, 270-277.
- [117] S. Hosny, L. Z. Mohamed, M. S. Ragab, Q. K. Alomoush, E. M. Abdalla, S. A. Aly, *Chemical Papers* **2025**, 1-22.
- [118] R. Sardar, A. M. Funston, P. Mulvaney, R. W. Murray, *Langmuir* **2009**, 25, 13840-13851.
- [119] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discussions of the faraday society* **1951**, 11, 55-75.
- [120] L. Zhao, D. Jiang, Y. Cai, X. Ji, R. Xie, W. Yang, *Nanoscale* **2012**, 4, 5071-5076.
- [121] M. Doyen, K. Bartik, G. Bruylants, *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, 399, 1-5.
- [122] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin, R. Whyman, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1994**, 801-802.
- [123] M. J. Hostetler, J. E. Wingate, C.-J. Zhong, J. E. Harris, R. W. Vachet, M. R. Clark, J. D. Londono, S. J. Green, J. J. Stokes, G. D. Wignall, G. L. Glish, M. D. Porter, N. D. Evans, R. W. Murray, *Langmuir* **1998**, 14, 17-30.
- [124] P. J. G. Goulet, R. B. Lennox, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 9582-9584.
- [125] S. Murthy, T. P. Bigioni, Z. Wang, J. T. Khoury, R. Whetten, *Materials Letters* **1997**, 30, 321-325.
- [126] T.-Y. Dong, H. Wu, C. Huang, J.-M. Song, I.-G. Chen, T.-H. Kao, *Applied Surface Science* **2009**, 255, 3891-3896.
- [127] M. J. Hostetler, A. C. Templeton, R. W. Murray, *Langmuir* **1999**, 15, 3782-3789.
- [128] M. Wojdyr, *J. Appl. Cryst.* **2010**, 43, 1126-1128.
- [129] M. D. Abramoff, *Biophotonics International* **2004**, 11, 36-42.
- [130] J. Tien, A. Terfort, G. M. Whitesides, *Langmuir* **1997**, 13, 5349-5355.
- [131] S. Tatur, M. Maccarini, R. Barker, A. Nelson, G. Fragneto, *Langmuir* **2013**, 29, 6606-6614.
- [132] D. B. Hall, P. Underhill, J. M. Torkelson, *Polymer Engineering & Science* **1998**, 38, 2039-2045.
- [133] L. Neupert, *AFM- und ζ -Sizer basierte Messungen zu Oligolipidsystemen*, Forschungspraktikum, Ruprecht-Karls-Universitat (Heidelberg), **2020**.
- [134] S. Ren, S. Yang, Y. Zhao, J. Zhou, T. Xu, W. Liu, *Tribology Letters* **2002**, 13, 233-239.
- [135] D. K. Aswal, S. Lenfant, D. Guerin, J. V. Yakhmi, D. Vuillaume, *Analytica Chimica Acta* **2006**, 568, 84-108.
- [136] E. Prince, *International Tables for Crystallography, Vol. C*, 3rd ed., Wiley, **2004**.
- [137] M. Trapp, *Journal of large scale research facilities JLSRF* **2017**, 3.
- [138] T. Saerbeck, R. Cubitt, A. Wildes, G. Manzin, K. H. Andersen, P. Gutfreund, *J. Appl. Crystallogr.* **2018**, 51, 249-256.
- [139] A. Devishvili, K. Zhernenkov, A. J. Dennison, B. P. Toperverg, M. Wolff, B. Hjorvarsson, H. Zabel, *Rev Sci Instrum* **2013**, 84, 025112.
- [140] Neutron Activation and Scattering Calculator, P. Kienzle, <https://www.ncnr.nist.gov/resources/activation/> (Abrufdatum: 21.08.2022)
- [141] W. Knoll, G. Schmidt, K. Ibel, E. Sackmann, *Biochemistry* **1985**, 24, 5240-5246.
- [142] G. Fragneto, J. R. Lu, D. C. McDermott, R. K. Thomas, A. R. Rennie, P. D. Gallagher, S. K. Satija, *Langmuir* **1996**, 12, 477-486.
- [143] J. C. Slater, *The Journal of Chemical Physics* **1964**, 41, 3199-3204.
- [144] J. E. Curtis, S. Raghunandan, H. Nanda, S. Krueger, *Computer Physics Communications* **2012**, 183, 382-389.
- [145] R. R. Ketchum, K. C. Lee, S. Huo, T. A. Cross, *Journal of Biomolecular NMR* **1996**, 8, 1-14.

- [146] H. Tiernan, B. Byrne, S. G. Kazarian, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2020**, 241, 118636.
- [147] I. W. Boyd, T. D. Binnie, J. I. B. Wilson, M. J. Colles, *Journal of Applied Physics* **1984**, 55, 3061-3063.
- [148] E. Shkondin, O. Takayama, M. E. A. Panah, P. Liu, P. V. Larsen, M. D. Mar, F. Jensen, A. V. Lavrinenko, *Opt. Mater. Express* **2017**, 7, 1606-1627.
- [149] J.-J. Max, C. Chapados, *The Journal of Chemical Physics* **2009**, 131, 184505.
- [150] C. Dias, A. P. Rauter, *Future Med Chem* **2019**, 11, 211-228.
- [151] M. Kaseem, S. Fatimah, N. Nashrah, Y. G. Ko, *Progress in Materials Science* **2021**, 117, 100735.
- [152] G. Zhu, G. Wang, J. J. Li, *Materials Advances* **2021**, 2, 6901-6927.
- [153] B. Song, D. Lee, H. Jeong, M. Yun, Y. Yun, *ACS Catalysis* **2024**, 14, 2620-2630.
- [154] Y. Khaydukov, O. Soltwedel, T. Keller, *Journal of large-scale research facilities JLSRF* **2015**, 1.
- [155] M. Kreuzer, *Solid-supported lipid membranes and their response to varied environmental conditions*, Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität (Heidelberg), **2012**.
- [156] A. Stöcklin, *Herstellung und Charakterisierung von Zellmembranmodellen unterschiedlicher Komplexität und Studien ihrer Wechselwirkung mit Nanopartikeln*, Universität Heidelberg (Heidelberg), **2023**.
- [157] W.-C. Hung, M.-T. Lee, F.-Y. Chen, H. W. Huang, *Biophys. J.* **2007**, 92, 3960-3967.
- [158] B. Liu, B. Poolman, A. J. Boersma, *ACS Chemical Biology* **2017**, 12, 2510-2514.
- [159] J. D. Cortese, A. L. Voglino, C. R. Hackenbrock, *Journal of Cell Biology* **1991**, 113, 1331-1340.
- [160] U. Schade, D. Cao, L. Puskar, E. Ritter, J. Beckmann, *Appl Spectrosc* **2020**, 74, 1530-1539.
- [161] P. J. Farrington, D. J. T. Hill, J. H. O'Donnell, P. J. Pomery, *Applied Spectroscopy* **1990**, 44, 901-903.
- [162] R. Edgar, B. Stay, *Techniques For Suppressing Optical Interference Errors In Infrared Film Thickness Gauging, Vol. 0590*, SPIE, **1986**.
- [163] F. Neri, G. Saitta, S. Chiofalo, *Journal of Physics E: Scientific Instruments* **1987**, 20, 894.
- [164] N. Kučerka, M.-P. Nieh, J. Katsaras, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, 1808, 2761-2771.
- [165] M. Caffrey, J. Hogan, *Chem. Phys. Lipids* **1992**, 61, 1-109.
- [166] P. Parisse, I. Solano, M. Magnozzi, F. Bisio, L. Casalis, O. Cavalleri, M. Canepa, in *Ellipsometry of Functional Organic Surfaces and Films* (Eds.: K. Hinrichs, K.-J. Eichhorn), Springer International Publishing, Cham, **2018**, pp. 63-93.
- [167] J. M. David, A. K. Rajasekaran, *J Kidney Cancer VHL* **2015**, 2, 15-24.
- [168] E. M. Lee, R. K. Thomas, P. G. Cummins, E. J. Staples, J. Penfold, A. R. Rennie, *Chemical Physics Letters* **1989**, 162, 196-202.
- [169] B. Dorner, A. R. Wildes, *Langmuir* **2003**, 19, 7823-7828.
- [170] L. Redondo-Morata, M. I. Giannotti, F. Sanz, *Langmuir* **2012**, 28, 12851-12860.
- [171] M. Tanaka, S. Kaufmann, J. Nissen, M. Hochrein, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, 3, 4091-4095.
- [172] M. Tsuboi, *Journal of Polymer Science* **1957**, 25, 159-171.
- [173] T. Bruna, F. Maldonado-Bravo, P. Jara, N. Caro, *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, 22, 7202.
- [174] J.-H. Li, X.-S. Shao, Q. Zhou, M.-Z. Li, Q.-Q. Zhang, *Applied Surface Science* **2013**, 265, 663-670.
- [175] C. Egbuna, V. K. Parmar, J. Jeevanandam, S. M. Ezzat, K. C. Patrick-Iwuanyanwu, C. O. Adetunji, J. Khan, E. N. Onyeike, C. Z. Uche, M. Akram, M. S. Ibrahim, N. M. El Mahdy, C. G. Awuchi, K. Saravanan, H. Tijjani, U. E. Odoh, M. Messaoudi, J. C. Ifemeje, M. C. Olisah, N. J. Ezeofor, C. J. Chikwendu, C. G. Ibeabuchi, *Journal of Toxicology* **2021**, 2021, 9954443.
- [176] C. Lopez-Chaves, J. Soto-Alvaredo, M. Montes-Bayon, J. Bettmer, J. Llopis, C. Sanchez-Gonzalez, *Nanomed.-Nanotechnol. Biol. Med.* **2018**, 14, 1-12.
- [177] J. Delgado-Gallardo, G. L. Sullivan, M. Tokaryk, J. E. Russell, G. R. Davies, K. V. Johns, A. P. Hunter, T. M. Watson, S. Sarp, *ACS ES&T Water* **2022**, 2, 527-538.
- [178] S. C. Hayden, G. X. Zhao, K. Saha, R. L. Phillips, X. N. Li, O. R. Miranda, V. M. Rotello, M. A. El-Sayed, I. Schmidt-Krey, U. H. F. Bunz, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 6920-6923.

