

Universität Bielefeld

Fakultät für Physik

Bachelorarbeit

Selbstorganisation von Phospholipiden auf kristallinen Strukturen

am Beispiel von HOPG

Autorin: Marlén-Viviane Eickmann

Studiengang: Kombibachelor (Gymnasium/Gesamtschule): Physik (Hauptfach) und
Geschichte (Nebenfach)

Abgabedatum: 11.11.2016

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Dario Anselmetti

2. Gutachter: Herr Dipl.-Phys. Roland Hillmann

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
I Theoretische Grundlagen	2
I.1 Amphiphile Moleküle	2
I.1.1 Phospholipide	3
I.1.2 Selbstorganisierende Monolagen	4
I.2 Langmuir-Blodgett Trog	5
I.2.1 Wilhelmy-Plättchen Methode	6
I.2.2 Lipid-Assemblierung	8
I.2.3 Übertragungsverfahren	10
I.2.4 Typen von Multilagen	11
I.3 Rasterkraftmikroskopie	12
I.3.1 Aufbau und Funktionsweise	13
I.3.2 Betriebsmodi	15
II Materialien und Methoden	17
II.1 Tabellarische Übersicht	17
II.2 Proben	18
II.3 Methodik und Präparation	20
III Ergebnisse und Diskussion	24
III.1 Monolagen auf HOPG	24
III.2 Monolagen auf Mica	38
Fazit	40
Abbildungsverzeichnis	41
Tabellenverzeichnis	43
Literaturverzeichnis	44

Einleitung

Nichts auf der Welt ist so vielseitig und atemberaubend, wie die Natur. Sie lädt uns zum Staunen ein und ist uns für viele bahnbrechende technische Erfindungen ein Vorbild: Von der Pustelblume zum Fallschirm, vom Pinguin zum U-Boot und von der Klette zum Klettverschluss.

Obwohl sich die Natur und ihre Tiere über viele Jahrtausende hinweg an die Gegebenheiten angepasst haben, erscheint uns vieles willkürlich. Doch um es mit Albert Einsteins Worten zu sagen: „Nichts kann existieren ohne Ordnung. Nichts kann entstehen ohne Chaos.“ Auch wenn uns die Natur häufig konfus und planlos erscheint, stellen wir immer wieder fest, dass hinter all dem „Chaos“ eine Regelmäßigkeit existiert. Diese Selbstordnung ist sowohl verblüffend, als auch notwendig, betrachtet man beispielsweise die Selbstorganisation eines Ameisenstaats auf der Suche nach Nahrung.

Auch in unserem Körper ist das selbstorganisierende Verhalten bestimmter Moleküle maßgeblich verantwortlich für unsere Existenz. So können sich die amphipathischen Phospholipide durch Selbstorganisation in Form einer Doppellage anordnen und dienen damit als Biomembran, also als Trennschicht zwischen den einzelnen Zellkompartimenten.

Erste Untersuchungen von PTPE auf HOPG haben eine Anordnung der Lipide in drei Vorzugsrichtungen gezeigt. Um die Ursache für dieses Verhalten zu untersuchen diskutiert diese Arbeit das Verhalten selbstorganisierender Lipide auf kristallinen Strukturen am Beispiel von HOPG.

Als Hinführung zu diesem Forschungsthema dient der erste Teil der Arbeit, „Theoretische Grundlagen“. Hier wird diskutiert, was Phospholipide genau sind und wie man ihre Selbstorganisation im Labor kontrolliert erzeugen und beeinflussen kann. Als eine Methode für die Generierung der selbstorganisierenden Lipidfilme wird der Langmuir-Blodgett Trog vorgestellt. Von diesem aus kann man den Lipidfilm auf jedes geeignete Substrat übertragen. Für die bildgebende Untersuchung dieses Films wird das Rasterkraftmikroskop verwendet. Durch ihre vielfältige und weitreichend unkomplizierte Einsatzmöglichkeit eröffnete diese Art der Messmethodik neue Türen für die Wissenschaft und hat sich bis heute in den Laboren sämtlicher Institutionen mit Forschungsgruppen zu kleinsten Teilchen etabliert.

I Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden sämtliche Grundlagen, die für das Verständnis dieser Arbeit erforderlich sind, diskutiert.

I.1 Amphiphile Moleküle

Auch bei den Amphiphilen ist es wie bei vielen Namen so, dass er uns bereits Aufschluss über die wichtigsten Eigenschaften des Benannten gibt. So ist der Name „Amphiphile“ eine Zusammensetzung der altgriechischen Adjektive ἀμφί (amphí), was so viel bedeutet wie „auf beiden Seiten“ und φίλος (phílos), was mit „liebend“ übersetzt werden kann. Und genau das ist es, was Amphiphile ausmacht: Sie haben sowohl einen hydrophilen, als auch einen lipophilen Bereich.



Abbildung 1: Skizze eines Amphiphils mit der hydrophilen Kopfgruppe (hier orangener Kreis) und der hydrophoben Schwanzgruppe.

Aufgrund dieser Eigenschaft kommt es bei den Amphiphilen zur hydrophoben Assoziation bei welcher sie die folgenden Aggregate bilden:

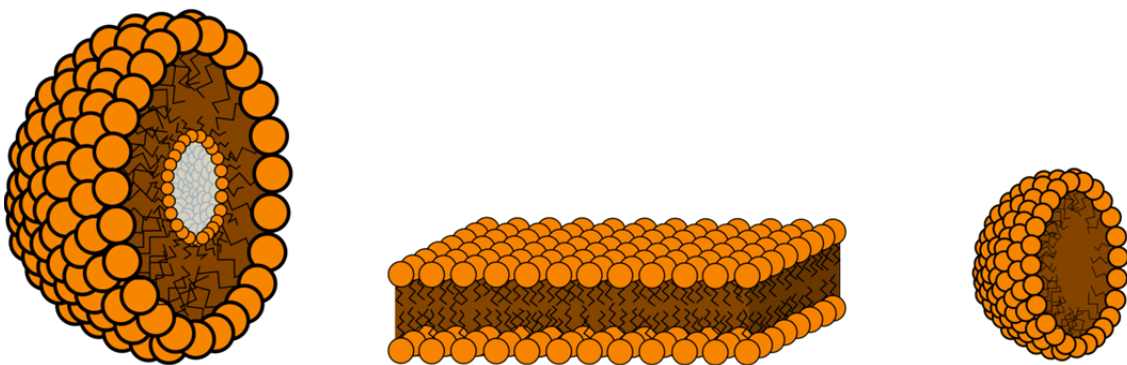


Abbildung 2: Darstellung eines Liposoms, einer Doppellage und einer Mizelle (v.l.n.r.).

So können sie beispielsweise die Struktur eines Balls einnehmen. Hierbei schließen sich die hydrophilen Kopfgruppen aneinander, wodurch die lipophilen Schwanzgruppen der

Amphiphile sowohl im Äußeren, als auch im Inneren der Kugel die Oberfläche bilden. Diese Form der Anordnung nennt man Liposom. Durch diese Struktur ist es möglich im Inneren ein Kompartiment¹ einzuschließen. Daher kann die Ausbildung von Liposomen als ein Modell für Zellen dienen. Diese Form der Anordnung ist anschaulich eine Kombination der Doppellipidschicht und der Mizelle. Bei der Doppellipidschicht schließen sich die lipophilen Bereiche flächendeckend zusammen, wodurch ein großer Teppich entsteht, dessen Oberflächen hydrophil sind. Die Mizelle ist eine weitere ballförmige Möglichkeit der Anordnung der Lipide im Wasser. Die hydrophilen Kopfgruppen schließen sich zu der Oberfläche des Balls zusammen und zeigen nach außen. Die hydrophoben Schwanzgruppen zeigen nach innen. Durch die Struktur der Mizelle befindet sich, anders als bei den Liposomen, im Inneren kein Kompartiment.²

Durch ihre Eigenart sind amphiphile Moleküle sowohl in polaren, als auch in unpolaren Lösungsmitteln löslich. Diese „Zwitter Eigenschaft“ macht sie zu einem sehr wertvollen Instrument für Mensch und Natur. Im Alltag begegnen wir ihnen beispielsweise in Form von Tensiden, die aufgrund ihrer amphipathischen Eigenschaft Schmutz leicht entfernen können und uns so als Seife fungieren. Auch Emulgatoren sind Amphiphile und finden in vielen Lebensmitteln Verwendung, da sie dafür sorgen, dass sich Flüssigkeiten, welche sich eigentlich nicht vermischen, zu einer Emulsion verbinden. Doch nicht nur in unserer Umwelt sind Amphiphile vertreten, auch in unserem Körper sind sie von großer Bedeutung: Die Phospholipide.

I.1.1 Phospholipide

Aufgrund ihrer amphipathischen Eigenschaft dienen Phospholipide der Trennung von Zellkompartimenten und sind somit Bestandteil der Biomembranen.

Eine Komponente des Phospholipids ist ein Glycerin-Molekül, welches dreifach verestert ist: Zweimal mit einem Acyl-Rest (Fettsäure-Rest) und einmal mit dem für die Phospholipide charakteristischen Phosphat-Rest, der wiederum weiter verestert sein kann.³ Dies soll an dem wohl geläufigsten Phospholipid „Palmitoyl-Oleoyl-Glycerin-

¹ Gleichbedeutend mit einem mit Wasser gefüllten Hohlraum.

² Vgl. G. F. Fuhrmann: Toxikologie für Naturwissenschaftler. Einführung in die Theoretische und Spezielle Toxikologie, Wiesbaden 2006, S. 42 f..

³ H. Plattner, J. Hentschel (Hrsg.): Zellbiologie. Stuttgart 1997 (4. Auflage 2011), S. 70.

Phosphatidyl-Trimethylethanolamin“ mit dem Trivialnamen Lecithin deutlich gemacht werden.

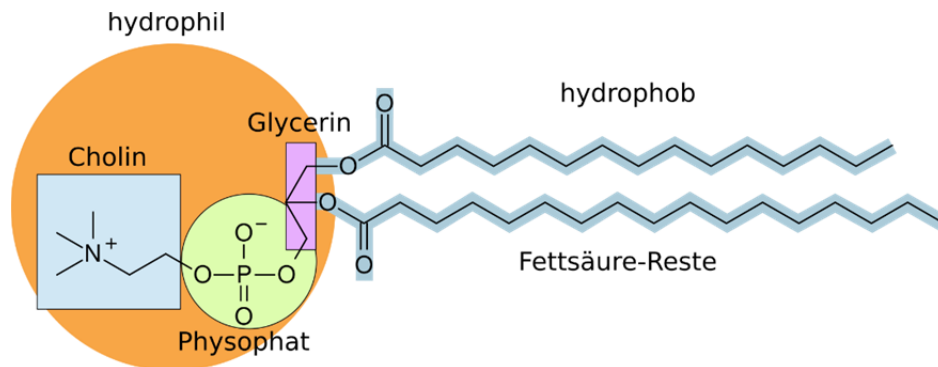


Abbildung 3: Strukturformel von Lecithin mit farblich gekennzeichnetem hydrophilen und hydrophoben Bereich.

Am Beispiel Lecithin (E322) wird die amphipathische Eigenschaft der Phospholipide deutlich gemacht (s. Abb. 3). Es besitzt zwei Schwanzgruppen, die Fettsäure-Reste, welche hydrophob sind. Die hydrophile Kopfgruppe setzt sich zusammen aus einer Glycerin-Gruppe, einem Phosphat-Rest und Cholin.

I.1.2 Selbstorganisierte Monolagen

Neben Mizellen, Vesikeln und Doppellagen ist es ebenfalls möglich, dass sich die Moleküle einzeln, nebeneinander anordnen. Den so entstandenen Film bezeichnet man als Monolage, da er, anders als die Doppellage, nur aus einer Schicht Lipide besteht. Folglich entspricht die Dicke dieser Schicht genau der Länge des verwendeten Moleküls.⁴ Geeignete Substanzen bilden auf Metallen wie Platin, Silber oder Gold, aber auch auf anderen glatten Oberflächen, wie zum Beispiel Glas, Graphit und Silicium von selbst Monolagen aus. Diese von den Substanzen eingenommene Struktur nennt man dann eine selbstorganisierte Monolage (engl. Self-assembled Monolayers, kurz SAM). In welchem Aggregatzustand sich das Molekül bei dem Kontakt mit dem Substrat befindet, ist hierbei irrelevant. Lediglich ihr Aufbau ist ausschlaggebend für dieses Phänomen: Sie besitzen eine Kopfgruppe, welche die bindende Wechselwirkung mit dem Substrat eingeht. An sie angeschlossen ist ein Fettsäurerest, der als Abstandhalter

⁴ Vgl. P. W. Atkins, J. de Paula (Hrsg.): Physikalische Chemie, 4. Auflage, Weinheim 2006, S. 761.