- [179] W. Chen, F. Duša, J. Witos, S.-K. Ruokonen, S. K. Wiedmer, *Sci Rep* **2018**, *8*, 14815-14815.
- [180] E. J. Kramer, *Physica B: Condensed Matter* **1991**, *173*, 189-198.
- [181] C. Vericat, M. Vela, G. Benitez, P. Carro, R. Salvarezza, *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 1805-1834.
- [182] H. R. Philipp, E. A. Taft, *Journal of Applied Physics* **1982**, *53*, 5224-5229.
- [183] T. A. Harroun, H. Fritzsche, M. J. Watson, K. G. Yager, O. M. Tanchak, C. J. Barrett, J. Katsaras, *Review of Scientific Instruments* **2005**, *76*, 065101.
- [184] A. Khajeh, H. Modarress, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2014**, *1838*, 2431-2438.
- [185] Y. Wang, M. Lieberman, *Langmuir* **2003**, *19*, 1159-1167.
- [186] R. N. A. H. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2013**, *1828*, 2347-2358.
- [187] S. K. De, N. Kanwa, M. Ahamed, A. Chakraborty, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 14796-14807.
- [188] T. Wang, Z. Q. Feng, C. Wang, N. Y. He, *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2018**, *164*, 70-77.
- [189] K. L. Chen, G. D. Bothun, *Environmental Science & Technology* **2014**, *48*, 873-880.
- [190] M. A. Barrett, S. Zheng, L. A. Topozini, R. J. Alsop, H. Dies, A. Wang, N. Jago, M. Moore, M. C. Rheinstädter, *Soft Matter* **2013**, *9*, 9342-9351.
- [191] R. J. L. Welbourn, F. Bartholomew, P. Gutfreund, S. M. Clarke, *Langmuir* **2017**, *33*, 5982-5990.
- [192] Y. Ji, X. Yang, Z. Ji, L. Zhu, N. Ma, D. Chen, X. Jia, J. Tang, Y. Cao, *ACS Omega* **2020**, *5*, 8572-8578.
- [193] J. A. Lundbæk, S. A. Collingwood, H. I. Ingólfsson, R. Kapoor, O. S. Andersen, *Journal of The Royal Society Interface* **2010**, *7*, 373-395.
- [194] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G. R. Hutchison, *Journal of Cheminformatics* **2012**, *4*, 17.
- [195] A. M. Whited, A. Johs, *Chem. Phys. Lipids* **2015**, *192*, 51-59.
- [196] E. S. Melby, C. Allen, I. U. Foreman-Ortiz, E. R. Caudill, T. R. Kuech, A. M. Vartanian, X. Zhang, C. J. Murphy, R. Hernandez, J. A. Pedersen, *Langmuir* **2018**, *34*, 10793-10805.
- [197] G. J. Hardy, R. Nayak, S. Zauscher, *Curr Opin Colloid Interface Sci* **2013**, *18*, 448-458.
- [198] M. Rytömaa, P. Mustonen, P. Kinnunen, *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, 22243-22248.
- [199] G. C. K. Roberts, *Encyclopedia of Biophysics*, **2013**.
- [200] B. Ebrahimi Pour, A. Stöcklin, C. Busch, S. Kaufmann, B. Humphreys, A. Vorobiev, T. Nylander, R. Dahint, M. Tanaka, *Langmuir* **2024**, *40*, 22168-22176.
- [201] M. Rabenberg, Robert Koch-Institut, **2013**.
- [202] S. Glyn-Jones, A. J. Palmer, R. Agricola, A. J. Price, T. L. Vincent, H. Weinans, A. J. Carr, *Lancet* **2015**, *386*, 376-387.
- [203] T. Takahashi, K. Tominaga, H. Takano, W. Ariyoshi, M. Habu, J. Fukuda, H. Maeda, *Journal of oral pathology & medicine* **2004**, *33*, 224-229.
- [204] P. Smith, R. Ziolek, E. Gazzarrini, D. Owen, C. Lorenz, *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* **2019**, *21*, 9845-9857.
- [205] M. Kreuzer, M. Strobl, M. Reinhardt, M. C. Hemmer, T. Hauß, R. Dahint, R. Steitz, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2012**, *1818*, 2648-2659.
- [206] F. Schwörer, M. Trapp, M. Ballauff, R. Dahint, R. Steitz, *Langmuir* **2015**, *31*, 11539-11548.
- [207] A. Yamamoto, W. Abuillan, A. S. Burk, A. Körner, A. Ries, D. B. Werz, B. Demé, M. Tanaka, *The Journal of Chemical Physics* **2015**, *142*, 154907.
- [208] A. Castel, P. Gutfreund, B. Cabane, Y. Rharbi, *Soft Matter* **2020**, *16*, 1485-1497.
- [209] F. Schwörer, M. Trapp, L. Silvi, P. Gutfreund, R. Steitz, R. Dahint, *Langmuir* **2023**, *39*, 14958-14968.

12. Anhang

12.1. Einfluss der Verkipfung des Probentisches auf erhaltene IR-Spektren in IRRAS-Konfiguration

Im Rahmen erster Tests des Prototypen für das Instrument FIGARO wurde der Einfluss der Verkipfung des Probentisches, wie er bei einer NR-Messung vonnöten ist, getestet. Wie im Abschnitt 4.2.1 beschrieben war das Gehäuse des Detektors aufgrund eines defekten Fensters nicht verwendbar, weshalb

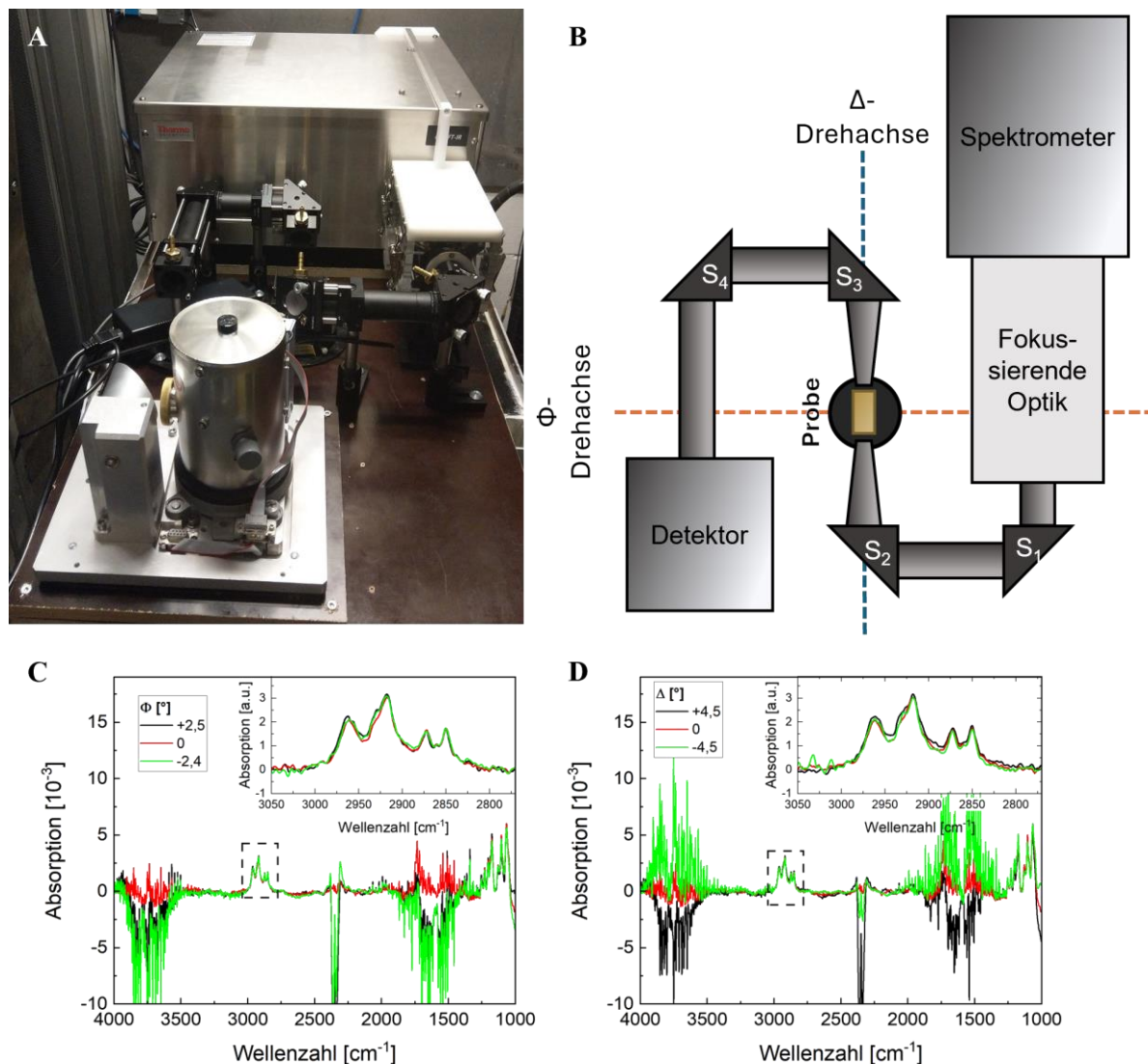


Abbildung 12.1: Einfluss der Verkipfung des Probentisches auf die erhaltenen IR-Spektren. **A** Verwendeter Prototyp des FIGARO-Aufbaus. Aufgrund defekter Fenster konnte das Detektorgehäuse nicht verwendet werden. **B** Skizze des Aufbaus aus Vogelperspektive mit eingezeichneten Drehachsen Φ und Δ . **C/D** Erhaltene Spektren bei Verkipfung des Probentisches um Φ -, beziehungsweise Δ -Drehachse. Die Ausschnittsvergrößerungen zeigen die Spektren im Bereich der CH_2 -Valenzschwingungsbanden und sind in den Gesamtspektren durch gestrichelte Kästen markiert. Die stark verrauschten Absorptionsbanden entstanden durch Absorptionen der Luft im Strahlengang und zeigen aufgrund fehlender Spülung mit Trockengas größere Schwankungen.

der Strahlengang nicht gespült werden konnte (siehe Abbildung 12.1 A). Für die Messung des Hintergrundspektrums wurden die beiden Arme an Position S_2 und S_3 der Strahlführung so ausgerichtet, dass im direkten Durchschuss durch das Tubus-System das Einkanalspektrum gemessen wurde. Als Probe wurde ein Bruchstück eines Gold-bedampften Siliziumwafers verwendet, welcher mit einem SAM aus perdeuteriertem Octadecanthiol beschichtet war. Dieses war zwischen den zum Probentisch hin gewinkelten Armen S_2 und S_3 der IR-Strahlführung auf einer Plattform platziert, welche dabei um 45° aus der Detektorebene ausgelenkt waren. Die Verkipfung des Aufbaus erfolgte in den Achsen Φ und Δ , welche in Abbildung 12.1 B eingezeichnet sind. Absorptionsspektren der Probe wurden in neutraler Position des Aufbaus und den maximalen Auslenkungen der Drehachsen aufgenommen und sind in Abbildung 12.1 C und D zu sehen. Bei maximaler Auslenkung beider Achsen konnte ein Einfluss auf die Form der CH_2 -Valenzschwingungsbanden in den Bereichen $(2950\sim 2925)\text{ cm}^{-1}$ und $(2900\sim 2885)\text{ cm}^{-1}$ festgestellt werden. Dieser war jedoch sehr gering und es wurde geschlussfolgert, dass dieser für weitere Messungen vernachlässigt werden kann.

12.2. Aufkommen von Etalons bei Probenmanipulation

Das Aufkommen von periodischen Signalen in gemessenen Spektren, sogenannten Etalons, ist ein häufiges Problem bei der Arbeit mit IR-Spektroskopie. Es handelt sich um stehende Wellen durch Teilreflexionen an Medienübergängen im Strahlengang, wie zum Beispiel an Fenstern oder Linsen. Unterscheidet sich die Periodizität der Etalons zwischen den gemessenen Einkanalspektren, treten diese auch im Absorptionsspektrum auf.

Bei der Entwicklung des kombinierten Messaufbaus traten Etalons in mehreren Messungen auf. Insbesondere Messungen in externer Reflexions-Konfiguration, analog zum verwendeten Prototypen in Abschnitt 12.1, zeigten sich anfällig. Es konnte festgestellt werden, dass auch kleine Manipulationen der Probenpositionierung zum Auftreten starker Etalons führten. Ein Beispiel ist in Abbildung 12.2 dargestellt. Hierbei wurde ein mit einem SAM aus perdeuteriertem Octadecanthiol beschichteter, Gold-

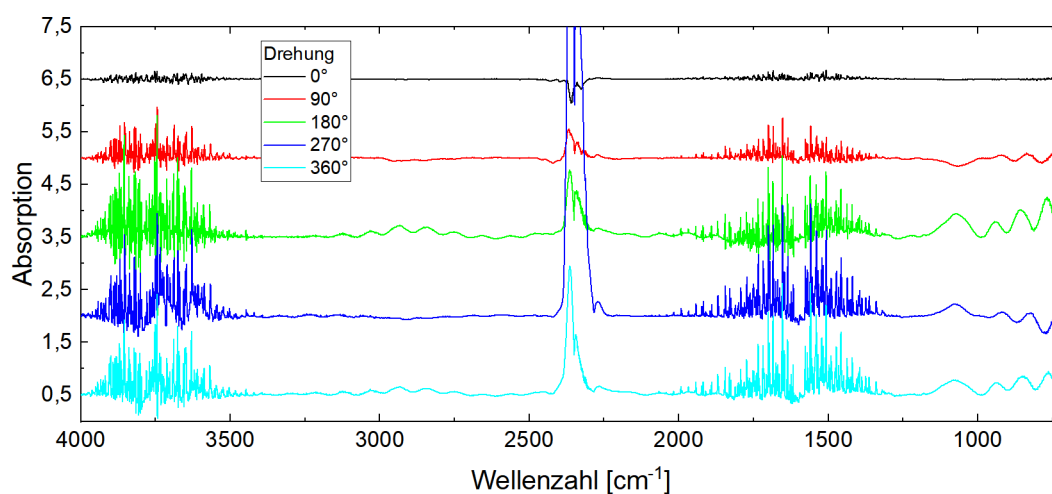


Abbildung 12.2: Änderung des IR-Spektrums durch Drehung der Probe in Reflexions-Konfiguration. Alle Messungen nach erstmaliger Probenmanipulation zeigten deutlich das Auftreten von Etalons.

bedampfter Siliziumwafer verwendet. Zwar war der Strahlengang hierbei gespült, die direkte Umgebung der Probe wurde jedoch zur einfacheren Manipulation offengelassen, weshalb mit Absorptionsbanden atmosphärischer Gase zu rechnen war. Ein Einkanal-Reflexionsspektrum des Wafers diente als Hintergrundspektrum. Im direkten Anschluss wurde ein Absorptionsspektrum des Wafers aufgenommen, ohne diesen zuvor zu manipulieren. Wie erwartet, war bis auf atmosphärische Absorptionsbanden eine Nulllinie zu erkennen. Anschließend wurde der Wafer in 90°-Schritten gedreht und jeweils ein Absorptionsspektrum bis zur vollständigen Drehung aufgenommen. Es wurden keine weiteren Änderungen am Strahlengang vorgenommen. Alle Spektren nach der ersten Probendrehung zeigten Etalons über den gesamten gemessenen Spektralbereich.

Danksagungen

Von ganzem Herzen bedanke ich mich hiermit bei dem Betreuer meiner Doktorarbeit, **Reiner Dahint**, der mir in den vergangenen Jahren mit Rat und Tat zur Seite stand und trotz aller Hindernisse und Rückschläge immer eine Engelsgeduld zeigte. Ich hätte mir keinen besseren Doktorvater wünschen können.

Ich danke **Motomu Tanaka**, der sich nicht nur bereiterklärt hat, das Zweitgutachten für die vorliegende Arbeit zu übernehmen, sondern mich auch auf eine überaus interessante und vielversprechende Messzeit am ILL mitnahm. Weiter bedanke ich mich für die Bereitstellung von Laborequipment und den SR-Membranen, ohne die meine Dissertation einige Seiten weniger umfasst hätte.

Ein besonderer Dank gilt auch **Andreas Stöcklin**, der mit mir zusammen die vier Jahre als Doktorand absolvierte und unter großem Messzeit-Schlafmangel an den Instrumenten die Stellung hielt. Immer gut gelaunt und mit einem Lachen, das Seinesgleichen sucht, hat er auch die größten Stresszeiten angenehm gemacht. Außerdem danke ich für die Unterstützung bei diversen Auswertungen, bei denen ich trotz größter Bemühungen lange im Dunkeln tappte.

Ich danke **Thomas Ederth** und **Bela Nagy** von der Linköping Universität (Schweden) für die gute Partnerschaft bei der Konzeptionierung und Umsetzung des kombinierten Messaufbaus.

Luca Silvi (ehemalig) vom HZB danke ich für die tatkräftige Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit am Instrument V6, sowie die immer freundliche und lustig Art der Unterhaltung und Tipps zu ersten Schritten in der Auswertung von Reflektometrie-Daten.

Philipp Gutfreund vom ILL danke ich für die Unterstützung an den Instrumenten FIGARO und D17, sowie die Hilfe bei der Prozessierung von Messdaten. Außerdem ein großer Dank für das Angebot, mir sein Büro als alternativen Schlafplatz zur Verfügung zu stellen, als ich versäumt hatte, mir rechtzeitig ein Zimmer im Gästehaus zu buchen, auch wenn das glücklicherweise nicht dann doch nicht notwendig war.

Bruno Demé vom ILL danke ich für die Unterstützung und Einweisung bei der Arbeit am Instrument D16.

Für die technische Unterstützung am ILL bedanke ich mich bei **Simon Wood**, **Stephanie Jimenez**, **Olivier Aguetaz**, die durch ihre Fachkompetenz einige Krisen bei Messzeiten abwandten.

Roland Steitz vom HZB danke ich für die Unterstützung bei ersten Gehversuchen in der Auswertung von Reflektometrie-Daten.

Bei **Wasim Abuillan** (ehemalig) vom Arbeitskreis Tanaka bedanke ich mich für das geduldige und kompetente Heranführen an die alles andere als triviale Auswertung off-spekularer Reflektometrie-Messungen und die gemeinsame Arbeit am Instrument D16.

Ein großer Dank gilt auch **Stefan Kaufmann** (ehemalig) vom Arbeitskreis Tanaka, der die für meine Arbeit genutzten SR-Membranen isolierte, sowie durch seine Kompetenz mein doch begrenztes Biologie-Fachwissen bereitwillig erweitert hat.

Dem Arbeitskreis von **Jana Zaumseil** danke ich für die Bereitstellung des REM und der Einweisung an diesem, sowie der Hilfe bei der ersten Charakterisierung von Nanopartikeln.

Ein großer Dank gebührt Reinhold Jehle (ehemalig) vom PCI Heidelberg, der die Plattform für den kombinierten FIGARO-Messaufbau entwarf.

Meinen Dank der feinmechanischen Werkstatt des PCI unter Leitung von **Klaus Schmitt**, die beim Entwerfen der Plattform für der kombinierten D17-Messaufbaut halfen, zahlreiche Bauteile anfertigten oder modifizierten und immer freundlich ihren Rat zu technischen Problemen gegeben haben.

Alle Studenten, die ich im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeiten oder Master-Forschungspraktika betreut habe, danke ich für ihre Mühen, sich an meiner Forschung zu beteiligen. Diese wären **Felix Lulay, Akino Yoshigaito, Leo Lutz, Philippe de-Bary, Friederike Schneider, Marlin Turan** und **Tim Wehland**.

Dem **Bundesministerium für Bildung und Forschung** danke ich herzlich für die Finanzierung der Doktorarbeiten von mir und Andreas.

Zu guter Letzt möchte ich einen besonderen Dank an Freunde und Familie richten. Meine **Eltern und Stiefeltern**, die mich seit über drei Jahrzehnten bei allen Problemen so gut sie können unterstützen. Meinem Bruder **Marco Busch**, der immer ein offenes Ohr für mich hat, wo auch immer der Schuh drücken mag. Meiner Freundin **Lisa Grubmüller** für die seelische Unterstützung und den Nachdruck am Schreiben zu bleiben. Meinen Freunden **Patrick Cieslik, Stefan Feth, Martin Dietl** und **Sabine Frisch**, die wöchentlich den Frust bei der gemeinsamen Mittagspause haben vergessen lassen. Außerdem einen großen Dank an **Severin Mäker** für die langjährige Freundschaft (bald schon 15 Jahre!), musikalische und politische Diskussionen, auch wenn es manchmal anstrengend sein kann. Meinen Arbeitskollegen **Angelika Krause, Nikolai Zimmermann** und **Michael Hofmeister** danke ich, dass sie mir in den letzten Monaten so gut es ging den Rücken freihielten, um die freigeschaufelte Zeit auch effektiv für die Dissertation nutzen zu können.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Elastische Reflexion eines einfallenden Neutronen- oder Röntgenstrahls k_0 unter dem Winkel $\theta > \theta_c$ an einem Substrat unter Luft. Ein Teil der Strahlung tritt in das Substrat mit dem Wellenvektor k_m ein. ^[3]	6
Abbildung 2.2: Reflexion eines einfallenden Neutronen- oder Röntgenstrahls k_0 unter dem Winkel $\theta > \theta_c$ an einem Substrat mit dünner Beschichtung. Analog zu Abbildung 2.1 findet teilweise Reflexion und Transmission an den Grenzflächen statt. Die reflektierten Anteile k_r und k_r' interferieren je nach entstandenem Phasenunterschied konstruktiv oder destruktiv und erzeugen so charakteristische Interferenzmuster in den aufgenommenen Reflexionsprofilen. ^[3]	7
Abbildung 2.3: Simulation des Reflexionsprofils eines Neutronenstrahls an einer idealen D2O-Oberfläche. Durch das Aufbringen einer arbiträren Schicht entstehen Kiessig-Oszillationen, deren Periodizität abhängig von der Dicke der Schicht ist. Die Intensität der Interferenzmuster ist abhängig von der Differenz der SLD von D2O und der Schicht.	8
Abbildung 2.4: Simulation des Reflexionsprofils eines Neutronenstrahls an einer rauen Probe. Die aufgetragene Schicht hatte eine konstante Dicke von $d = 100 \text{ \AA}$ und $\rho = 3,5 \text{ \AA}^{-3}$. Rauigkeiten σ_i an den Grenzflächen 1 und 2 äußern sich auf unterschiedliche Arten in den erhaltenen Profilen.	9
Abbildung 2.5: Simulation des Reflexionsprofils eines Neutronenstrahls an unterschiedlichen Zahlen von Wiederholungen N zweier arbiträrer Schichten auf D2O. Durch konstruktive Interferenz der an den Wiederholeinheiten (Schicht 1 und Schicht 2) reflektierten Strahlung ergeben sich Bragg-Peaks, die durch die gestrichelten Kästen markiert sind. Je größer N , desto deutlicher sind die Bragg-Peaks ausgeprägt. Ihre Abstände ΔQ_{Bragg} sind unabhängig von N und antiproportional zur Dicke der Wiederholeinheit, hier der Summe der Dicke von Schicht 1 und Schicht 2. Dahingegen sinkt der Abstand der Kiessig-Oszillationen $\Delta Q_{\text{Kiessig}}$ mit zunehmendem N aufgrund der wachsenden Probendicke.....	10
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung üblicher Reflektometer. A Monochromatisches Reflektometer. Ein monochromatischer Strahl wird auf die Oberfläche geleitet. Durch Variation des Winkels θ der Probe und des Winkels 2θ des Detektors wird die spekulare Reflexion RQ erhalten. B Time-of-flight Reflektometer. Ein Chopperrad erzeugt einen Strahlungspuls, welcher unter einem festen Winkel θ auf die Probe geleitet wird. Die Wellenlänge, und somit auch Q , ergeben sich aus der Summe der zurückgelegten Wegstrecken L_1 und L_2 zwischen Chopperrad, Reflexionspunkt und Detektor, sowie der dafür benötigten Zeit unter Annahme elastischer Reflexion. ^[3]	11
Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Messung off-spekularer Reflektometrie. Um die Abweichung vom spekularen Verhalten zu messen, wird sowohl der Winkel Ω des einfallenden Strahls zur Probe, als auch der Winkel Γ zwischen einfallendem Strahl und Detektor variiert. Aus diesen wird der Streuvektor Q berechnet, welcher sich aus den orthogonalen Komponenten Q_z und $Q_{\parallel}$ zusammensetzt. ^[44]	14
Abbildung 2.8: Beispielmessung von off-spekularer NR an einer Probe von Lipid-Multilagen. Die aufgetragenen Daten wurden einer der in Abschnitt 9 beschriebenen Messserien entnommen. A Auftragung der Reflektivität R in Q_z und $Q_{\parallel}$. Entlang $Q_{\parallel} = 0$ kann die spekulare NR beobachtet werden. Orthogonal zu den Positionen der Bragg-Peaks kann die off-spekulare Reflektivität der Probe beobachtet werden. B Auftragung des in A gelb markierten Bragg-Sheets bei $Q_z = 0,35 \text{ \AA}^{-1}$	15
Abbildung 2.9: Schematische Darstellung eines Aufbaus zur Messung von Ellipsometrie. Die Kombination von Lichtquelle und Polarisator erzeugt linear polarisiertes Licht, dessen Polarisationswinkel über den Modulator eingestellt werden kann. Bei Reflexion an einer Probenoberfläche kommt es aufgrund unterschiedlicher optischer Weglängen zwischen dem direkt reflektierten Strahl und denen, die die Probe durchquert und aus dieser nach Reflexion am Substrat wieder austreten zu einer Phasenverschiebung (siehe Detailansicht). So entsteht elliptisch	