(engl. spacer) fungiert. Die Oberflächenstruktur der selbstorganisierten Monolage wird bestimmt von dem dritten Teil des Moleküls, der Endgruppe.⁵

Dieses selbstorganisierende Verhalten zeigen Moleküle, deren Fettsäurereste genügend lang sind, um miteinander Van-der-Waals-Wechselwirkung einzugehen. Im Idealfall sind die Monolagen dann so dicht, dass keine Lücken (engl. pinholes) entstehen, durch die eine Diffusion und Wechselwirkung mit dem Substrat möglich wäre. Solch eine makellose Schicht selbstorganisierender Moleküle lässt sich beispielsweise mit der Langmuir-Blodgett-Technik erzeugen.⁶

I.2 Langmuir-Blodgett Trog

An einer reproduzierbaren Technik, mit der es möglich war die Monolagen unversehrt auf ein Substrat zu übertragen, wurde lange gearbeitet. Eine erfolgreiche Methode wurde erstmals von Irving Langmuir und seiner wissenschaftlichen Mitarbeiterin Katharine Blodgett vorgestellt.⁷

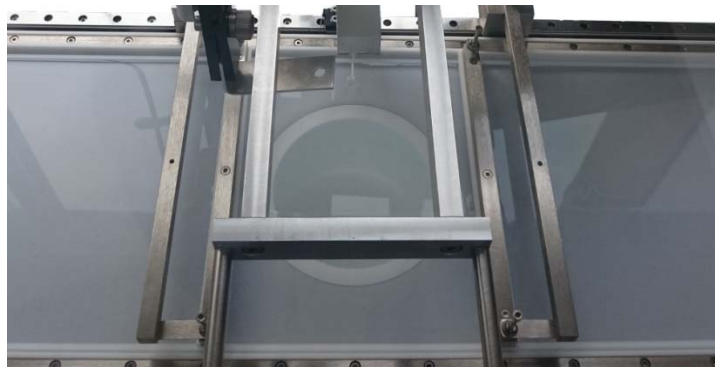


Abbildung 4: Von oben fotografierte Ausschnitt des mit Reinstwasser gefüllten Langmuir-Blodgett Trog.

⁵ Vgl. S. Gilles: Nanoimprint Lithographie als Methode zur chemischen Oberflächenstrukturierung für Anwendungen in der Bioelektronik, in: Forschungszentrum Jülich GmbH (Hrsg.): Schriften des Forschungszentrums Jülich, Bd. 19, Aachen 2010, S. 22 ff.

⁶ Vgl. P. Gründler: Chemische Sensoren. Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure, Berlin u.a. 2004, S. 94 f..

⁷ Der US- amerikanische Wissenschaftler Irving Langmuir wurde 1881 in Brooklyn, New York geboren und verstarb 1957. Für seine Forschung im Bereich der Oberflächenchemie wurde er 1932 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Für diese und weitere Informationen zu Irving Langmuir sei verwiesen auf G. Wise: Irving Langmuir. 1881–1957, in: P. A. Redhead (Hrsg.): Vacuum Science and Technology. Pioneers of the 20th Century, New York 1994, S. 79–82.

Der grundlegende Aufbau des Trogs ist bis heute gleichgeblieben. Es handelt sich hierbei um ein mit Wasser gefülltes Becken auf deren Wasseroberfläche sich ein oder zwei verstellbare Barrieren befinden. Mit diesen kann die Größe der eingeschlossenen Wasseroberfläche reguliert werden. Während Langmuir mit aus Löchern in den Barrieren strömender Luft eine Haftung der Lipide an ihnen verhindern wollte, bestehen die heutigen Tröge und Barrieren in der Regel aus Teflon oder einem mit Teflon beschichteten Metall.⁸

Für dieses Verfahren eignen sich alle Phospholipide, welche sich in einem flüchtigen Lösungsmittel lösen lassen. Dafür kommen alle organischen Lösungsmittel, wie zum Beispiel Chloroform, Hexan, Toluol etc. in Betracht. Die im Lösungsmittel gelösten Phospholipide können dann auf einen mit Reinstwasser gefüllten Trog aufgetragen werden. Durch ihren amphipathischen Charakter lagern sich die hydrophilen Kopfgruppen am Wasser an und die hydrophoben Schwanzgruppen zeigen vom Wasser weg. Durch Barrieren an beiden Seiten des Trogs können die Phospholipide zu einer kompakten Monolage komprimiert werden.⁹

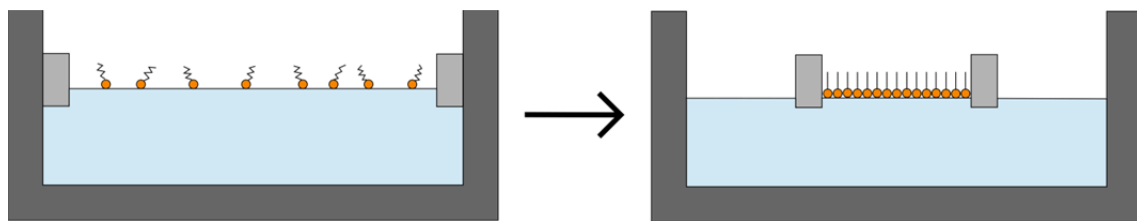


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Langmuir-Blodgett Trogs mit Amphiphilen in der gasanalogen Phase (links) und als komprimierte Monolage (rechts).

I.2.1 Wilhelmy-Plättchen-Methode

Für den gelungenen Übertrag einer Monolage vom Trog auf ein Substrat spielt der Oberflächendruck π eine große Rolle.¹⁰ Dieser setzt sich zusammen aus der Oberflächenspannung des Wassers γ_{Wasser} abzüglich der Oberflächenspannung des Films γ_{Monolage} und lautet im Idealfall

⁸ Vgl. K. S. Birdi: Lipid and biopolymer monolayers at liquid interfaces, New York 1989, S. 31.

⁹ Vgl. S. A. Hussain: Langmuir-Blodgett Films a unique tool for molecular electronics, 2009, S. 3 ff..

¹⁰ Vgl. im Folgenden Birdi, S. 32 f..

$$\Delta F = (\gamma_{\text{Wasser}} - \gamma_{\text{Monolage}}) \cdot 2(b + t) \approx 2 \cdot \pi \cdot b$$

$$\Rightarrow \pi = \gamma_{\text{Wasser}} - \gamma_{\text{Monolage}} \approx \frac{\Delta F}{2b}$$

Eine Möglichkeit den Oberflächendruck zu messen ist die Wilhelmy-Plättchen-Methode. Hierzu wird ein kleines Plättchen, beispielsweise aus Platin, Glas, Mica oder Filterpapier, in das mit Wasser gefüllte Becken eingetaucht. Um den obigen Idealfall zu erhalten, ist die Tiefe t des Plättchens sehr klein gegenüber seiner Breite b zu wählen. Zudem soll der Winkel α , der durch die Oberflächenspannung des Wassers zwischen Wasser und Plättchen eingeschlossen ist, minimal sein.

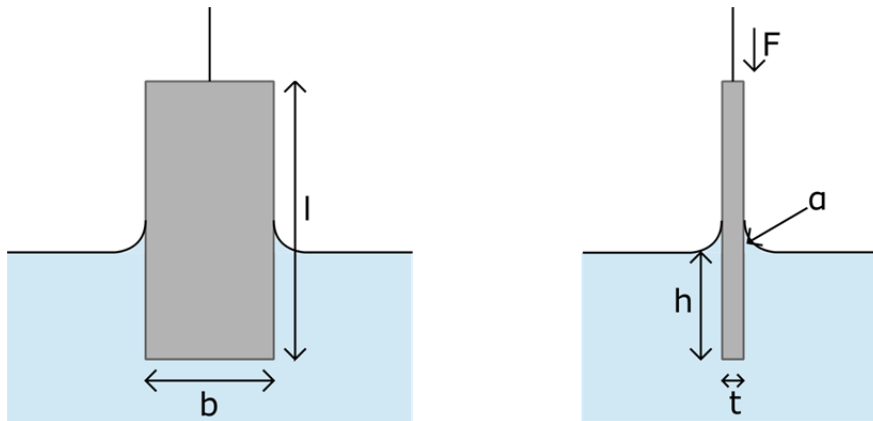


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Wilhelmy-Plättchens in Wasser.

Auf das Plättchen wirkt die Kraft

$$F = \underbrace{\rho_P \cdot l \cdot b \cdot t \cdot g}_{\text{Gravitationskraft}} + \underbrace{2(b + t) \cdot \gamma \cdot \cos(\alpha)}_{\text{Oberflächenspannung}} - \underbrace{\rho_S \cdot h \cdot b \cdot t \cdot g}_{\text{Auftrieb}}$$

Sie setzt sich zusammen aus der Gewichtskraft mit der Dichte des Plättchens ρ_P und der Oberflächenspannung abzüglich des Auftriebs mit der Dichte der Subphase ρ_S .

I.2.2 Lipid-Assemblierung

Wurden die in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel gemischten Amphiphile auf die Wasseroberfläche aufgetragen und hat sich das Lösungsmittel verflüchtigt bleiben nur noch die Amphiphile auf der Wasseroberfläche zurück. Diese können dann mit Hilfe der Barrieren zu einer geordneten Monolage komprimiert werden (s. Abb. 5). Diesen Vorgang kann man mit Hilfe des Wilhelmy-Plättchens und geeigneten Messinstrumenten am Computer verfolgen. Hält man die Temperatur konstant und trägt den lateralen Oberflächendruck π gegen die „Fläche pro Molekül“ A auf, so ist eine Isotherme zu sehen, die die verschiedenen Stadien, welche die entstehende Monolage während der Kompression durchläuft, darstellt.¹¹

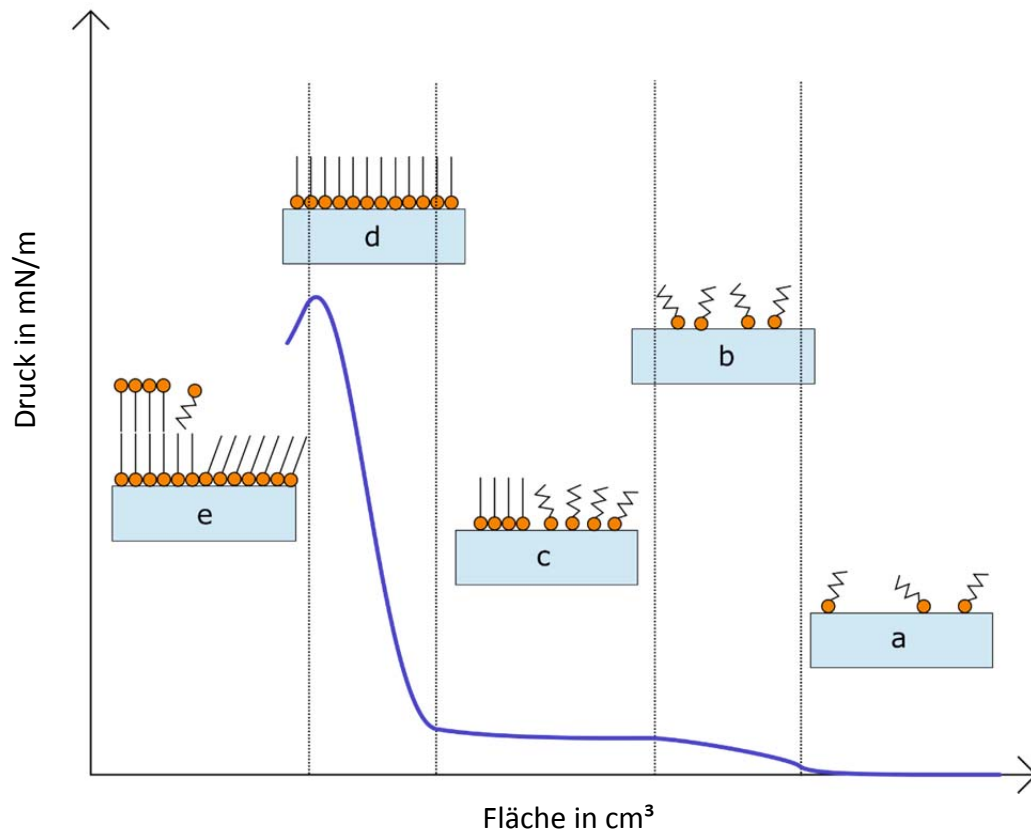


Abbildung 7: Charakteristischer Verlauf des Komprimierungsvorgangs.

¹¹ Vgl. hier und im Folgenden Dissertation von H. Müller: Polymerisierbare und polymere Langmuir-Blodgett-Monoschichten zur gezielten Kalziumcarbonatkristallisation an der Luft-Wasser-Grenzfläche, Mainz 2006, S. 6ff..

- **a) Gasanaloge Phase:** In dieser Phase beeinflussen sich die Moleküle nicht gegenseitig in ihrer Position und wechselwirken idealerweise auch nicht miteinander. Sie haben die Gelegenheit sich frei auf der gesamten Fläche des Wasserfilms zu spreiten. Aufgrund der praktisch wechselwirkungsfreien Ausbreitungsmöglichkeiten der Moleküle kann man diesen Zustand mit den Bedingungen eines idealen Gasgemisches vergleichen. Diese Analogie verleiht dieser Phase ihren Namen.

- **b) Flüssiganaloge Phase:** Wird die Oberfläche langsam weiter reduziert, macht sich ein leichter Anstieg in der Isotherme bemerkbar. Dieser liegt darin begründet, dass die Moleküle den gasartigen Zustand verlassen und miteinander in Wechselwirkung treten. Es findet jedoch noch keinerlei Fernordnung statt.

- **c) Koexistenzbereich:** Es folgt ein breiterer Abschnitt, in dem zwei Zustände nebeneinander existieren: Ein Teil der Moleküle befindet sich noch in der flüssiganalogen Phase, der andere Teil ist bereits dicht gepackt. Hier steigt der Lateraldruck quasi nicht an, obwohl die Fläche um einen großen Bereich reduziert wird. Dieses Verhalten zeigen jedoch nicht alle Substanzen.

- **d) Festanaloge Phase:** Man beobachtet nun einen plötzlichen, starken Anstieg des Lateraldrucks, obwohl die Fläche nur minimal verkleinert wird. Die Moleküle haben den Koexistenzbereich überwunden und ordnen sich zu einer dichten Monolage an. Da diese dichte Packung an die Struktur eines Kristalls erinnert, nennt man dieses Stadium auch die kristallanaloge Phase.

- **e) Filmkollaps:** Komprimiert man die entstandene Monolage immer weiter, so kommt es zum Filmkollaps. Dabei verlassen die Moleküle ihre geordnete Struktur und bilden durch die zu starke Kompression Vesikel oder Multilagen. Ist dieser Punkt erreicht, ist kurze Zeit später ein Abfall des Lateraldrucks zu beobachten, da die Vesikel nun nicht mehr an der Wasseroberfläche zu finden sind und in die Subphase abtauchen. Auch benötigt eine Doppellage deutlich weniger Platz, was ebenfalls zu einem Absinken des Flächendrucks führt.

I.2.3 Übertragungsverfahren

Bricht man die Komprimierung vor dem Eintreten des Filmkollapses ab, so lässt sich die entstandene Monolage auf ein geeignetes Substrat übertragen. Die Art der Übertragung ist von dem Substrat abhängig. Es hat sich herausgestellt, dass sich für eine gleichmäßige Übertragung von Proteinen der Langmuir-Schaefer Übertrag besser eignet, als der Langmuir-Blodgett Übertrag.¹² Diese beiden Übertragungsmöglichkeiten unterscheiden sich lediglich in der Ausrichtung, in welcher das Substrat in die Subphase mit der Monolage getaucht wird. Während bei dem geläufigeren Langmuir-Blodgett Übertrag dieser durch senkrechtes Einführen des Substrats in die Subphase erzeugt wird, verläuft der Langmuir-Schaefer Übertrag durch ein horizontales auf die Monolage „dippen“. Dadurch können sich die hydrophoben Schwanzgruppen an das entsprechende Substrat binden.¹³

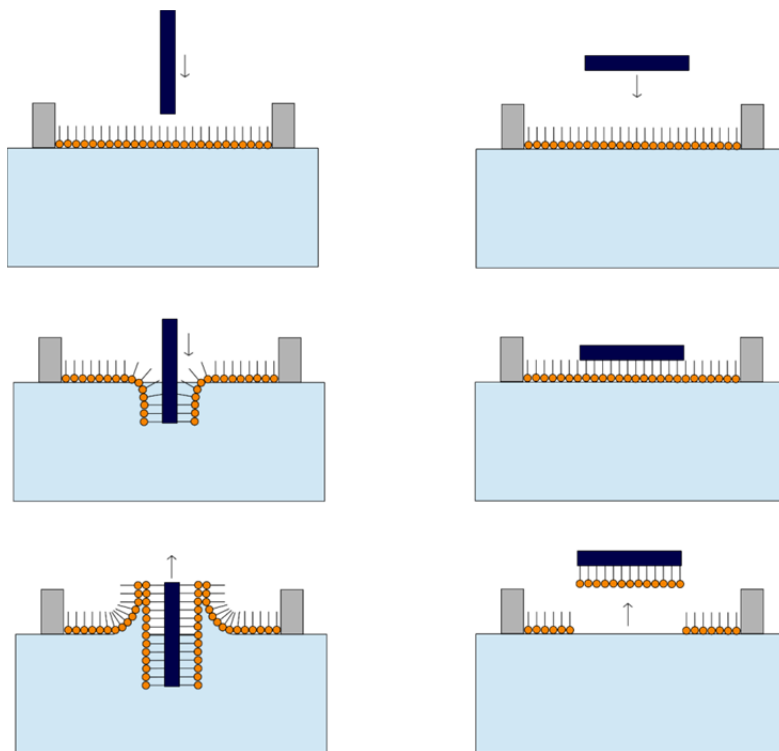


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Langmuir-Blodgett Übertrags (links) und Langmuir-Schaefer Übertrag (rechts).

Je nachdem, mit welcher Methode die Monolage auf das Substrat übertragen wurde, handelt es sich um einen Langmuir-Schaefer oder einen Langmuir-Blodgett Film.

¹² Vgl. R. M. Leblanc, Q. Huo: Langmuir and Langmuir-Blodgett films of proteins and enzymes, in: P. Somasundaran: Encyclopedia of surface and colloid science, Bd. 2, New York 2006, S. 3235.

¹³ Vgl. ebd..

I.2.4 Typen von Multilagen

Um die Monolage auf ein hydrophobes Material zu übertragen wählt man die Langmuir-Schaefer Methode. Ist es nicht von Belang eine einzelne Monolage zu erhalten, kann man die Monolage auch mit Hilfe der Langmuir-Blodgett Technik auf ein hydrophobes Substrat übertragen. Dabei bildet sich mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Doppelschicht durch den Vorgang des Herein- und Herausführen des Substrats, wie im folgenden Fall der Y-Beschichtung gezeigt.

Es gibt drei anerkannte Varianten Langmuir-Blodgett Filme zu erzeugen:¹⁴

- **X-Beschichtung:** Bei dieser Art der Beschichtung wird das hydrophobe Substrat in die Subphase mit der Monolage getaucht, woraufhin sich die hydrophoben Schwanzgruppen an das Substrat binden. Beim Herausziehen aus der Subphase lagern sich jedoch keine Moleküle an der Oberfläche an. Durch Wiederholen dieses Vorgangs entsteht die Multilage.

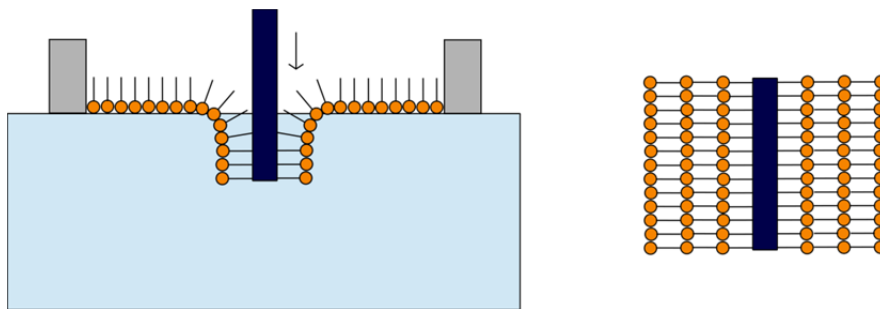


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Herstellungsverfahrens einer X-Beschichtung.

- **Y-Beschichtung:** Diese Methode ist sowohl für hydrophile, als auch für hydrophobe Materialien geeignet. Damit ist es die am meiste verwandte Art um Multilagen zu erzeugen. Hierbei wird das Substrat in die Subphase mit der Monolage getaucht und sowohl beim Eintauchen, als auch beim Herausziehen, lagern sich die Kopf- beziehungsweise Schwanzgruppen der Amphiphile an dem Substrat, beziehungsweise an den Molekülen, an.

¹⁴ Vgl. im Folgenden: G. Roberts (Hrsg.): Langmuir-Blodgett Films. New York 1990, S. 95f..

Dies geschieht erst beim Herausziehen des Substrats aus der Subphase, wobei sich die hydrophilen Kopfgruppen der Monolage an dem Substrat anlagern.

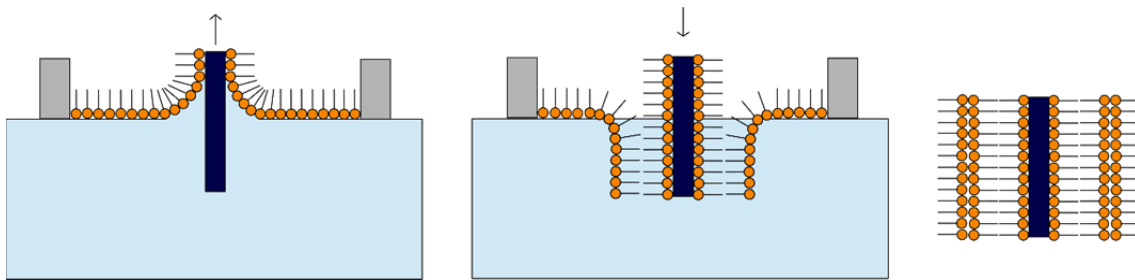


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Herstellungsvorgangs einer Y-Beschichtung.

- **Z-Beschichtung:** Beim Eintauchen in die Subphase mit der Monolage wird bei dieser Art kein Molekül übertragen. Dies geschieht lediglich beim Herausführen der Probe aus der Subphase, wobei sich die hydrophilen Kopfgruppen an dem Substrat anlagern. Daher ist diese Art der Beschichtung nur für hydrophile Substrate sinnvoll. Durch Wiederholen dieses Vorgangs entsteht die Multilage.

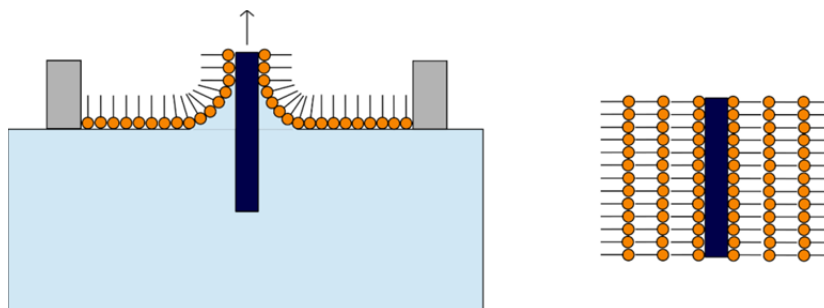


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Herstellungsvorgangs einer Z-Beschichtung.

I.3 Rasterkraftmikroskopie

Um Atome und Moleküle sichtbar zu machen, stellten Gerd Binnig, Christoph Gerber und Calvin F. Quate 1986 der wissenschaftlichen Welt das sogenannte Rasterkraftmikroskops (engl.: atomic force microscope, kurz: AFM) vor.¹⁵ Wie der Name bereits ver-

¹⁵ Vgl. G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber: Atomic Force Microscope, in: Physical Review Letters, vol. 56, 1986, S. 930-933.

muten lässt, handelt es sich hierbei nicht um ein optisches Mikroskop, sondern um eine Weiterentwicklung des 1982 von Binning und seinen Kollegen entwickelte Rastertunnelmikroskop (engl.: scanning tunneling microscope, kurz: STM)¹⁶. Dieses brachte die wissenschaftlichen Untersuchungen damals ebenfalls einen großen Schritt voran. Doch anders als das STM, dessen Messungen lediglich auf leitenden Materialien funktionieren, kann das AFM (theoretisch) auf jeder Oberfläche eingesetzt werden; sowohl *in vivo*, als auch *in vitro*. Diese revolutionäre Eigenschaft macht das AFM besonders in dem Bereich der Biophysik zu einem wertvollen Messinstrument.