polarisiertes Licht. Analysator und Detektor bestimmen die ellipsometrischen Winkel Ψ und Δ durch Messung der Lichtintensität in Abhängigkeit des Polarisationswinkels.^[52, 54] 17

Abbildung 2.10: Aufbau und Funktionsweise eines FTIR-Spektrometers. Durch einen Strahlteiler wird das Licht der verwendeten Quelle in zwei Teile gespalten. Während ein Teil von einem fixierten Spiegel reflektiert wird, wird der andere an einem sich bewegenden Spiegel reflektiert. Durch Rekombination kommt es zu Interferenzmustern. Der Detektor misst die Intensität in Abhängigkeit der Spiegelposition d , was der Fourier-Transformierten des ursprünglichen Spektrums entspricht. Eine weitere Fourier-Transformation durch die verwendete Software rekonstruiert das ursprüngliche Spektrum. Die Abbildung zeigt den einfachen Fall einer monochromatischen Lichtquelle zur Visualisierung der Funktionsweise, während in realen IR-Spektrometern breitbandige Lichtquellen eingesetzt werden.^[57]

..... 19

Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der ATR-Messtechnik. Einfallendes IR-Licht im Substrat wird an der Grenzfläche zu Probe und Probenmedium totalreflektiert, wobei ein evaneszentes Feld ausgebildet wird (dargestellt als Halbellipse mit Farbverlauf). Dessen Intensität nimmt exponentiell mit dem Abstand z zur Grenzfläche ab und ist außerdem von den Brechungsindizes des Substrats n_1 und des Probenmediums n_2 , sowie dem Einfallswinkel ϕ abhängig. Das evaneszente Feld wird von Probe und Probenmedium absorbiert und schwächt somit das reflektierte Licht ab.^[57, 61, 66] 22

Abbildung 2.12: Schematische Darstellung einer typischen Zellmembran. Das Grundgerüst wird durch Lipide gebildet. Verschiedene Arten von Proteinen binden an die Lipid-Bilage oder lagern sich in diese ein, ebenso wie Sterole. Die Zusammensetzung der Membran bestimmt durch die Vielzahl an verschiedenen Komponenten deren biologische Funktionalität.^[68] 24

Abbildung 2.13: A Grundlegender Aufbau von Phospholipiden. Die obige Darstellung zeigt das Grundgerüst, bestehend aus Glycerol (grün), den veresterten Fettsäuren (blau), der Phosphatgruppe (schwarz) und der Kopfgruppe X (rot). Für letztere ist eine Auswahl von typischen Kandidaten und dem damit assoziierten Namen des Phospholipids gegeben.^[68] B Cholesterol, das häufigste in Eukaryoten-Membranen anzutreffende Sterol. Das Sterol-Grundgerüst ist rot eingezeichnet. 25

Abbildung 2.14: Darstellung typischer Phasen von Lipid-Bilagen. Von links nach rechts sind die thermodynamisch stabilen Anordnungen bei steigender Temperatur dargestellt, wobei die $P\beta'$ -Phase nur bei einigen Phosphatidylcholinen beobachtet wird.^[84] 27

Abbildung 2.15: Häm C Gruppe, wie sie in Zytochrom C vorzufinden ist. Das zentrale Eisen-Ion wird sechsfach koordiniert. Es wird vierfach durch die Stickstoff-Atome des Porphyrin-Rings koordiniert, während zwei weitere Koordinationen durch Methionin und Histidin der Protein-Seitenketten gegeben sind.^[95] 29

Abbildung 3.1: Synthese von MACI (3) nach Tien et al.^[130] 35

Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Rotationsbeschichtung von Si-Substraten mit Lipid-Oligobilagen nach Mennicke et al.^[88] 38

Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Strukturänderung von Lipid-Oligobilagen durch Trocknung. Die Rückstände des Lösungsmittels (grüne Kreise) können durch verminderten Druck (A) oder Hitzeeinwirkung (B) entfernt werden. Vakuumtrocknung führt zu einem lateralen Zusammenwachsen der Löcher in den Bilagen, wobei die Probendicke erhalten bleibt. Bei der Hitzetrocknung erfolgt zusätzlich ein Ausheilen der inneren Bilagen durch Moleküle der äußeren Lagen. 39

Abbildung 3.4: Querschnitt der zur SAM-Beschichtung von ATR-Kristallen verwendeten Konstruktion. Die beiden Hälften der Teflon-Form werden durch sechs Rändelschrauben (zwei vor der Querschnittsebene nicht dargestellt) zusammengepresst, sodass ein nach oben geöffneter Hohlraum über der zu beschichteten Seite des Kristalls entsteht, in den die Silan-Lösung eingefüllt wird. Durch die Abdichtung über O-Ringe (schwarze Kreise) wird die ungewollte Beschichtung der anderen Kristall-Flächen vermieden. 41

Abbildung 3.5: Flüssigkeitszelle und Geometrie des für temperaturkontrollierte Messungen verwendeten XRR-Aufbaus. A Seitlicher Querschnitt mit Peltier-Elementen (Kühler nicht eingezeichnet). Flüssigkeitsaustausch mit einem externen Reservoir erfolgte über einer

<i>Peristaltikpumpe. Die Flüssigkeitszelle wurde über eine Rändelschraube zwischen den Peltier-Elementen fixiert. B Frontaler Querschnitt mit Geometrie der Röntgenstrahlung. Durch Verfahren der Winkel von Röntgenquelle und Detektor zur Probenoberfläche findet die Messung in $\theta/2\theta$-Geometrie statt.</i>	42
Abbildung 3.6: <i>A Reflexionen des IR-Strahls innerhalb der verwendeten Si-Kristalle. B Absorptionsspektrum eines Si-Kristalls in ATR-Konfiguration. Ein Hintergrundsspektrum wurde mittels direktem Durchschuss des IR-Strahles ohne Interaktion mit einem Substrat verwendet. Hierfür wurde der in Abschnitt 4.2 beschriebene Aufbau so eingestellt, dass alle Reflexionen in einer Ebene stattfanden.</i>	45
Abbildung 3.7: <i>Schematische Darstellung der ATR-FTIR-Messung an einer mit Lipid-Oligobilagen der Dicke d_{lip} beschichteten Oberfläche. Die Absorption durch die Probe findet mit einem bei der Reflexion an der Grenzfläche entstehenden evaneszenten Feld statt (rote Ellipse), welches in Abhängigkeit des Abstands z zu dieser exponentiell abfällt. Die äußeren Lipid-Bilagen tragen demnach bedeutend weniger zur gesamten Absorption der Probe bei als die inneren.</i>	46
Abbildung 3.8: <i>Schematische Darstellung des Ablöseprozesses von Lipid-Oligobilagen. Beim Lösen der äußeren Bilage von der Probe wird die nächste Bilage zur äußeren mit der entsprechenden Wasserzwichenschicht der Dicke $dW3$.</i>	48
Abbildung 3.9: <i>Beispielhafte Auswertung einer Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahme von NPs. A Gesamtbild und gewählter Bildausschnitt zur Auswertung. B Bildausschnitt nach Anwendung des FFT-Bandpassfilters. C Isolierte Partikel nach Anwendung eines Hochpassfilters.</i>	49
Abbildung 4.1: <i>Skizze des für den FIGARO-Prototypen geplanten Strahlengangs (links). Der Wechsel zwischen Detektor- und Probenebene ist durch den gestrichelten Kasten markiert. Innerhalb des ATR-Kristalls wird der IR-Strahl fünfmal reflektiert (rechts). Eine mögliche Fokussierung des Strahls, dargestellt durch rote Konusse, mithilfe von Parabolspiegel an den Stellen S_2 und S_3 müsste diesen deshalb auf einen gedachten Punkt unterhalb des Kristalls ausrichten.</i>	53
Abbildung 4.2: <i>Schematische Darstellung der Reduktion des Strahldurchmessers des Spektrometers mithilfe einer plankonvexen und einer plankonkaven (A), beziehungsweise zweier plankonvexen (B) Linsen. Der Aufbau kann durch Verschiebung der plankonvexen Linse (blauer Pfeil) konfokal eingestellt werden. C Aufbau zur Reduktion des Strahldurchmessers im Prototyp des kombinierten Messaufbaus. Die plankonvexe Linse ist in den Kollimationsadapter eingesetzt, welcher am oberen Ende des Gehäuses zu sehen ist. Das Gehäuse kann zur Spülung mit Trockengas verschlossen werden.</i>	55
Abbildung 4.3: <i>Der Prototyp des ATR-FTIR-Aufbaus an FIGARO im August 2019 war auf einer Holzplatte montiert, welche auf dem Probentisch des NR-Instruments installiert werden konnte. Der Durchmesser IR-Strahl wurde mithilfe fokussierender Optik, welche in dem rechts im Bild zu sehenden Gehäuse untergebracht war, reduziert (siehe hierzu auch Abbildung 4.2 C). Das Gehäuse des Detektors (vorne links) wurde aufgrund fehlerhafter Fenster entfernt.</i>	56
Abbildung 4.4: <i>A Die Halterung der Flüssigkeitszelle. Die Kombination aus zwei Adapterplatten mit Langlöchern und einer kommerziell erhältlichen Hebebühne erlaubt die Justage der Probe in drei Achsen. Die Flüssigkeitszelle selbst stammt aus den Arbeiten von Martin Kreutzer und Felicitas Schwörer^[14, 155] und erlaubt die gleichmäßige Temperierung der Probe durch einen externen Kryostaten (nicht dargestellt). B Mithilfe einer Peristaltikpumpe und einem Tygon-Schlauchsystem wurde ein konstanter Durchfluss in der Flüssigkeitszelle gewährleistet.</i>	58
Abbildung 4.5: <i>Der vorläufige Aufbau zur Kombination von NR und ATR-FTIR an FIGARO bei Tests an FIGARO im Januar 2020 (A) und ersten Messungen im Februar 2020 (B).</i>	59
Abbildung 4.6: <i>Skizze des zur Modellierung der NR-Profile von DMPC-Oligobilagen mit 20% Chol-Anteil verwendeten Modells. Alle N Bilagen sind in ihrem Aufbau gleich, das heißt, dass alle äquivalenten Dicken d_{Kopf} und d_{Kette}, die SLDs ρ_{Kopf} und ρ_{Kette} und die Lösungsmittelanteile ϕ_w, lip identisch sind. Die Dicke der inneren Wasserzwichenschichten $dW2$ wird als gleich angenommen, die Dicken $dW1$ der ersten und letzten Wasserzwichenschicht $dW3$ werden separat angepasst. Alle Rauigkeiten σ zwischen den einzelnen Schichten werden als identisch betrachtet.</i>	60

Abbildung 4.7: Skizze der durch Chol-Einlagerung erwarteten strukturellen Änderungen der DMPC-Struktur: A zeigt die Monolage vor Einlagerung von Chol. Die Kopfgruppen sind gleichgerichtet, die Kettengruppen liegen teilweise ungeordnet vor. In Gegenwart von Chol (B) lagern die Kopfgruppen um, um den hydrophoben Bereich abzuschirmen. Die Kettengruppen werden gestreckt und nehmen so eine geringere Grundfläche ein. ^[157]	61
Abbildung 4.8: NR-Profile eines DMPC-Oligobilagensystems mit 20% Chol-Anteil unter D ₂ O, MgCl ₂ und zweier AuNP-Konzentrationen. Die gemessenen Daten sind als Punkte dargestellt, die nach Simulation des Systems erhaltenen Anpassungen als Linien.	62
Abbildung 4.9: IR-Absorptionsspektren der untersuchten Probe eines DMPC-Oligobilagensystems mit 20% Chol-Anteil. Der Einzug zeigt das Integral der asymmetrischen CH ₂ -Valenzschwingungsbande bei 2919 cm ⁻¹ . Es wurden jeweils 512 Spektren bei einer Auflösung von 4 cm ⁻¹ gemittelt, was in einem Zeitbedarf von 3,23 min je Messung resultierte.	63
Abbildung 4.10: Schematische Darstellung der Strahlengänge innerhalb des ATR-Kristalls. ATR-FTIR und SE teilen sich eine Einfallsebene, erreichen die beschichtete Oberfläche jedoch von unterschiedlichen Seiten des Kristalls. Die Einfallsebene des Neutronenstrahls ist orthogonal zu Einfallsebene der übrigen Messmethoden.	66
Abbildung 4.11: A Technische Zeichnung der SE-Einheit des kombinierten Messaufbaus mit eingebauter Flüssigkeitszelle. Reproduziert mit Genehmigung. ^[16] B Explosionszeichnung der Flüssigkeitszelle, entwickelt von T. Ederth. Reproduziert mit Genehmigung. ^[16] C Kombiniertes Messaufbau im Juni 2021 an FIGARO.	67
Abbildung 4.12: NR-Messdaten und Anpassungen von DMPC-Oligobilagen unter D ₂ O (schwarz), sowie Änderung der Bragg-Peaks bei Interaktion mit AuNP (Ausschnittvergrößerungen). Die in den Vergrößerungen dargestellten Bereiche sind mit gestrichelten Kästen markiert. Aufgrund der längeren Messung wurde bei der Darstellung bei 18 °C (A) ein zeitlicher Abstand der Profile von 3 min gewählt, wohingegen bei 26 °C (B) alle Profile aufgetragen sind. Je Messung der in den Vergrößerungen dargestellten Auftragungen wurde die Reflektivität über 1 min gemittelt. Reproduziert mit Genehmigung. ^[16]	70
Abbildung 4.13: Änderung der CH ₂ -Valenzschwingungsbanden bei Interaktion der DMPC-Filme mit AuNP bei 18 °C (A) und 26 °C (B). Für jede Messung wurden 512 Spektren bei einer Auflösung von 4 cm ⁻¹ gemittelt, was in einem Zeitbedarf von 3,23 min resultierte. C/D Verlauf der Position der symmetrischen (C) und asymmetrischen (D) CH ₂ -Valenzschwingungsbande beider Messungen. Reproduziert mit Genehmigung. ^[16]	71
Abbildung 4.14: Verläufe der Probendicke nach den Auswertungen von NR, ATR-FTIR und SE bei 18 °C (A) und 26 °C (B). Die Zeiten Δt ₅₀ , bei der die Hälfte der Probendicke verloren war, ist in den Legenden eingetragen. Reproduziert mit Genehmigung. ^[16]	72
Abbildung 4.15: A Neutronenreflektometer D17. Der Probenstisch befindet sich mittig zwischen dem Neutronen-Detektor (links) und dem Neutronenleiter (rechts), welche etwa 53 cm voneinander entfernt sind. B Skizze der Probenhalterung für vertikale Probengeometrie. C Kombiniertes Messaufbau für D17 ohne SE in den Laboren der Arbeitsgruppe Dahint.	74
Abbildung 4.16: Aufsicht des kombinierten Messaufbaus an D17. Die Hebebühne zur Justage der Probenhöhe wurde durch einen Aluminiumblock ersetzt, welcher hier mittig zu sehen ist.	75
Abbildung 4.17: Skizze der strukturellen Änderung einer Lipid-Bilage durch die Einlagerung von Gramicidin. Das Protein ist aufgrund der hydrophoben Seitenketten am Äußeren der Helix in den Kettengruppen eingebettet, das hydrophile Peptidrückgrat befindet sich im Inneren. Durch Dimerisierung an den N-Termini der Proteine können Ionenkanäle ausgebildet werden, wobei aufgrund der kürzeren Länge des Dimers verglichen mit dem hydrophoben Lipid-Kettenbereich eine Verformung der Bilage stattfindet (links). Auch die Einlagerung ohne Dimerisierung ist möglich (rechts). ^[103]	76
Abbildung 4.18: NR-Profile der Probe aus 10% GramD und 90% Lipidgemisch (4:1 DMPC/Chol). A Erhaltene Profile und beste Anpassungen. Für Messungen unter 50 mM MgCl ₂ konnten keine guten Anpassungen erhalten werden. Bei Zugabe von MgCl ₂ (B) und Temperaturerhöhung (C) wurden	

kontinuierliche Verschiebungen des Bragg-Peaks zu kleineren Streuvektoren beobachtet, was einem Quellprozess aufgrund des Wachstums der mittleren Bilagenabstände entspricht. Es wurden ausgewählte Reflexionsprofile wurden aufgetragen, die Einsätze zeigen die Lage des Bragg-Peaks in Abhängigkeit der Zeit, beziehungsweise Temperatur, welche nach Gauß-Anpassungen aller Reflexionsprofile erhalten wurden. Aufgrund der kleinen Unterschiede wurde die Lage des Maximums in C durch gestrichelte Linien markiert.	77
Abbildung 4.19: IR-Absorptionsspektren der Probe aus 10% GramD und 90% Lipidgemisch (4 : 1 DMPC/Chol). A Übersicht der IR-Absorptionsspektren aller untersuchten Flüssigphasen. Der Einzug zeigt die die Intensität der jeweiligen symmetrischen CH ₂ -Valenzschwingung. B Änderung der IR-Absorptionsspektren bei Zugabe von MgCl ₂ . Der Einzug zeigt den Verlauf der symmetrischen CH ₂ -Bandenintensität. C Änderung der IR-Absorptionsspektren bei Temperaturvariation. Der Einzug zeigt die Lage der symmetrischen CH ₂ -Bande.	79
Abbildung 4.20: Nach Modellierung von SE-Messungen erhaltene Schichtdicken der Probe aus 10% GramD und 90% Lipidgemisch (4: 1 DMPC/Chol). Die Änderung des Systems zum vorherigen Zustand ist jeweils durch fette Schrift markiert. A Verlauf der Schichtdicke bei Zugabe von 10µg/ml 2 nm AuNP. B Verlauf der Schichtdicke bei Zugabe von 50 mM MgCl ₂ . C Verlauf der Schichtdicke bei Erhöhung der Proben temperatur.	80
Abbildung 5.1: Einfluss der bei Rotationsbeschichtung gewählten DMPC-Konzentration und der Trocknungsmethode auf die Probendicke von DMPC-Oligobilagen, untersucht mit SE. A Die Dicke <i>d</i> nimmt mit der Konzentration des Lipids in der Beschichtungslösung zu. Die Bilagenzahl wurde unter Annahme einer Bilagendicke von 5,6 nm berechnet. ^[34] Die linearen Anpassungen (graue und hellrote Linie) mit R ² > 99,8% sprechen für eine gute Korrelation. B Cauchy-Parameter der zugehörigen Anpassungen.	91
Abbildung 5.2: Demonstration der Basislinienkorrektur anhand der vakuumgetrockneten Probe nach Rotationsbeschichtung mit 7 mg/ml DMPC. Das Spektrum wird durch die starke Absorption der Silizium-Banden unter 1500 cm ⁻¹ dominiert. Außerdem fällt das Spektrum nicht auf eine Absorption von Null ab, was die Auswertung der Schwingungsbanden erschwert. Dies kann mithilfe der Basislinienkorrektur behoben werden.	93
Abbildung 5.3: Intensität der asymmetrischen CH ₂ -Streckschwingungsbande in Abhängigkeit der mithilfe von SE bestimmten Probendicke. Es wurde ein in guter Näherung linearer Anstieg der Bandenintensität mit Zunahme der Probendicke beobachtet.	94
Abbildung 5.4: Ellipsometrische Bestimmung der Probendicke bei der Beschichtung mit 5 mg/ml Lipid-Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung. Dicken reiner DMPC-Oligobilagen wurden aus den in Abbildung 5.1 dargestellten Ergebnissen übernommen, wobei dies im Falle der Vakuumtrocknung aufgrund fehlender Messdaten anhand der Ausgleichsgerade berechnet wurde. Durch Hitzetrocknung ist eine Abnahme der Probendicke zu beobachten. Der Effekt wird durch Einlagerung von Chol und GramD verringert, was für weniger Fehlstellen in den tieferliegenden Bilagen spricht.	96
Abbildung 5.5: Erhaltene XRR-Profile von trockenen DMPC/Chol-Oligobilagen auf Si-Substraten. Anpassungen nach dem in Tabelle 2.1 beschriebenen Modell sind als transparente Linien eingezeichnet. Die entsprechenden Parameter sind in Tabelle 5.2 zu finden. Der Einsatz zeigt die nach der Anpassung erhaltene Bilagendicke.	98
Abbildung 5.6: Einfluss der Temperatur auf die CH ₂ -Valenzschwingungsbanden von DMPC-Oligobilagen, gemessen mit ATR-FTIR-Spektroskopie. A: Verschiebung der Lage der symmetrischen und asymmetrischen CH ₂ -Valenzschwingungsbande bei Erhöhung der Temperatur. Die erhaltenen Messpunkte wurden mithilfe einer Boltzmann-Funktion angepasst, R ² > 0,98. B: Zugehörige IR-Spektren. Zusätzlich zur Verschiebung kann eine Abnahme der Bandenintensität beobachtet werden.	103
Abbildung 5.7: Erhaltene NR-Profile von DMPC-Oligobilagen auf Si-Substraten unter D ₂ O und nach Zugabe von MgCl ₂ und AuNP. Anpassungen nach dem in Tabelle 5.4 beschriebenen Modell sind	

als durchgezogene Linien eingezeichnet. Die so erhaltenen Parameter sind in Tabelle 5.5 zu finden.