I.3.1 Aufbau und Funktionsweise

Der schematische Aufbau des Rasterkraftmikroskops ist in Abbildung 11 zu erkennen.

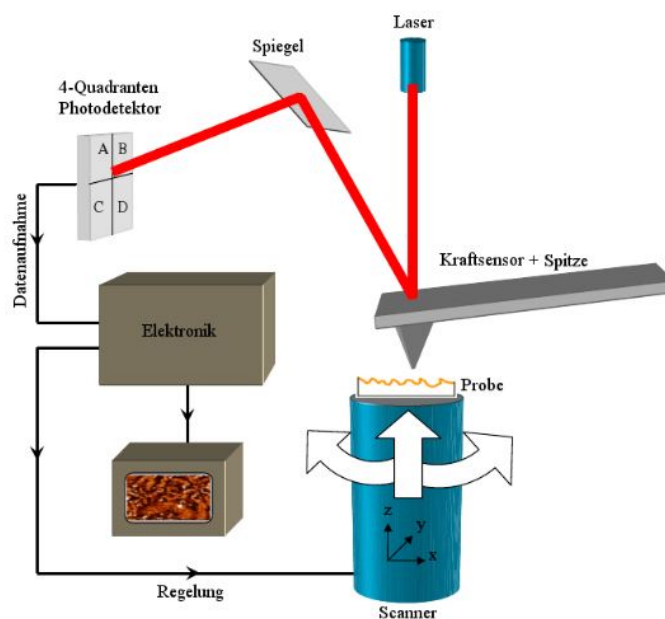


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.¹⁷

Das Herzstück jedes Rastersondenmikroskops ist die Messsonde. Im Fall des Rasterkraftmikroskops ist es der Kraftsensor. Dieser besteht aus einem kleinen Federbalken (engl. cantilever) an dessen Ende eine Spitze (engl. tip) angebracht ist.

¹⁶ Für die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops wurde sowohl Gerd Binnig, als auch Heinrich Rohrer im Jahr 1986 der Nobelpreis in Physik verliehen., Vgl. W. Mäntele: Biophysik, Stuttgart 2012, S. 258 f..

¹⁷ Grafik entnommen aus der Diplomarbeit von C. Harder: Kraftmikroskopische und kraftspektroskopische Untersuchungen an Proteoglykanen, Bielefeld 2009, S. 5.

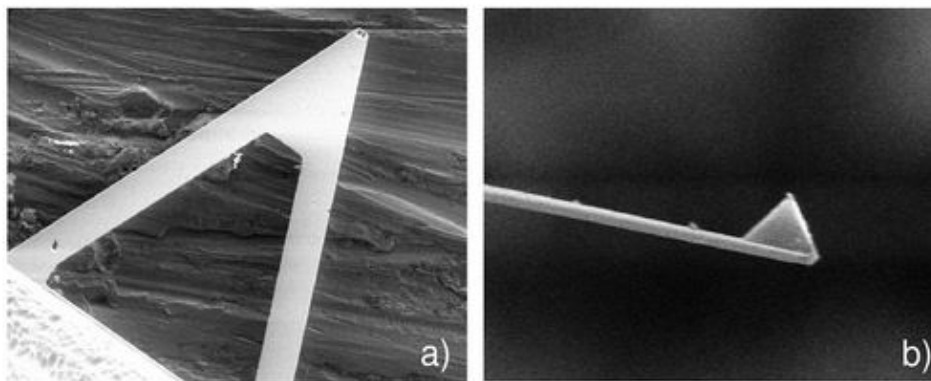


Abbildung 13: Nahaufnahme des Federbalkens mit Spitze.¹⁸

Die Geometrie der Spitze ist unter anderem verantwortlich für die Auflösung und die Qualität der am Computer zu sehenden Bilder. Der Cantilever wird heutzutage meist aus Silizium oder Siliziumnitrid geätzt. Sowohl die Geometrie des Kraftsensors, als auch die Federkonstante und die Masse des Auslegers haben Einfluss auf die Resonanzfrequenz des Kraftsensors, die wiederum die Maximalgeschwindigkeit für die Abrasterung des Substrats vorgibt.¹⁹ Ebenso wie bei den anderen Rastersondenmikroskopen entsteht das Bild beim AFM durch das Abrastern der Sonde und die dabei auftretenden Wechselwirkungen²⁰ zwischen dieser und der Probe. Die Abrasterung wird ermöglicht durch die piezoelektrischen Stellelemente, auf welchen die Probe befestigt ist.²¹ Eine bewehrte Möglichkeit die Auslenkung des Cantilevers zu detektieren ist die des Lichtzeigersystems (engl. laser beam deflection). In Abbildung 11 ist die Kombination einer vierquadrantischen Photoelektrode, eines Spiegels und eines Lasers dargestellt. Hierbei wird der Laser auf den sich auslenkenden Cantilever fokussiert und dieser Laserstrahl wird wiederum durch den Spiegel auf die Photodiode reflektiert und dort detektiert. Die detektierten Informationen werden als ein elektrisches Signal weitergeleitet und dienen als Feedback-Regelkreis, um die Bewegung des Kraftsensors zu steuern.²²

¹⁸ Grafik entnommen aus der Dissertation von C. Obermair: Nanostrukturierung mittels Rasterkraftmikroskopie und Elektrochemie, Göttingen 2005, S. 11.

¹⁹ Vgl. Mänteke, S. 295 f..

²⁰ Zu diesen Wechselwirkungskräften zählen die Van-der-Waals-Kraft, die Kapillarkraft, die aus der Coulombkraft resultierende elektrostatische Wechselwirkung, die Abstoßung aufgrund des Pauli-Prinzips sowie die kovalenten Bindungskräfte. Die unterschiedlichen Reichweiten der Kräfte sind für die verschiedenen Betriebsmodi (Kapitel 1.3.2) von besonderer Bedeutung. Für nähere Informationen bezüglich der für die rasterkraftmikroskopische Untersuchungen relevanten Wechselwirkungskräfte zwischen der Probe und der Spitze des Cantilevers sei verwiesen auf Morris, S. 44 ff.; PDF

²¹ Vgl. B. Nölting: Methods in modern biophysics, Berlin 2004, S. 122.

²² Vgl. V.J. Morris u.a.: Atomic force microscopy for biologists, London 1999 (ND 2001), S. 16.

I.3.2 Betriebsmodi

Der Cantilever kann am Rasterkraftmikroskop in drei verschiedenen Betriebsmodi eingesetzt werden.²³

- **Kontaktmodus:** Bei dem Kontaktmodus (engl. Contact-Mode) herrscht während der gesamten Messung ein Kontakt zwischen dem zu vermessenden Substrat und der Spitze des Cantilevers. Durch das Hinübergleiten des Cantilevers über die Probe kann durch dessen Auslenkung ein Topographiebild erstellt werden. Durch diese Art des physischen Kontakts würde ein weiches „Objekt“, wie beispielsweise ein Wassertropfen, nicht auf dem Topographiebild abgebildet werden. Der Kontaktmodus kann, abhängig von der zu vermessenden Probe, in zwei Formen unterteilt werden. Für „glatte“ Proben eignet sich die Vermessung mit einer gleichbleibenden Höhe. Für die übrigen Oberflächenbeschaffenheiten eignet sich die Beibehaltung der Kraft mit der gemessen wird. Durch das Wirken lateraler Kräfte kann die Probe in diesem Modus beschädigt werden. Er ist daher ungeeignet für Biomoleküle oder elastische Substanzen, da diese durch die Art der Messmethode beschädigt werden können.
- **Nichtkontaktmodus:** Bei diesem kontaktfreien Messmodus (engl. Non-Contact Mode) wird die Spitze in einem gleichbleibenden Abstand über die Oberfläche der Probe geführt. Da der Cantilever die Probe nicht berührt, ist es in diesem Modus möglich, auf der Oberfläche anhaftende Wassertropfen oder andere fragile Strukturen abzubilden. Im Gegensatz zu dem Kontaktmodus kann die Probe bei dieser Art der Messung nicht beschädigt werden, wodurch er auch für sensible Substanzen geeignet und damit der am häufigsten eingesetzte Messmodus ist.
- **Tapping Modus:** Der Tapping Modus (engl. Tapping-Mode oder Intermittent-Contact-Mode) ist eine Kombination des Kontakt- und des Nichtkontaktmodus. Der Cantilever rastert die Probe in einer vertikal oszillierenden Bewegung ab, wobei er diese nur für kurze Zeit berührt. Durch die kurze Berührungszeit und

²³ Vgl. im Folgenden: Mäntele, S. 262 ff..

den dadurch vernachlässigbaren „Schaden“ an der Probe ist es mit diesem Modus möglich, sowohl sensible, als auch elastische Substanzen zu vermessen. Durch die Sensibilität dieses Messmodus kann nicht nur ein aussagekräftiges Topographiebild der Probe erstellt werden. Zudem erhält man Informationen über die Elastizität des Substrats.

II Materialien und Methoden

In diesem Kapitel werden sämtliche verwendete Materialien und angewandte Methoden dargestellt und erläutert. Für einen schnellen Überblick dient die zusammenfassende tabellarische Darstellung der Proben und Messinstrumente in II.1.

II.1 Tabellarische Übersicht

Dies ist eine tabellarische Übersicht der in dieser Arbeit diskutierten Materialien und Messmethoden.

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Messmethoden.

Name	Hersteller
Behensäure Diyne-PC	Avanti Polar Lipids, Alabama
Chloroform Ethanol	VWR, Bruchsal
Milli-Q	Milipore GmbH, Eschborn
Cantilever (Res. Freq. 300 kHz, Force Const. 40 N/m)	Budgt Sensors, Bulgarien
Multimode 2 NanoScope (Version 5.30r3.sr3)	Digital Instruments, Santa Barbara Veeco Instruments Inc., New York
Multimode 8 NanoScope (Version 8.15)	Digital Instruments, Santa Barbara Veeco Instruments Inc., New York
Langmuir-Blodgett Trog Wilhelmyplättchen	Riegler und Kirstein, Potsdam
Hamiltonspritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz
HOPG	NT-MDT, Moskau
Mica	Plano, Wetzlar

II.2 Proben

Das Verhalten der Monolage aus Phospholipiden soll anhand zweier Fettsäuren untersucht werden.

Behensäure ist mit insgesamt 22 Kohlenstoffatomen eine sehr langkettige Carbonsäure.²⁴

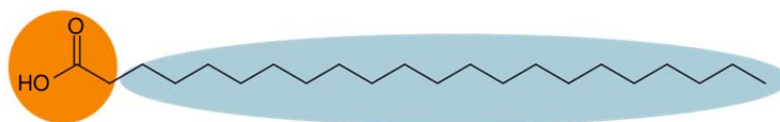


Abbildung 14: Strukturformel von Behensäure mit farblich markierter hydrophiler Kopfgruppe (orange) und hydrophiler Schwanzgruppe (blau).

Die Moleküllänge lässt sich über Winkelbetrachtung und mit Hilfe von Angaben zu den jeweiligen Bindungslängen zwischen den Atomen berechnen.

Tabelle 2: Bindungen von Behensäure und ihre Längen.²⁵

Bindungstyp	C-C	C≡C	C-H	O-H
Bindungslänge [pm]	145	120	109	143
Anzahl der Bindung	23	2	1	4

Näherungsweise wird von einer sp^3 Konformation ausgegangen. Daher wird die Moleküllänge mit Hilfe des tetraedischen Bindungswinkels ($109,5^\circ$) berechnet. Damit liegt die Moleküllänge von Behensäure bei etwa 2817,4 pm.

Neben Behensäure wurde 1,2-bis(10,12-tricosadiynoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, kurz Diyne-PC, verwendet.

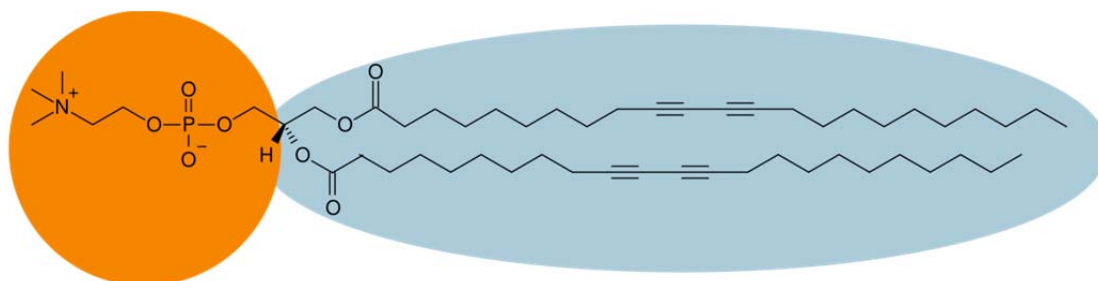


Abbildung 15: Strukturformel von Diyne-PC mit farblich markierter hydrophiler Kopfgruppe (orange) und hydrophiler Schwanzgruppe (blau).