.....	108
Abbildung 5.8: Änderungen der CH ₂ -Valenzschwingungsbanden von DMPC-Oligobilagen bei Interaktion mit MgCl ₂ und AuNPs, untersucht mit ATR-FTIR-Spektroskopie. Die linke Seite zeigt ausgewählte Spektren der Messserien, die rechte Seite die Entwicklung der CH ₂ -Valenzschwingungsbanden nach Anpassung mit Lorentz-Funktionen, normiert auf den jeweiligen Startwert. A Finale Spektren der Messserien unter den untersuchten experimentellen Bedingungen. B Interaktion mit 50 mM MgCl ₂ (Schritt 2), untersucht über 16 h. C Interaktion mit 10 µg/ml 5 nm AuNP (Schritt 3), untersucht über 3 h. D Interaktion mit 40 µg/ml 5 nm AuNP (Schritt 4), untersucht über 3 h.	110
Abbildung 5.9: Erhaltene NR-Profile von Oligobilagen aus 80% DMPC und 20% Chol auf Si-Substraten unter D ₂ O und nach Zugabe von MgCl ₂ und AuNP. Anpassungen nach dem in Tabelle 5.6 beschriebenen Modell sind als transparente Linien eingezeichnet. Die so erhaltenen Parameter sind in Tabelle 5.7 zu finden.	115
Abbildung 5.10: IR-Absorptionsspektrum der untersuchten Probe von DMPC-Oligobilagen mit 20% Chol unter D ₂ O. Als Hintergrundspektrum wurde der gesäuberte ATR-Kristall gegen D ₂ O zu einem separaten Zeitpunkt gemessen. Störfaktoren für eine quantitative Auswertung der Spektren sind deutlich zu erkennen. Im rot markierten Bereich ist das periodische Signal der Etalons zu erkennen. In den Bereichen von 1300 ~ 2000 cm ⁻¹ und 3400 ~ 4000 cm ⁻¹ sind starke Rotationsbanden von H ₂ O aus der Umgebungsluft zu sehen.	120
Abbildung 5.11: Änderung der CH ₂ -Banden der untersuchten Probe von DMPC-Oligobilagen mit einem Chol-Gehalt von 20%. A Absorptionsbanden im Bereich von 2800 – 3000 cm ⁻¹ . Die Abnahme der Banden beim Fortschritt des Experiments ist deutlich zu erkennen. B Normierte Absorptionen der CH ₂ -Streckschwingungsbanden (Datenpunkte) und simulierte Absorption anhand der aus NR erhaltenen Parameter (Linien). Zugunsten der Übersichtlichkeit wurden die Daten der asymmetrischen Streckschwingungsbande versetzt dargestellt.	121
Abbildung 6.1: Vergleich von ATR-FTIR-Spektren einer Probe aus DMPC-Oligobilagen mit einer Probe aus 90% DMPC-Oligobilagen mit 10% GramD, jeweils unter D ₂ O aufgenommen. Die Spektren wurden basislinienkorrigiert und auf die asymmetrische CH ₂ -Valenzschwingungsbande normiert. Durch die Inkorporation des Proteins ist zusätzlich die Amid I Band zu erkennen. Da die Probe weniger Lipid enthält, sind die damit assoziierten Banden verglichen mit den Banden von Silizium und D ₂ O schwächer als bei der reinen Probe.	127
Abbildung 6.2: Einfluss von 2 nm AuNPs auf die CH ₂ - und Amid-I-Banden einer Probe von DMPC-Oligobilagen mit 10% GramD-Anteil. Der Einzug zeigt die zeitliche Änderung der symmetrischen CH ₂ -Streckschwingungsbande und der Amid-I-Bande nach Zugabe der AuNP. Die Spektren zeigen den Zustand vor Zugabe (schwarz), sowie das letzte gemessene Spektrum nach Zugabe (rot).	128
Abbildung 6.3: Einfluss von 2 nm AuNPs auf die CH ₂ - und Amid-I-Banden einer Probe von Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD-Anteil. Der Anteil der Lipide besteht zu 70% aus DMPC und 30% aus Chol. Der Einzug zeigt den zeitlichen Verlauf der Intensität der symmetrischen CH ₂ -Streckschwingungsbande und der Amid-I-Bande nach Zugabe von AuNPs, wobei die Werte letzterer zugunsten der Übersichtlichkeit versetzt abgebildet werden.	130
Abbildung 6.4: Erhaltene NR-Profile von Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD auf Si-Substraten unter D ₂ O und nach Zugabe von AuNP. Der Lipid-Anteil bestand aus einer Mischung von DMPC und Chol im Verhältnis 4 : 1. Anpassungen nach dem in Tabelle 6.2 beschriebenen Modell sind als transparente Linien eingezeichnet. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 6.3 zu finden.	135
Abbildung 6.5: Erhaltene ATR-FTIR-Spektren von Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD auf Si-Substraten unter D ₂ O und nach Zugabe von AuNP. Der Lipid-Anteil bestand aus einer Mischung von DMPC und Chol im Verhältnis 4 : 1. Die Spektren wurden mithilfe einer polynomiellen Anpassungen basislinienkorrigiert und anschließend auf die Bandenintensität der asymmetrischen CH ₂ -Valenzschwingungsbande normiert. Der Einzug zeigt die Entwicklung beider CH ₂ -	

Valenzschwingungsbanden, sowie der Amid-I-Bande nach Anpassung mit Lorentz-Funktionen, wobei alle Verläufe auf ihren jeweiligen Wert bei der Messung unter D2O normiert wurden.	136
Abbildung 6.6: Einfluss von 50 mM MgCl ₂ auf Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD unter D2O, beobachtet durch simultane Untersuchung mit NR und ATR-FTIR über 10,5 h. Der Lipid-Anteil der Probe bestand aus einer Mischung von DMPC und Chol im Verhältnis 4 : 1. A Beobachtete Änderung an NR-Profilen der Probe. Durch an Lipid-Kopfgruppen angelagerte Mg ²⁺ -Ionen induziertes Quellen der Probe wird der Bragg-Peak in den NR-Profilen zu kleinen Streuvektoren Q verschoben. Der Einzug zeigt den anhand der Position des Bragg-Peaks bestimmten Quellfaktor Sw2 der Probe. B Entwicklung der simultan gemessenen ATR-FTIR-Spektren. Sowohl die CH ₂ -Banden als auch die Amid-I-Bande zeigen eine Abnahme der Bandenintensität, während keine relevanten Änderungen an den Bandenformen zu beobachten sind. Der Einzug zeigt den zeitlichen Verlauf der nach Anpassung mit Lorentz-Funktionen bestimmten Bandenintensitäten der symmetrischen CH ₂ -Bande und der Amid-I-Bande. Beide Verläufe wurden mit einem exponentiellen Abfall angepasst, die erhaltenen Verläufe sind als Linien eingezeichnet.	138
Abbildung 6.7: Beschichtung von Si-Substraten mit Octadecyltrichlorsilan. A ATR-FTIR-Spektrum eines ATR-Kristalls nach Beschichtung. Die Octadecyltrichlorsilan- Beschichtung ist anhand der Schwingungsbanden im CH ₂ -Bereich zu erkennen. Aufgrund der geringen Dicke der Beschichtung sind auch Etalons, sowie H ₂ O-Rotationsbanden und CO ₂ -Schwingungsbanden deutlich zu erkennen. B XRR-Profil einer frisch präparierten Beschichtung zeigt einen Peak bei $Q = 0,109 \text{ \AA}^{-1}$. C Bild eines beschichteten Si-Wafers nach Benetzung mit vollentsalztem Wasser. Die Wassertropfen zeigen Kontaktwinkel nahe 90°, was für eine ausgeprägte Hydrophobie der Oberfläche spricht.	141
Abbildung 6.8: ATR-FTIR-Spektrum von GramD , adsorbiert auf Beschichtung aus Octadecyltrichlorsilan auf Silizium. A Spektrum der Probe in trockenem Zustand mit Bandenzuordnung. B Änderung des Spektrums bei Manipulation der Probenumgebung. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurden die einzelnen Spektren versetzt gezeichnet. Die mit der Probe assoziierten Banden zeigten nur vernachlässigbar kleine Änderung bei den untersuchten Messbedingungen.	142
Abbildung 7.1: ATR-FTIR-Spektren einer Probe von 30% Chol, 68,6% DMPC und 1,4% DMPG auf ATR-Kristall, präpariert via Rotationsbeschichtung. Chol stabilisierte die Probe ausreichend, sodass die Lipid-Oligobilagen beim Befüllen der Flüssigkeitszelle mit PBS-Pufferlösung in D2O erhalten blieb. Trotz Präsenz des negativ geladenen Lipids konnte keine Anlagerung von CytC beobachtet werden.	147
Abbildung 7.2: Adsorption von Lipid-Vesikeln aus 70% DMPC und 30% DMPG auf Silizium-Oberflächen und anschließende Adsorption von CytC, untersucht mit ATR-FTIR-Spektroskopie. A Entwicklung der typischen CH ₂ - und Carbonyl-Schwingungsbanden von Lipiden nach Zugabe der Vesikel zu der mit dem Kristall in Kontakt stehenden Flüssigphase. Der Einzug zeigt die zeitliche Entwicklung der Intensität der markierten symmetrischen CH ₂ -Streckschwingungsbande. B Nach Zugabe von CytC wurde das Entstehen von Amid-Banden beobachtet. Der Einzug zeigt die zeitliche Entwicklung der markierten Amid-I-Bande.	148
Abbildung 7.3: Auswirkungen der Zugabe und anschließender Verdünnung von CytC auf ATR-FTIR-Spektren von durch Vesikelfusion präparierten Lipid-Bilagen aus 70% DMPC und 30% DMPG. Die Reduktion der Proteinkonzentration auf ein Viertel des ursprünglichen Wertes resultierte in einer Abnahme der Intensität der Amid-I-Bande um 27%, was für eine teilweise irreversible Bindung des Proteins an die Oberfläche der adsorbierten Lipid-Schicht spricht. Der Einzug zeigt die Detailansicht der Amid-I-Bande. Eine anschließende Zugabe von AuNP hatte keinen sichtbaren Effekt auf das gemessene Spektrum.	150
Abbildung 7.4: ATR-FTIR-Spektren von CytC auf einem ATR-Kristall mit Octadecylsilan-Beschichtung. Nach Zugabe des Proteins entstand ein Peak im Bereich der Amid-I-Banden, der nach anschließender Verdünnung abnahm. Gleichzeitig entstanden Oszillationen im Bereich der CH ₂ -Banden. Eine Zugabe von AuNPs hatte keinen nennenswerten Einfluss auf das IR-Spektrum.	151
Abbildung 8.1: Interaktion von Chymotrypsin mit GramD auf einem mit einer Octadecylsilan-Beschichtung versehenem ATR-Kristall unter D2O, untersucht mit ATR-FTIR-Spektroskopie. Die	

dargestellten Spektren wurden über eine Spline-Anpassung basislinienkorrigiert. Erste negative Absorptionsbanden im Bereich der CH_2 -Streckschwingungsbanden waren nach Zugabe von insgesamt 0,2 u Chymotrypsin zu erkennen, jedoch blieb die Amid-I-Bande unbeeinflusst. Eine weitere Zugabe des Enzyms hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die erhaltenen IR-Spektren.	154
Abbildung 8.2: Interaktion von Chymotrypsin mit CytC auf Lipid-Bilagen, hergestellt durch Fusion von Lipid-Vesikeln aus 70% DMPC und 30% DMPG, untersucht mit ATR-FTIR-Spektroskopie. Alle Messungen fanden unter PBS-Puffer in D2O statt. Die dargestellten Spektren wurden über eine Spline-Anpassung basislinienkorrigiert. Die Zugabe von Chymotrypsin zur Flüssigphase führte zu einer Abnahme der mit dem adsorbiertem Membranprotein assoziierten Amid-I-Bande. Eine weitere Zugabe von Chymotrypsin führte zur deutlichen Zunahme der Bandenintensität, was auf eine Anlagerung des Enzyms an die Lipid-Bilage hinweist. Der Einzug zeigt die Detailansicht der Amid-I-Bande ohne Versatz der drei dargestellten Spektren.	156
Abbildung 8.3: Spektrum von 1,0 mg/ml SR-Membranen in 1 mM Triethanolamin in D2O (pH = 7,4) nach Adsorption auf ATR-Kristall. Es sind Schwingungsbanden in den typischen Regionen der CH_2 -Valenzschwingung, sowie der Amid-I-, Amid-II- und Amid-A-Banden zu erkennen. Amid-A- und Amid-I-Banden überlagern dabei mit der Valenz-, respektive Deformationsschwingung von H_2O , welches durch die Stammlösung der Membranen dem System zugeführt wurde. Eine Verdünnung der Flüssigphase auf 0,125 mg/ml SR-Membranen zeigte keine nennenswerten Änderungen im Bereich der Amid-I-Bande, jedoch negative Banden im $\nu\text{H}_2\text{O}$ -Bereich und eine Zunahme der Amid-II-Bande. Die Spektren wurden zur besseren Sichtbarkeit der Banden versetzt eingezeichnet.	157
Abbildung 8.4: Abbau auf ATR-Kristall adsorbierter SR-Membranen durch 0,02 u Chymotrypsin, beobachtet über 15 h. Der Einzug zeigt den zeitlichen Verlauf der Absorption der asymmetrischen CH_2 -Valenzschwingungsbande und der Amid-I-Bande, normiert auf die jeweiligen Ausgangswerte, sowie die Anpassung beider Verläufe mit der Funktion eines exponentiellen Abfalls.	158
Abbildung 8.5: Abbau auf ATR-Kristall adsorbierter SR-Membranen durch 8 u Chymotrypsin, beobachtet über 1,5 h. Der Einzug zeigt den zeitlichen Verlauf der Absorption der asymmetrischen CH_2 -Valenzschwingungsbande und der Amid-I-Bande, sowie die Anpassung beider Verläufe mit der Funktion eines exponentiellen Abfalls. Der zeitliche Verlauf ersterer wurde gegen den erhaltenen Grenzwert normiert, der letzterer gegen den durch die Anpassung erhaltenen Wert bei $t = 0$	160
Abbildung 9.1: A Seitenansicht der verwendeten Proben im Probenhalter. Durch das Einspannen dünner Glasplättchen wird ein reproduzierbarer, kleiner Abstand der Silizium-Bruchstücke gewährleistet. Die Benetzung der Probe erfolgt durch die so entstehenden Kapillarkräfte. Eine Klammer aus Delrin, sowie ein Probenhalter mit Rändelschraube gewährleisten eine stabile Befestigung der Probe während der Messung. B Schematische Aufsicht für eine Messung am Instrument D16. Die Probe wird mittels einer fixierten Neutronenquelle beleuchtet, während der Messung werden der Probenwinkel θ und der Detektorwinkel Γ variiert. ^[49]	165
Abbildung 9.2: Beispielhafte Auswertung einer Messung von DMPC-Multilagen unter 50% RH. A Rohdaten. Die eingezeichnete Linie entspricht der Bedingung spekularer Reflexion und wird aus den Messparametern erhalten. Anhand dieser erfolgt anschließend die Kalibration der Ω - und Γ -Achsen für die Darstellung in Abbildung B. B Rohdaten nach Kalibration und Löschen der Beiträge des Direktstrahls. C Auftragung der kalibrierten Daten in $Q_z/Q_{\parallel}$ -Darstellung. Der Verlauf spekularer Reflexion ($Q_{\parallel} = 0$) ist mit einem gestrichelten Kasten markiert. D Extrahierte spekulare Reflexion der Probe.	166
Abbildung 9.3: Auswertung der erhaltenen Daten aus der Messung von DMPC-Multilagen unter 50% RH. Da ein Bragg-Peak 2. Ordnung nicht zu erkennen ist erfolgte die Auswertung am Peak 3. Ordnung. A Darstellung Q_z gegen $Q_{\parallel}$. Die spekulare Reflexion ist mit einem gelben Kasten markiert, das untersuchte Bragg-Sheet mit einem orangenen. B Spekulares Reflexionsprofil der untersuchten Probe. C Erhaltene Bragg-Sheet-Intensitäten und Simulation der Datenpunkte. D Erhaltene Bragg-Sheet-Breite und Simulation der Datenpunkte.	168
Abbildung 9.4: Auswertung der erhaltenen Daten aus der Messung von DMPC-Multilagen unter 95% RH. Der Bragg-Peak 2. Ordnung zeigt bestand aus zwei nicht isolierbaren Peaks, was die Auswertung	

erschwerte. Diese erfolgte deshalb am Peak 3. Ordnung. A Darstellung Qz gegen Q . Die spekulare Reflexion ist mit einem gelben Kasten markiert, das untersuchte Bragg-Sheet mit einem orangenen. B Spekulares Reflexionsprofil der untersuchten Probe. C Erhaltene Bragg-Sheet-Intensitäten und Simulation der Datenpunkte. D Erhaltene Bragg-Sheet-Breiten und Simulation der Datenpunkte....	169
Abbildung 9.5: Auswertung der erhaltenen Daten aus der Messung von DMPC-Multilagen unter D ₂ O. Der zur Auswertung geeignete Bragg-Peak 2. Ordnung zeigt eine geringe Intensität, die durch die Simulation nicht angepasst werden kann. Die Auswertung ist somit nicht verlässlich möglich. A Ausschnitt der Darstellung von Qz gegen Q . Die spekulare Reflexion ist mit einem gelben Kasten markiert, das untersuchte Bragg-Sheet mit einem orangenen. B Spekulares Reflexionsprofil der untersuchten Probe. C Erhaltene Bragg-Sheet-Intensitäten und Simulation der Datenpunkte. D Erhaltene Bragg-Sheet-Breiten und Simulation der Datenpunkte. Die aus den Rohdaten extrahierten Daten sind stark verrauscht.	173
Abbildung 9.6: A Auftragung aller spekularen Messungen der DMPC-Multilagen unter PAH. Die drei Bereiche, in denen Bragg-Peaks gefunden wurden sind mit farbigen Kästen markiert. B Bilagenabstände der nach A bestimmten Peakpositionen unter der Annahme, dass es sich bei den mit gleicher Kastenfarbe umrandeten Peaks um dieselbe Bragg-Peak Ordnung handelt. Die Farben der Kurven entsprechen denen der Kästen in A	174
Abbildung 9.7: Auswertung der erhaltenen Daten aus der Messung von DMPC-Multilagen unter PAH 58 kDa nach 60 h. Die Probe zeigt starkes Quellen. Aufgrund der nahe zusammenliegenden Bragg-Peaks ist eine verlässliche Auswertung nicht möglich. A Darstellung Qz gegen Q . Die spekulare Reflexion ist mit einem gelben Kasten markiert, das untersuchte Bragg-Sheet mit einem orangenen. B Spekulares Reflexionsprofil der untersuchten Probe. C Erhaltene Bragg-Sheet-Intensitäten und Simulation der Datenpunkte. D Erhaltene Bragg-Sheet-Breiten und Simulation der Datenpunkte....	175
Abbildung 9.8: Spekulare Reflexion der untersuchten Proben nach zwölf tägiger Inkubation mit HS. Zum Vergleich ist die spekulare Reflexion der in Abschnitt 9.2 beschriebenen Probe unter D ₂ O dargestellt.	177
Abbildung 9.9: A Auftragung der mechanischen Parameter der in Abschnitt 9.2 untersuchten Probe unter unterschiedlichen Bedingungen. B Zugehörige Modellvorstellungen zu den experimentellen Bedingungen. Durch erhöhte RH sind die DMPC-Kopfgruppen stärker hydratisiert, unter D ₂ O kommt es zur Ausbildung von Wasserzwichenschichten. Die Zugabe von PAH führt zu einem weiteren Quellen des Filmes, wobei sich die Polyelektrolyte an die Bilagen anlagern, in die Kettenschichten einlagern sowie sich in den Zwischenräumen aufhalten. ^[209]	178
Abbildung 12.1: Einfluss der Verkipfung des Probenstischs auf die erhaltenen IR-Spektren. A Verwendeter Prototyp des FIGARO-Aufbaus. Aufgrund defekter Fenster konnte das Detektorgehäuse nicht verwendet werden. B Skizze des Aufbaus aus Vogelperspektive mit eingezeichneten Drehachsen Φ und Δ . C/D Erhaltene Spektren bei Verkipfung des Probenstischs um Φ -, beziehungsweise Δ -Drehachse. Die Ausschnittsvergrößerungen zeigen die Spektren im Bereich der CH ₂ -Valenzschwingungsbanden und sind in den Gesamtspektren durch gestrichelte Kästen markiert. Die stark verrauschten Absorptionsbanden entstanden durch Absorptionen der Luft im Strahlengang und zeigen aufgrund fehlender Spülung mit Trockengas größere Schwankungen.	vii
Abbildung 12.2: Änderung des IR-Spektrums durch Drehung der Probe in Reflexions-Konfiguration. Alle Messungen nach erstmaliger Probenmanipulation zeigten deutlich das Auftreten von Etalons. ..	viii