²⁴ Vgl. J. Koolman, K.-H. Röhm: Taschenatlas Biochemie des Menschen, 4. Auflage, Stuttgart 2009, S. 39.

²⁵ Für die Angabe der Bindungslängen sei verwiesen auf E. Ridel, C. Janiak: Anorganische Chemie, Berlin 2007, S. 122 und Atkins, S. 1122.

Tabelle 3: Bindungen von Diyne-PC und ihre Längen.²⁶

Bindungstyp	C-C	C $\equiv$ C	C-H	C-O	C-N	N-H	P-O
Bindungslänge [pm]	145	120	109	143	147	101	176
Anzahl der Bindung	23	2	1	4	1	1	3

Unter Betrachtung des tetraedischen Bindungswinkels liegt die Moleküllänge von Diyne-PC bei etwa 4243,2 pm.

Als Substrat für das Übertragen der Monolagen wird hochorientiertes pyrolytisches Graphit (engl. highly oriented pyrolytic graphite, kurz HOPG) verwendet. Als Graphit bezeichnet man die Multilagen wabenförmig miteinander verbundenen Kohlenstoffatome in der Konformation sp^2 . Eine Monolage der so angeordneten Kohlenstoffatome nennt man Graphen. Graphen erobert seit 2005 weltweit die Labore, da es sich aufgrund der guten elektrischen Leitfähigkeit und der hohen mechanischen sowie chemischen Stabilität vielseitig einsetzen lässt.²⁷

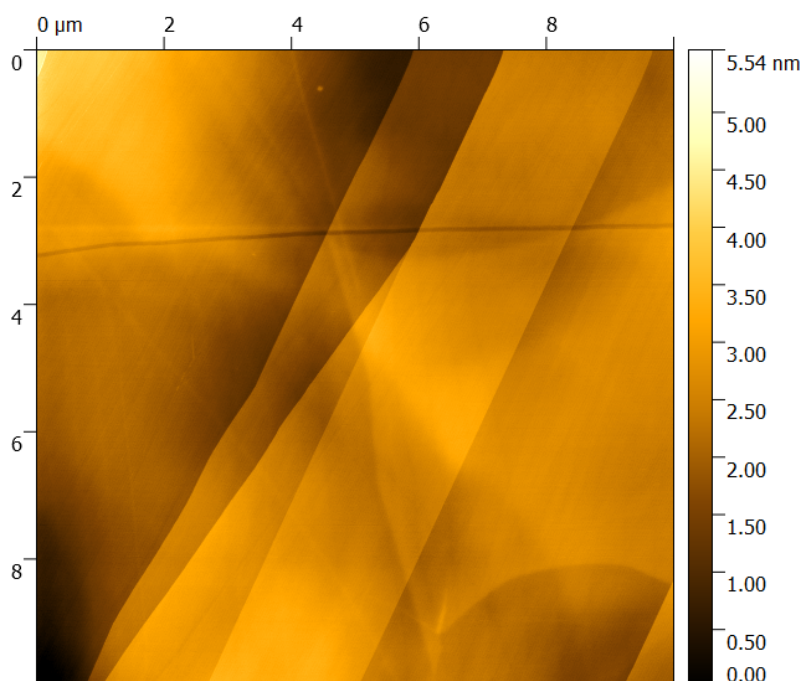


Abbildung 16: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von HOPG im Tapping-Mode.

²⁶ Für die Angabe der Bindungslängen sei verwiesen auf ebd..

²⁷ Vgl. K. Balasubramanian, M. Burghard: Chemie des Graphens. Dünnsstes Kohlenstoffblatt verspricht Revolution, in: Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.): Chemie unserer in Zeit, 2011, S. 240 f..

Neben diesen vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten ist Graphit simpel in der Handhabung und Präparation. Um das Substrat für den Übertrag der Monolage vorzubereiten, klebt man es für eine bessere Handhabbarkeit auf ein Metallplättchen und entfernt mit Hilfe eines Klebebandes vorsichtig die obersten Graphenlagen. Anschließend kann das hydrophobe Substrat mit einem Langmuir-Schaefer Film beschichtet und dann unter dem Rasterkraftmikroskop untersucht werden.

Neben HOPG wurden die Phospholipidmonolagen auf ein weiteres, dieses Mal hydrophiles, Material übertragen: Mica. Dies ist das am häufigsten für die Untersuchungen unter dem AFM verwendete Substrat. Mica ist ein Schichtsilikat, welches sich neben der kostengünstigen Gewinnung durch weitläufige Glattheit auf atomarer Ebene auszeichnet. Ebenso wie HOPG kann man die obere Schicht leicht mit einem Klebeband entfernen und hat so eine reine Oberfläche.²⁸

II.3 Methodik und Präparation

Die erste Phase dieser Arbeit besteht in der Präparation einer hochwertigen Monolage. Diese erfolgt an dem dafür vorgesehenen Langmuir-Blodgett Trog. Das verwendete Modell ist zwecks einer staubfreien Präparation von einem Plexiglaskasten umgeben. In diesen Kasten sind zwei „Fenster“ eingebaut durch die man die Probe präparieren kann. In der Mitte der Frontscheibe befindet sich ein kleines Loch durch welches die Lipide auf die Wasseroberfläche aufgebracht werden können. Neben dem Trog steht die dazugehörige Steuerungselektronik. Mit dieser kann man den durch das Wilhelmy-Plättchen gemessenen Oberflächendruck des Wassers verfolgen. Außerdem lässt sich hierüber die Geschwindigkeit sowohl der Barrieren, als auch des Krans, an welchem man das Substrat befestigt, steuern. Es ist zudem möglich, einen Oberflächendruck festzulegen, bis zu welchem die Barrieren die Oberfläche komprimieren sollen. Dieser kann falls gewünscht auch während des Übertrags beibehalten werden, was durch die automatische Regelung der Barrieren gesichert ist. Doch nicht nur auf der angeschlossenen Steuerelektronik kann man die Änderung des Oberflächendrucks verfolgen. Auch an dem an den Aufbau angeschlossenen Computer kann man mit Hilfe des

²⁸ Vgl. Morris, S. 57 f..

LabView Programms eine spezifisch auf die Messung abgestimmte Isotherme erstellen. Die Parameter der Messung können dabei individuell eingestellt werden.

Nach einer gelungenen Präparation wird die Probe unter dem Rasterkraftmikroskop untersucht. Hier stehen uns zwei Modelle zur Verfügung: Das Multimode 2 und 8. Der Großteil dieser Messungen wurden am Multimode 2 durchgeführt. Die Proben wurden stets mit dem Tapping-Mode untersucht. Auf dem an die Messelektronik angeschlossenen Computer kann man mit Hilfe des Programms *Nanoscope* die Bildaufnahme in Echtzeit verfolgen. Während des Tapping Modus ist es möglich parallel zu der topographischen Aufnahme auch Phasenverzögerungen (engl. phase lag) aufzuzeichnen. Aus dem Kontakt zwischen der Spitze des Cantilevers und der Probe folgt eine Phasenverschiebung der Funktion mit welcher der Cantilever in Schwingung versetzt wird. Sie ist zurückzuführen auf den Energieverlust zum Zeitpunkt der Wechselwirkung zwischen Cantilever und Probe. Wie viel Energie hierdurch verloren geht lässt wiederum Rückschlüsse auf die viskoelastischen Eigenschaften der Probe zu.²⁹

Um eine geordnete Monolage übertragen zu können, besteht der erste Schritt der Präparation in der Reinigung des Troges. Hierzu wird die Wasseroberfläche des mit *Milli-Q* Wasser gefüllten Troges mit einem an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Sauger von Staub und für das menschliche Auge nicht sichtbaren Verschmutzungen befreit. Nach diesem Vorgang sollte der durch das Wilhelmy-Plättchen gemessene Oberflächendruck bei einer Verkleinerung der Fläche konstant bleiben.

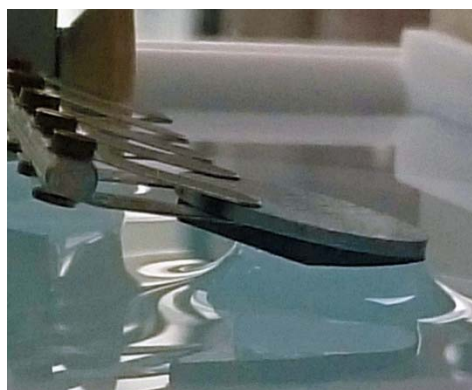


Abbildung 17: Langmuir-Schaefer Übertrag auf HOPG: Während das Substrat mit der aufgetragenen Monolage langsam durch den Kran von der Wasseroberfläche entfernt wird, kann man aufgrund des hydrophoben Effekts einen Wassermeniskus beobachten. Dieser kann eine Höhe von einigen mm erreichen.

²⁹ Vgl. Morris, S. 56 f..

Je nachdem, ob man einen Langmuir-Blodgett oder -Schaefer Übertrag präparieren möchte, bereitet man das Substrat vor der Komprimierung vor und bringt es in die entsprechende Position im Trog (Langmuir-Blodgett) oder bewahrt es an einem staubfreien Ort (Langmuir-Schaefer) auf. Für die Aufbereitung des Substrats wird dieses beim Langmuir-Schaefer Übertrag auf eine kleine Metallscheibe geklebt. Sie dient einer besseren Handhabung während des Übertrags. Zudem haftet durch sie die Probe an dem magnetischen Scanner des Rasterkraftmikroskops. Anschließend kann im Fall von Mica und HOPG die obere Schicht mit einem Klebebandstreifen exfoliert werden. Dann wird das Plättchen samt Substrat an einem zuvor mit Isopropanol gereinigten Kran befestigt und verstaut. Im Fall des Langmuir-Blodgett Übertrags verfährt man mit Ausnahme des Aufklebens des Substrats auf das Metallplättchen ebenso. Für die Untersuchung am Rasterkraftmikroskop wird das Substrat an dem Metallplättchen befestigt, nachdem die Monolage aufgebracht wurde. Der Grund für die unterschiedliche Handhabung liegt darin, dass man den Trog nicht durch den Kleber verunreinigen bzw. chemische Reaktionen mit den Molekülen hervorrufen möchte. Ist dieser Zustand erreicht, können die Phospholipide auf den mit ausreichend viel *Milli-Q* Wasser gefüllten Trog aufgetragen werden. Hierzu reinigt man zunächst die geeignete Hamiltonspritze mit Chloroform. Die Bauteile der Hamiltonspritze sind aus Glas und Edelstahl gefertigt, wodurch sie nicht durch das Chloroform angreifbar sind. Die in Chloroform gelösten Phospholipide werden typischer Weise in einer Konzentration von 1 mg/ml auf die Wasseroberfläche gespritzt. Da das Chloroform schnell verdampft, können nach ca. zwei Minuten die auf der Wasseroberfläche zurückgebliebenen Amphiphile mit Hilfe der Barrieren kontinuierlich und schonend komprimiert werden (s. Abb. 4). Diese Komprimierung kann man sowohl an der Steuerungselektronik, als auch am Computer verfolgen. Das *LabView* Programm stellt hierbei die für das jeweilige Amphiphil typische Isotherme dar. Ist die festanaloge Phase erreicht kann der Komprimierungsvorgang beendet und die Monolage auf das vorbereitete Substrat aufgebracht werden. Nachdem die Probe an der Luft getrocknet ist, wird sie für die staubfreie Aufbewahrung in eine Petrischale gelegt. Abschließend werden die auf dem Trog verbliebenen Lipide mit dem an die Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Sauger entfernt. Es folgt die Untersuchung der Lipidmonolage mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops. Hierzu wird die Probe auf dem magnetischen Probenhalter des Rasterkraftmikroskops

fixiert. Darüber werden der Cantilever und der Laser in Position gebracht und Probe und Cantilever manuell aneinander angenähert.