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Typische Amid I Absorptionsbanden für Protein-Sekundärstrukturen. ^[65]	22
Tabelle 3.1: Für die vorliegende Arbeit verwendete Chemikalien. Wo nicht genannt, wurde vom Hersteller keine Angabe zur Reinheit gegeben.	33
Tabelle 3.2: Parameter der verwendeten Verbindungen zur Modellierung von Reflektometrie-Profilen.	43
Tabelle 3.3: Übersicht der bei Modellierung der Reflexions-Profile verwendeten Größen.	43
Tabelle 3.4: Berechnung der Eindringtiefen des evaneszenten Feldes von IR-Strahlung bei der Anregungswellenzahl der CH ₂ -Valenzschwingungen unter einem Einfallswinkel von 45°.	47
Tabelle 4.1: Durch Anpassung der NR-Profile von DMPC-Oligobilagen in Kontakt mit D ₂ O erhaltene Parameter. Die Werte der iSLD l_{lip} wurden zur Berücksichtigung off-spekularer Streuung genutzt, weshalb sie höher als in der Literatur beschriebene Werte liegen. Das genutzte Modell entspricht dabei der in Abbildung 4.6 Vorstellung des Aufbaus der Oligobilagen, jedoch ohne eingelagertes Chol. Reproduziert mit Genehmigung. ^[16]	68
Tabelle 4.2: Lage der CH ₂ -Valenzschwingungsbanden. Erhalten aus den IR-Spektren der Proben bei 18 °C (Pβ'-DMPC) und 26 °C (Lα-DMPC) unter D ₂ O.	71
Tabelle 5.1: Verwendetes Modell zur Anpassung der XRR-Messungen von DMPC-Oligobilagen unter Luft. Eingetragene Zahlenwerte wurden der Literatur entnommen und bei Modellierung der XRR-Profile festgelegt, alle anderen Parameter wurden variiert. Gleichbenannte Parameter waren dabei verknüpft, sodass diese in allen äquivalenten Schichten identisch waren. Die Rauigkeit aller Grenzflächen wurde als identisch angenommen und angepasst, jedoch zugunsten der Übersichtlichkeit nicht eingetragen.	95
Tabelle 5.2: Erhaltene Parameter der Anpassungen von trockenen DMPC/Chol-Oligobilagen. Die Lochanteile γ_{Loch} der Bilagen wurden durch einen prozentualen Anteil des Substrats mit einer einzelnen adsorbierten Monolage simuliert. Die SLD der Kettenschicht ρ_{Kette} wurde durch Literaturwerten von DMPC-Kettengruppen ^[34] und Chol ^[141] unter Annahme einer idealen Mischung berechnet. Die Dicke der DMPC-Kettengruppe d_{Kette} , 100% DMPC wurde ebenso aus der Literatur entnommen, wohingegen dieser Parameter für gemischte Oligobilagen angepasst wurde. ^[34] Die Hydratisierung der Kopfgruppen ϕ_w , Kopf wurde anhand der angepassten SLD selbiger Schicht und Literaturwerten von trockenen DMPC-Kopfgruppen und H ₂ O berechnet.	99
Tabelle 5.3: Erhaltene Phasenübergangstemperaturen T_k nach Anpassung der beobachteten Verschiebungen der CH ₂ -Streckschwingungsbanden.	102
Tabelle 5.4: Verwendetes Modell zur Anpassung der Neutronenreflektometrie-Messungen an DMPC-Oligobilagen. Zahlenwerte stellen feste Parameter dar, alle anderen Parameter wurden zur Modellierung der NR-Profile angepasst. Identisch benannte Parameter sind zwischen den einzelnen Schichten verknüpft und somit die Anpassungswerte identisch. Die Dicken der hydratisierten Lipid-Schichten wurden der Literatur entnommen, ebenso die SLD der Kettenschichten, sowie die Parameter der Siliziumoxid-Schicht und der Silizium-Bulkphase. Die iSLD und Wasseranteile ϕ_w , l_{lip} wurden in allen Bilagen-Schichten gleich angenommen. Die ϕ_w der Wasserzwichenschichten ist auf 100% festgelegt, da es sich hier um Teile der Flüssigphase zwischen den Bilagen handelt. Die Rauigkeit σ wurde in an allen Grenzflächen als gleich angenommen und angepasst und ist deshalb zugunsten der Übersichtlichkeit hier nicht eingetragen.	105
Tabelle 5.5: Erhaltene Parameter der Anpassungen von DMPC-Oligobilagen bei Interaktion mit MgCl ₂ und AuNP unter Verwendung des in Tabelle 5.4 beschriebenen Modells. Der Quelfaktor der inneren Wasserzwichenschichten wurde über die Änderung der Dicke der inneren Wasserzwichenschicht $d_{w,i}$ der Probenbedingung i verglichen mit dem analogen Parameter der Messung unter D ₂ O $d_{w,D2O}$ nach $Sw_{2,i} = d_{w,2,i}/d_{w,D2O}$ berechnet. Zugunsten der Übersichtlichkeit wird nur der Quelfaktor der inneren Wasserzwichenschichten Sw_2 angegeben.	106

Tabelle 5.6: Angewandtes Modell zur Simulation der NR-Profile von DMPC-Oligobilagen mit 20% Chol-Gehalt. Im Vergleich zum in Abschnitt 5.3 beschriebenen Modell wurden die Parameter der Lipid-Kettengruppen gemäß Literaturangaben ^[34] unter Annahme einer gleichmäßigen Verteilung des Chol, sowie auf Basis der in Abschnitt 5.1 beschriebenen Voruntersuchungen angepasst. Aufgrund der angenommenen Deformierung der Kopfgruppen zur Abschirmung der hydrophoben Chol-Moleküle gegen die Flüssigphase wurde die Dicke der damit assoziierten Schicht dKopf für die Messung unter D2O mit angepasst. Für die anschließenden Probebedingungen wurde dieser Wert als Verknüpfung übernommen, sodass er für alle NR-Profile gleichzeitig optimiert wurde.	114
Tabelle 5.7: Erhaltene Parameter der Anpassungen von Oligobilagen aus 80% DMPC und 20% Chol bei Interaktion mit MgCl ₂ und AuNP unter Verwendung des in Tabelle 5.4 beschriebenen Modells. Die SLD der Flüssigkeitsphase pw wurde nur für die Messung unter D2O angepasst und für die anderen Zustände verknüpft, da aufgrund der Totalreflexionskante der NR-Profile keine signifikante Änderung des Parameters zu erwarten ist. Da für die Dicke der Kopfschichten dKopf in ersten Tests ebenso keine signifikanten Änderungen zu erkennen waren wurde für diesen Parameter analog verfahren. Die Anpassung der Profile erfolgte für alle Probenbedingungen gleichzeitig.	116
Tabelle 6.1: Erhaltene Parameter nach Anpassung des zeitlichen Verlaufs der in Abbildung 6.2 aufgeführten Bandenintensitäten mithilfe von Boltzmann-Funktionen.	130
Tabelle 6.2: Angewandtes Modell zur Untersuchung von Neutronenreflektometrie-Messungen an Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD-Gehalt. Der Lipid-Anteil bestand aus DMPC und Chol im Verhältnis 4 : 1. Wie auch Chol verzerrt GramD die Bilagenstruktur und ist hauptsächlich in den mit den Kettengruppen assoziierten Schichten lokalisiert. Im Gegensatz zu dem in Abschnitt 5.4 beschriebenen Modell konnte hier jedoch die Dicke der Kettengruppen-Schicht dKette nicht in Voruntersuchungen ermittelt werden, weshalb dieser Parameter für die Simulation mit angepasst wurde. Die SLD dieser Schicht wurde unter Annahme einer idealen Mischung und vollständigen Lokalisierung des Proteins in der Schicht berechnet. Hierfür wurde die SLD von GramD mithilfe von Literaturwerten berechnet. ^[144-145]	133
Tabelle 6.3: Erhaltene Parameter der Anpassungen von Lipid-Oligobilagen mit 10% GramD-Anteil bei Interaktion mit AuNP unter Verwendung des in Tabelle 6.2 beschriebenen Modells. Für die einzelnen Probebedingungen wurde eine kohärente Mischung aus unterschiedlichen Bilagenzahlen angenommen. Dabei wurde ein Anteil von jeweils 50% für die einzelnen Bilagenzahlen angenommen und alle äquivalenten Parameter für die anteiligen Modelle verknüpft. Eine Parameterverknüpfung zwischen den Modellen der einzelnen Probebedingungen fand nicht statt. Das kleine χ^2 der Messungen ab der hohen Konzentration der 2 nm AuNP kam durch eine geringere Zahl von Messpunkten zustande, da aufgrund fehlender relevanter Änderungen des Reflexionsprofils auf zeitaufwändige Messungen bis zu hohen Q verzichtet wurde.	134
Tabelle 6.4: Erhaltene Parameter nach Anpassung der in Abbildung 6.6 B dargestellten Absorptionsbanden mit einer Funktion des exponentiellen Abfalls.	139
Tabelle 7.1: Erhaltene Parameter nach Anpassung der in Abbildung 7.2 dargestellten Absorptionsbanden mit einer Funktion des exponentiellen Abfalls.	149
Tabelle 8.1: Erhaltene Parameter nach Anpassung der in Abbildung 8.4 dargestellten Absorptionsbanden mit einer Funktion des exponentiellen Abfalls.	159
Tabelle 8.2: Erhaltene Parameter nach Anpassung der in Abbildung 8.5 dargestellten Absorptionsbanden mit einer Funktion des exponentiellen Abfalls.	161
Tabelle 9.1: Bragg-Peaks und zugehörige Dicke der Wiederholeinheiten, ermittelt anhand der der spekularen Reflexion der Probe unter 95% RH.	171
Tabelle 9.2: Erhaltene Bilagenabstände und mechanische Parameter der untersuchten Probe bei Interaktion mit PAH.	176

Abkürzungsverzeichnis

ATR	Abgeschwächte Totalreflexion (attenuated total reflection)
AuNP	Gold-Nanopartikel
CH₂	Methylen
Chol	Cholesterol
CytC	Zytochrom C
D₂O	Deuteriumoxid, schweres Wasser
DCM	Dichlormethan
DMPC	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DMPG	1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerin
DPPC	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GramD	Gramicidin D
H₂O	(leichtes) Wasser
HS	Hyaluronsäure
HZB	Helmholtz-Zentrum Berlin
ILL	Institut Laue-Langevin
IR	Infrarot
iSLD	Imaginäre Streulängendichte
k.A.	Keine Angabe
LB	Langmuir-Blodgett
LS	Langmuir-Schäfer
MABr	<i>N,N,N</i> -trimethyl-(11-mercaptoundecyl)ammoniumbromid
MACl	<i>N,N,N</i> -trimethyl-(11-mercaptoundecyl)ammoniumchlorid
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
NP	Nanopartikel
NR	Neutronenreflektometrie
PAH	Polyallylamin-Hydrochlorid
PC	Phosphatidylcholin
PCI	Physikalisch-Chemisches Institut Heidelberg
PE	Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
QCM-D	Quarzkristall-Mikrowaage mit Schwingungsdämpfung (quartz crystal microbalance with dissipation monotoring)
RCA	Radio Corporation of America
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RH	Luftfeuchtigkeit (relative humidity)
SAM	Selbstorganisierte Monoschicht (self-assembled monolayer)
SE	Spektrale Ellipsometrie
Si	Silizium
SLD	Streulängendichte
THF	Tetrahydrofuran
XRR	Röntgenreflektometrie (X-ray reflectometry)

Eidesstattliche Erklärung

Bei der eingereichten Dissertation handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel (inkl. KI-basierter Hilfsmittel) benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Heidelberg, 14.05.2025

A handwritten signature in blue ink that reads "Christian Busch". The signature is fluid and cursive, with the first name "Christian" written in a standard script and the last name "Busch" written more stylized with a long, sweeping underline.

Christian Busch