In der zugehörigen Computersoftware *Nanoscope* wird mit Hilfe der Option „auto-tune“ die automatische Kalibrierung des Cantilevers vorgenommen. Anschließend können die gewünschten Parameter der Messung eingestellt und der Cantilever automatisch an die Probe angenähert werden. Benutzerdefiniert sind beispielsweise die Bildgröße der Aufnahme (engl. scan size) und die Geschwindigkeit, mit welcher der Cantilever die Oberfläche abrastert.

Für die Auswertung der topographischen und der Phasenbilder wird die open source Software *Gwyddion* verwendet.

III Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die von R. Hillmann bei einem Übertrag von PTPE auf HOPG gefundene, linienförmige Anordnung der Lipide auf HOPG in drei Vorzugsrichtungen wiederzufinden und zu untersuchen. Die folgende Dokumentation der Arbeitsschritte zeigt den Verlauf der Untersuchung sowie die Auswertung der Ergebnisse.

III.1 Monolagen auf HOPG

Für die Untersuchung von Behensäure auf HOPG wurden mit der Hamiltonspritze 50 μl Behensäure in Chloroform (2 mg/ml) auf die Wasseroberfläche aufgetragen. Der Langmuir-Schaefer Übertrag erfolgte bei einer Oberflächenspannung von 45 mN/m auf HOPG. Mit Hilfe des Multimode 2 konnte im Tapping-Mode eine Übersichtsaufnahme der Probe erstellt werden.

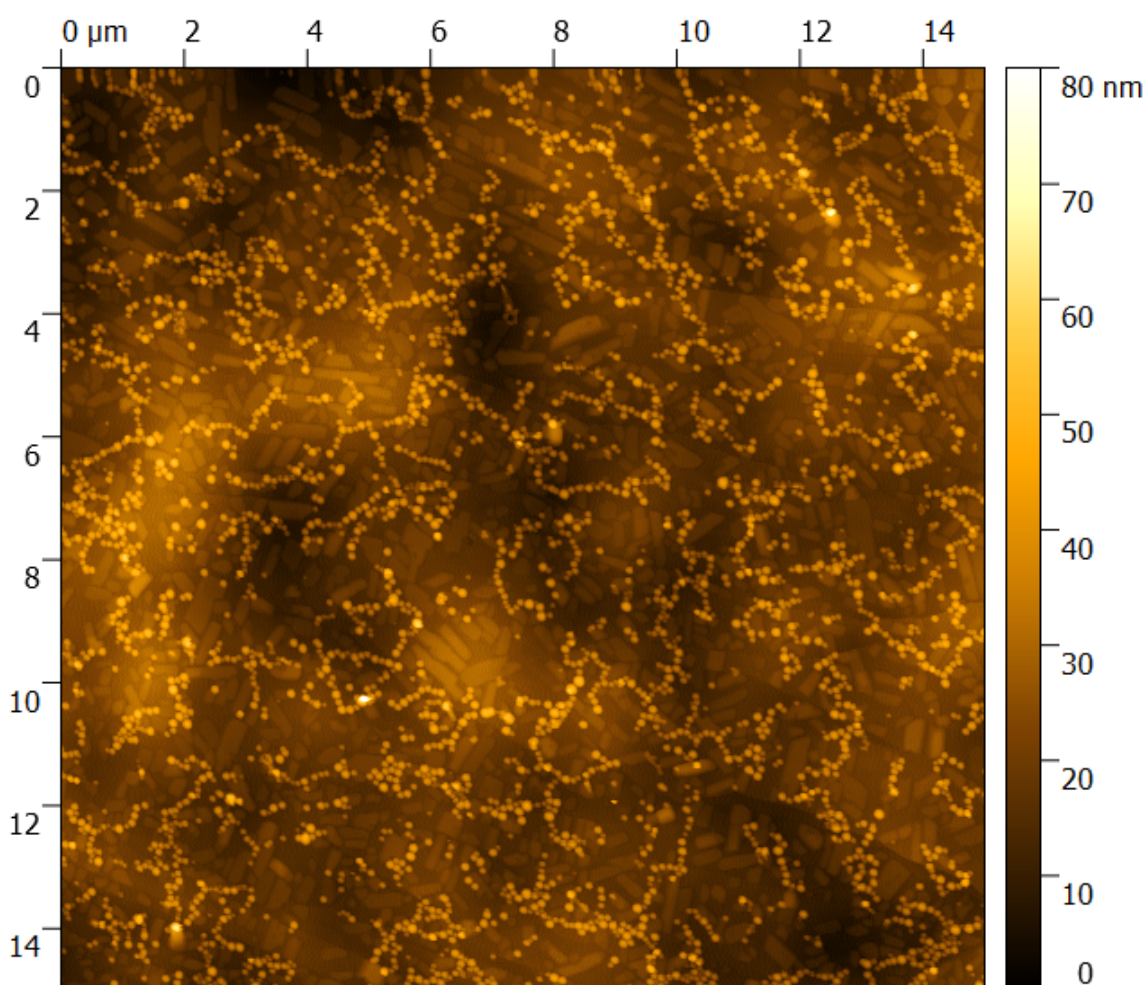
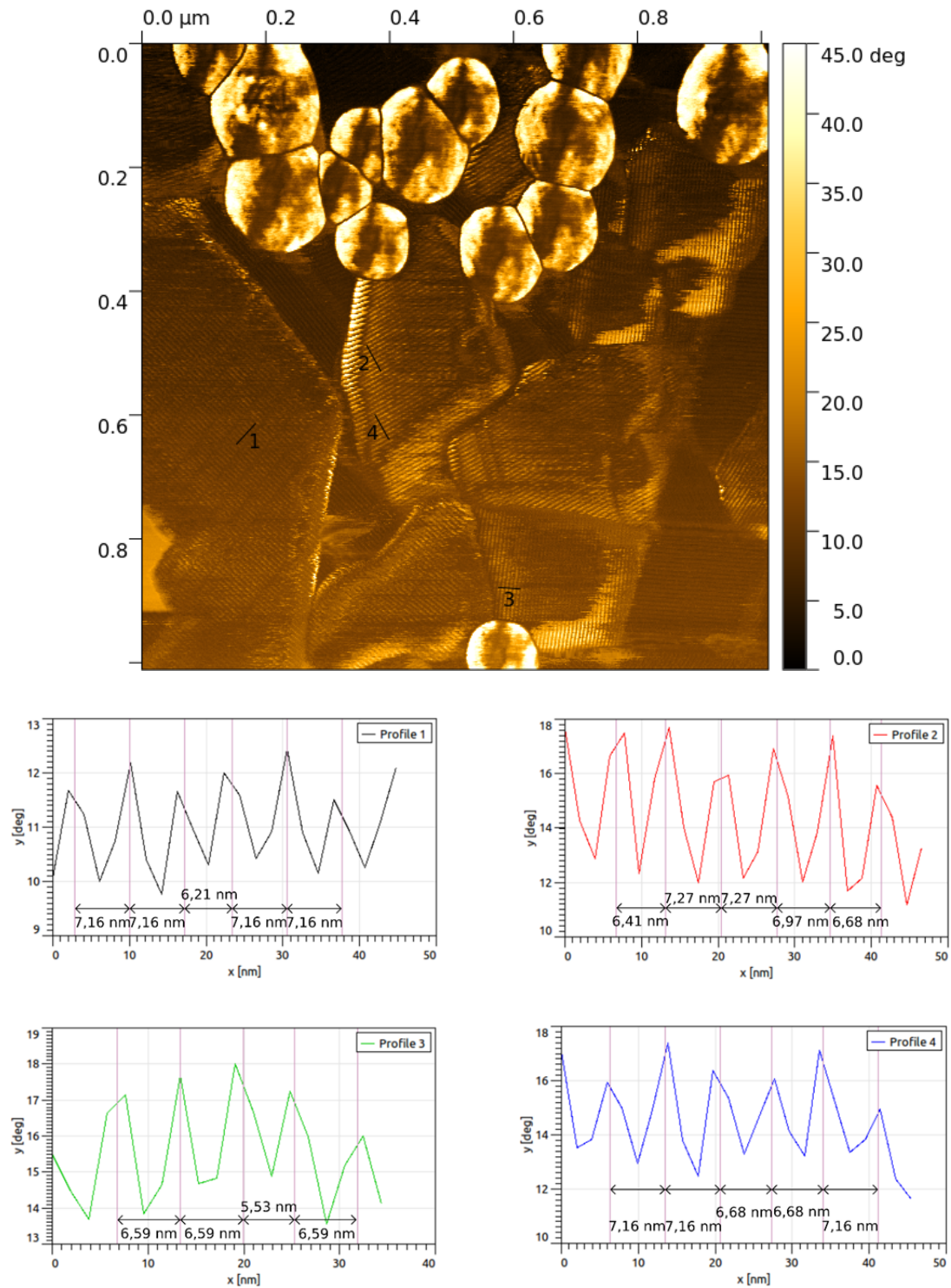


Abbildung 18: Topographische Aufnahme von Behensäure auf HOPG.

In Abbildung 17 sieht man flächendeckende kleine Punkte. Hierbei handelt es sich vermutlich um Fremdagglomerate. Unter diesen Agglomeraten sind „Inseln“ zu erkennen.



Betrachtet man das Phasenbild einer Nahaufnahme der Inseln in Abbildung 19, erkennt man die zu untersuchenden Rillen. Diese treten nur auf den Inseln auf, nicht auf den Kugeln. Zudem erfolgt ihre Anordnung nicht willkürlich, sondern in drei Vorzugsrichtungen. Das Phasenbild gibt keinen Aufschluss über die Höhe der Rillen. Jedoch kann man mit Hilfe des Programms *Gwyddion* den Abstand zwischen ihnen bestimmen (vgl. Abb. 19). Dazu wird eine Schnittgerade senkrecht zu der Ausrichtung der Rillen gezogen. Anschließend wird eine Senkrechte durch die Mitte jedes Peaks der Schnittprofile, nicht durch die Mitte der Spitzen, gezogen. Der Abstand zwischen diesen Senkrechten entspricht dann dem Abstand der jeweiligen Rillen voneinander. Zwar sind nicht alle Rillen flächendeckend äquidistant zueinander ausgerichtet, doch treten bestimmte Abstände häufiger, oft hintereinander auf. Mit Ausnahme eines Abstandes von 5,53 nm bewegen sich alle vermessenen Rillenbreiten in einem Bereich von 6,21 nm bis 7,27 nm.

Um zu überprüfen, ob diese Art der Anordnung der Lipide von dem Lipid an sich oder von dem Substrat abhängig ist, wurden 50 µl Diyne-PC in Chloroform (2,5 mg/ml) bei einer Oberflächenspannung von 40 mN/m auf HOPG übertragen. Es zeigte sich eine interessante Art der Oberflächenstruktur.

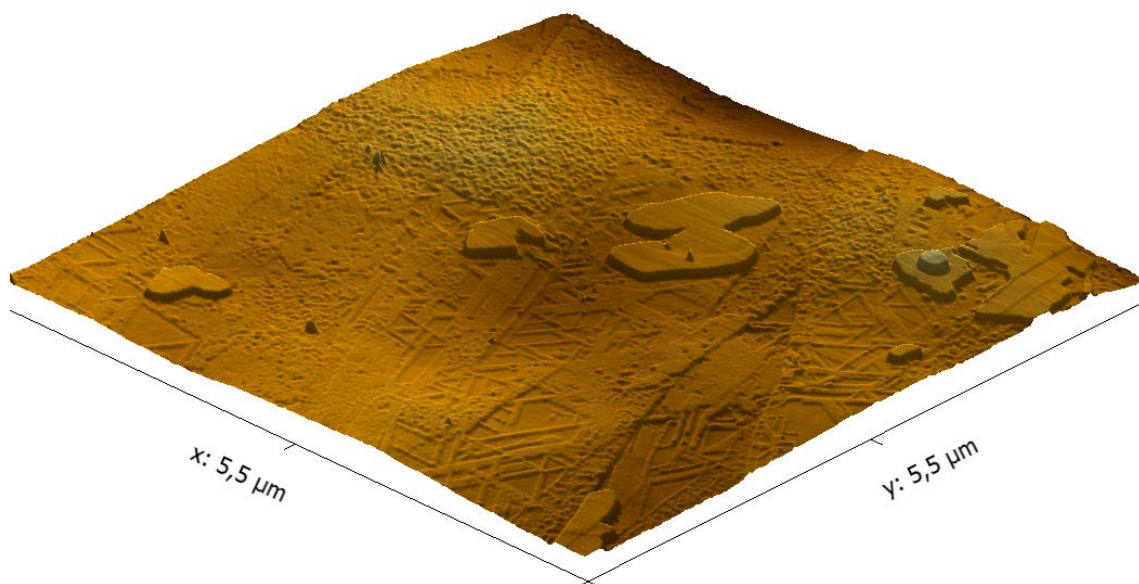


Abbildung 20: Probe 1: dreidimensionale Darstellungsweise einer topographischen Aufnahme.

Neben den deutlich erhöhten Monolagen und der Doppellage im rechten Teil des Bildes erkennt man in Abbildung 20 flachere Strukturen, welche sich in Form von Dreiecken oder Trapezen über weite Teile der Probe erstrecken.

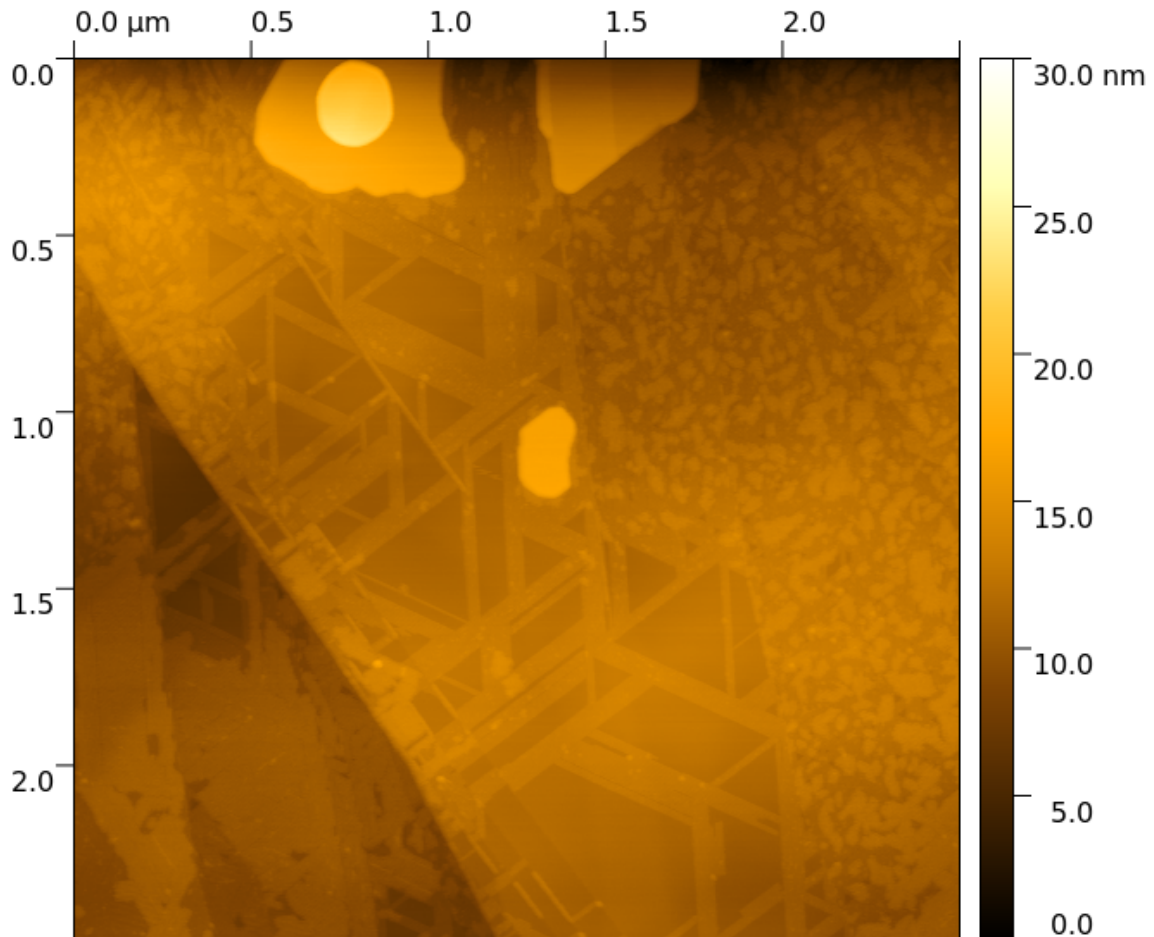


Abbildung 21: Probe 1: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG.

Auf diesen topographischen Darstellungen (Abb. 20 ff.) wird die Koexistenz mehrerer Anordnungen deutlich. Im oberen und im mittleren Bildbereich von Abbildung 21 erkennt man Monolagen aus stehenden Lipiden (s. Schnittprofile aus Abb. 22). Diese weisen keinerlei besondere Oberflächenbeschaffenheit auf. Sie sind umgeben von deutlich niedrigeren Strukturen, welche sich im rechten Bildbereich zu kleineren Grüppchen zusammengeschlossen haben. Die bemerkenswerte Art der Anordnung erkennt man, wie bereits großflächig in Abbildung 20, im mittleren Teil des Bildes. Hier liegen die Moleküle nicht in „willkürlich“ geordneten Gruppierungen vor, sondern haben eine geordnete geometrische Struktur eingenommen. Diese Struktur hat sich je-

doch nicht nur an einem kleinen Bereich ausgebildet, sondern ist großflächig auf der Probe zu finden (vgl. Abb. 20).

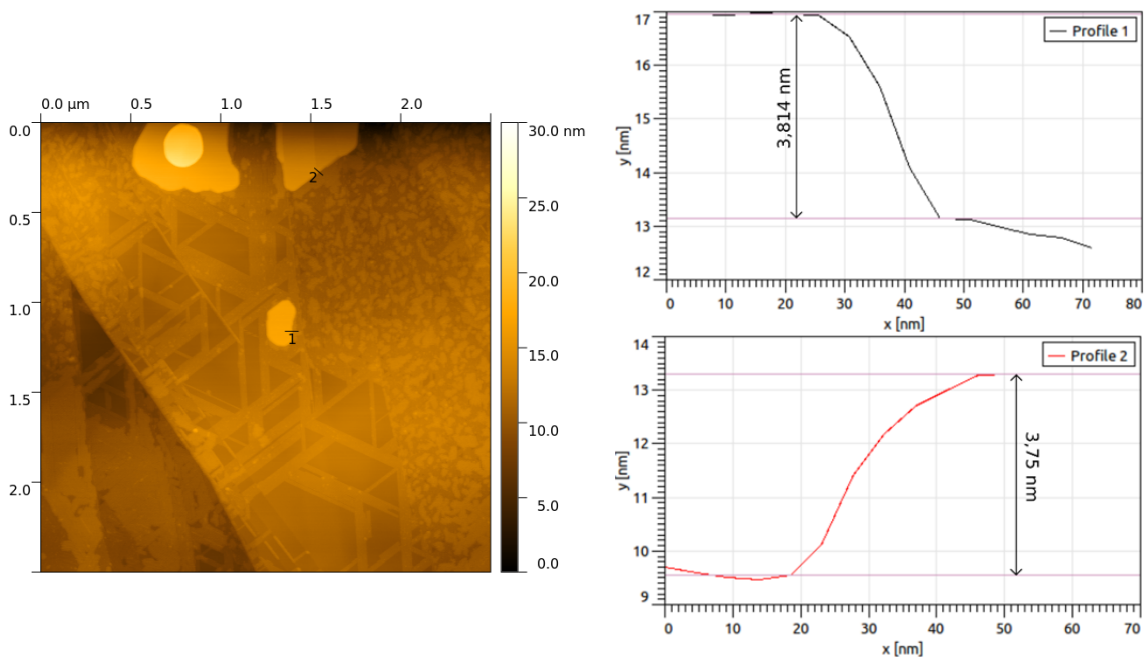


Abbildung 22: Probe 1: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG mit zugehörigen Höhenprofilen der jeweiligen Monolagen.

Die Vermessung der ebenen, strukturlosen Flächen zeigt deutlich, dass es sich hierbei um Monolagen von aufrechtstehenden Lipiden³⁰ handelt.

Anders als durch die Theorie erwartet sieht man in den Profilen 1 und 2 von Abbildung 22 keinen steilen, sondern einen allmählichen Anstieg an dem Übergang zwischen Substrat und Monolage. Auch entsprechen die gemessenen Werte nicht exakt der berechneten Moleküllänge von Diyne-PC. Dies könnte darin begründet sein, dass die Moleküle nicht senkrecht zur Substratoberfläche stehen. Zudem konnte die Moleküllänge über den Idealfall der geometrischen Anordnung des Moleküls nur näherungsweise berechnet werden.

³⁰ Im Folgenden nur „Monolage“.

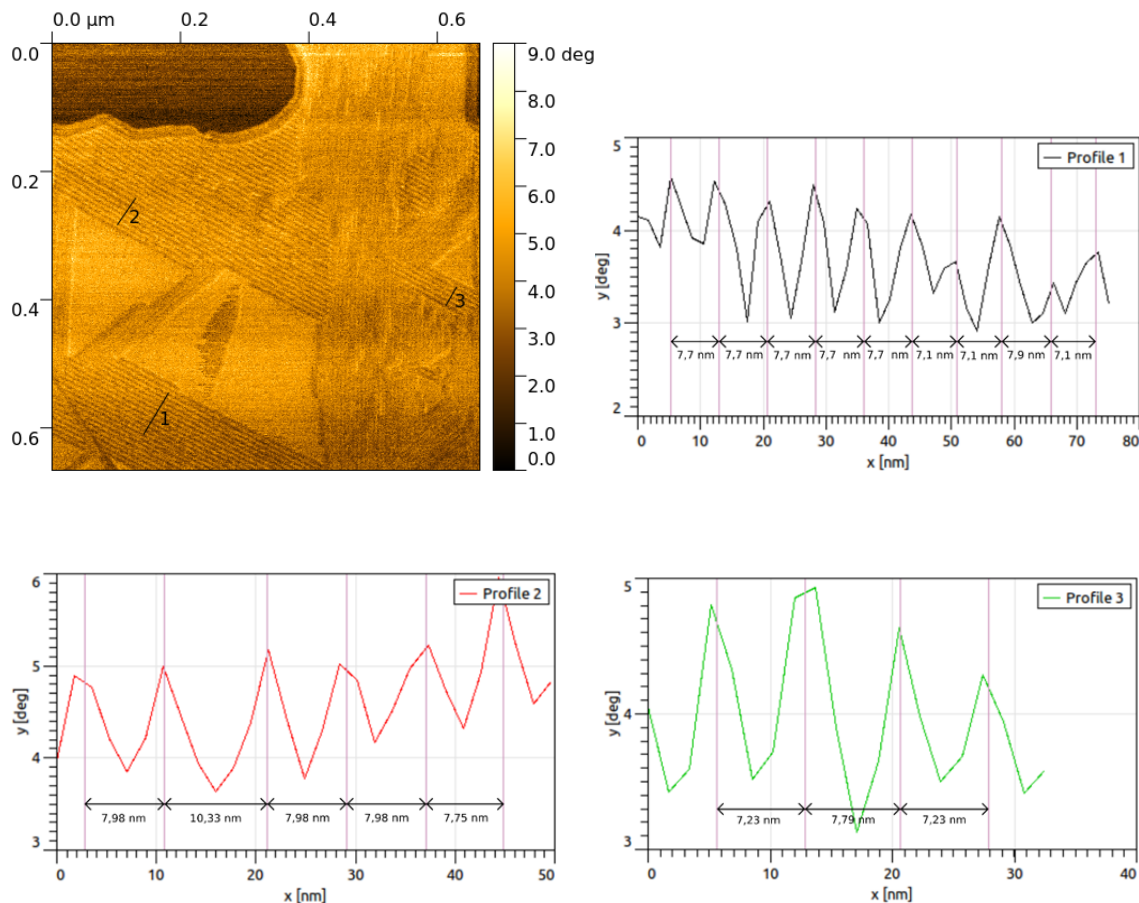


Abbildung 23: Probe 1: Phasenbild von Diyne-PC auf HOPG mit vier Phasenprofilen zur Vermessung der jeweiligen Rillenbreite.

Verkleinert man nun den zu scannenden Bereich, mit Fokus auf die durch die geometrischen Strukturen eingenommenen Stellen, erkennt man im Phasenbild die feinen Linien, welche sich bereits bei Behensäure auf HOPG gezeigt haben. Der Abstand zwischen den Rillen liegt, mit Ausnahme eines Wertes von 10,33 nm, zwischen 7,1 nm und 7,98 nm. Der am häufigsten vermessene Abstand von 7,7 nm zwischen den Rillen legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um liegende Lipide handelt. Diese haben sich mutmaßlich so angeordnet, dass sich immer zwei hydrophile Kopfgruppen zusammengeschlossen und die Peaks gebildet haben. Die zwei sich aneinander lagernden hydrophoben Schwanzgruppen bilden dann die Täler zwischen den Peaks (vgl. Abb. 33, S. 35). Auffällig ist, dass diese Linien nicht auf der Monolage im oberen Teil des Bildes auftreten. Die Struktur der Rillen kommt also ausschließlich durch die Anordnung der liegenden Lipide zustande.

Um auszuschließen, dass dies nur ein „Zufall“ war, wird unter denselben Bedingungen eine weitere Probe mit Diyne-PC auf HOPG präpariert.

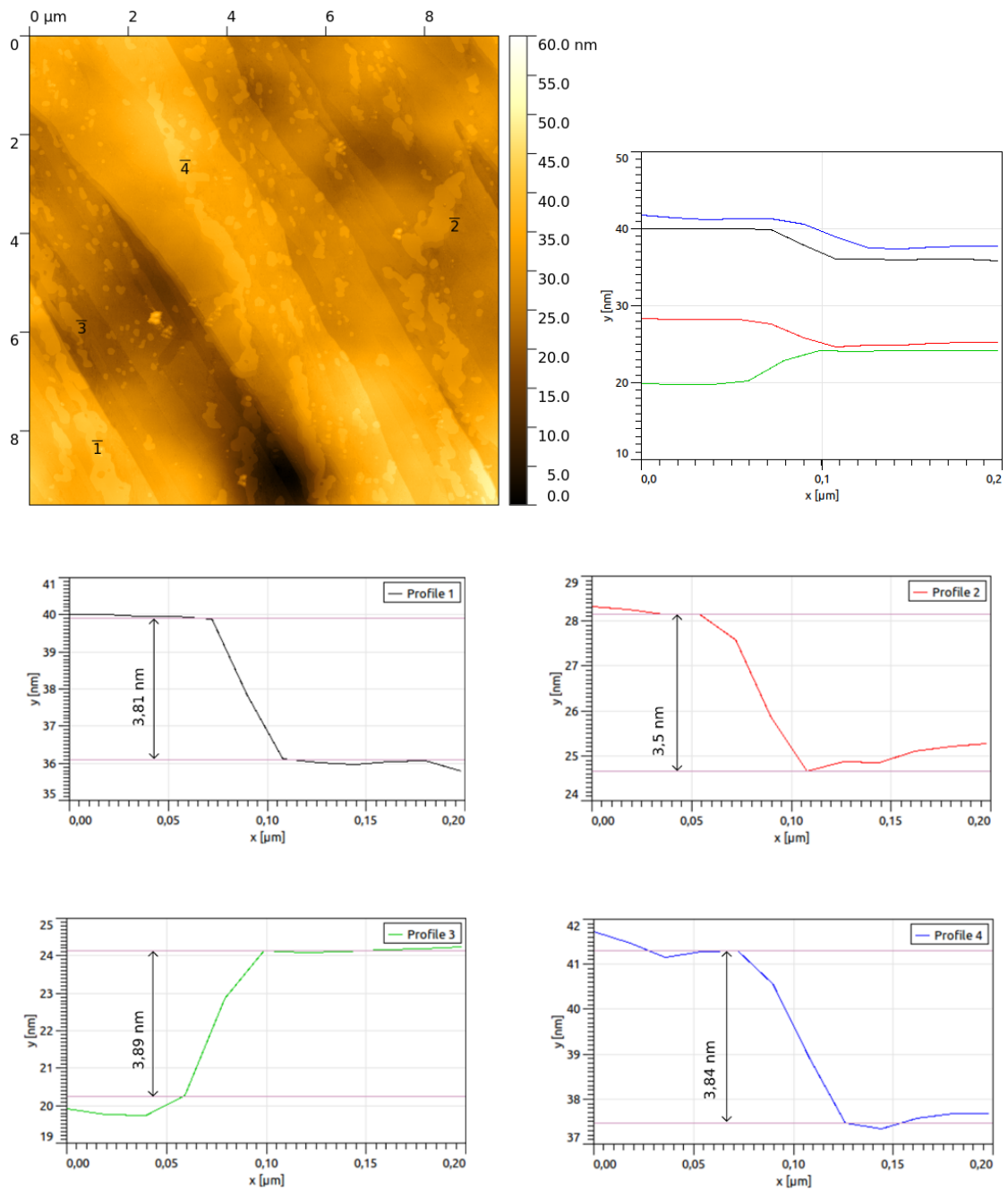


Abbildung 24: Probe 2: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG mit zugehörigen Höhenprofilen zur Bestimmung der Höhen der Monolagen.

Auf der Oberfläche des HOPGs zeigen sich mehrere großflächige Monolagen von Diyne-PC mit einer Höhe von 3,5 nm bis 3,89 nm. Wählt man einen kleineren Scanbereich, so erkennt man auch bei dieser Probe um die Monolagen herum liegende Lipide (vgl. Abb. 25-29). Diese treten hier großflächiger in geordneter Form auf, als bei der ersten Probe.

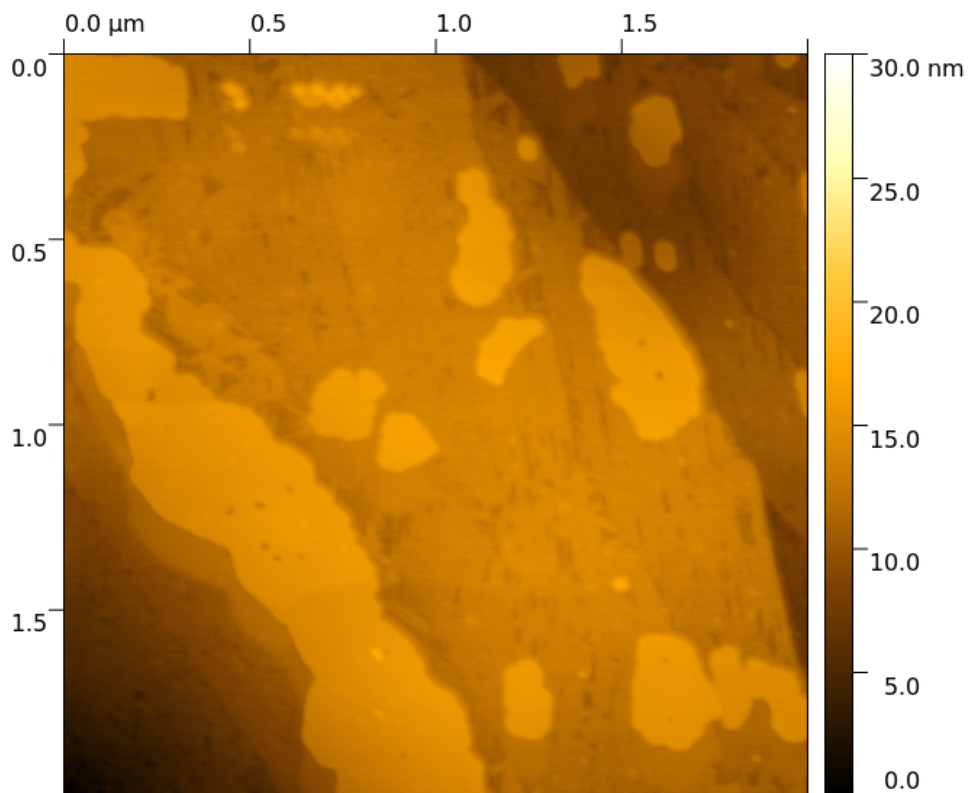


Abbildung 25: Probe 2: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG.

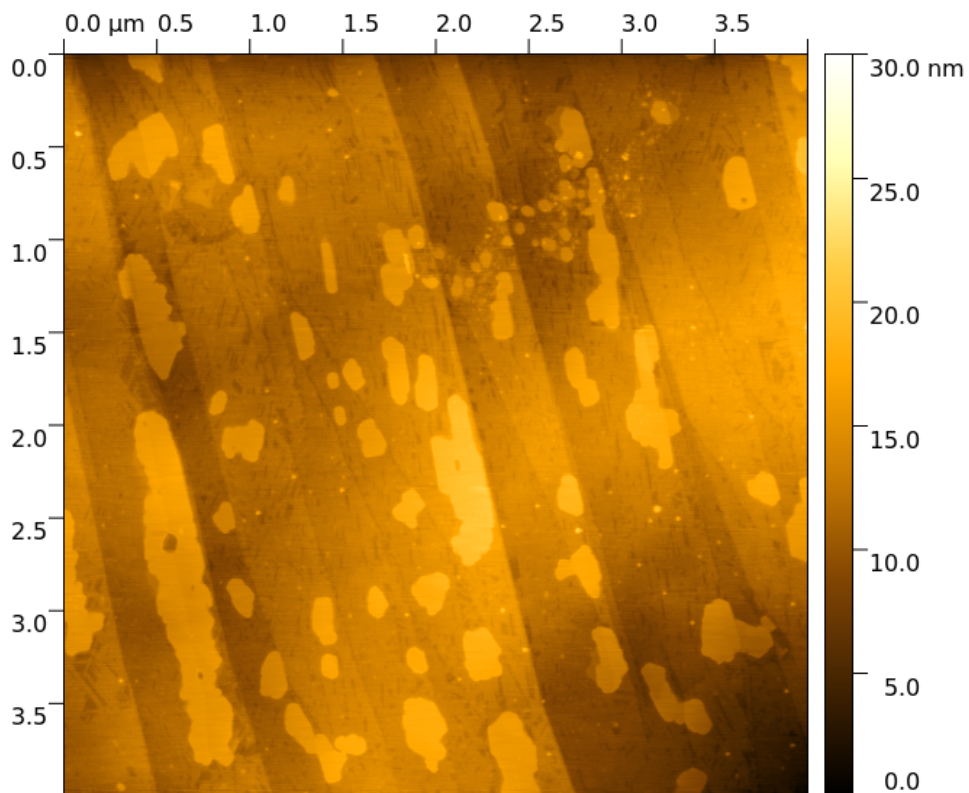


Abbildung 26: Probe 2: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG.

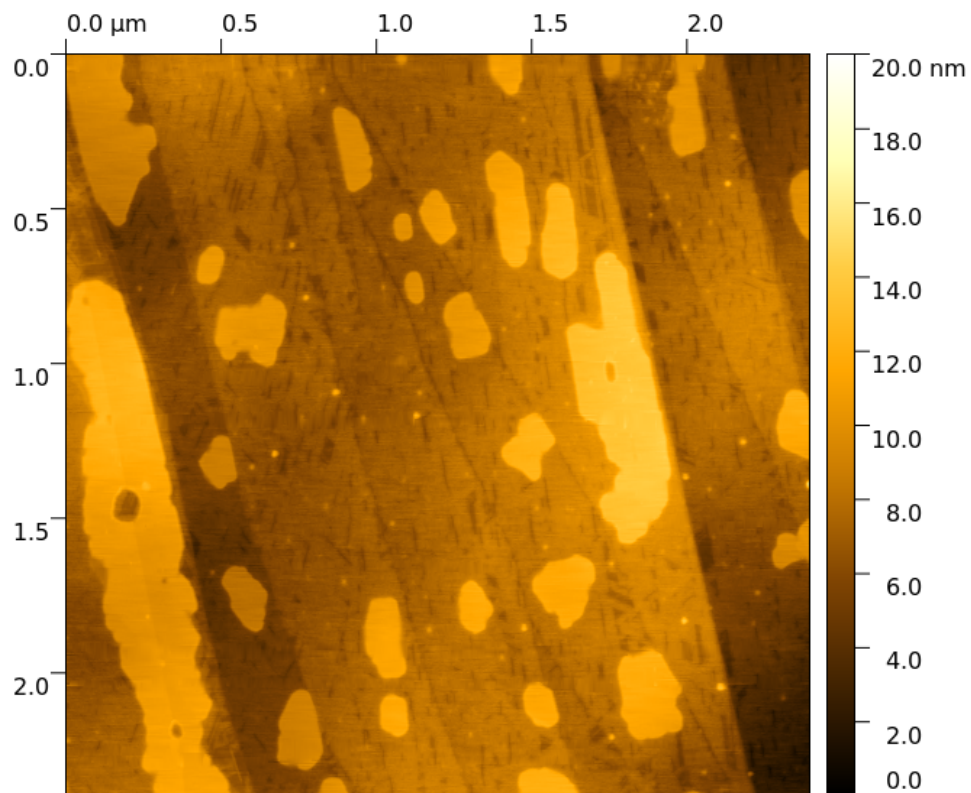


Abbildung 27: Probe 2: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG.

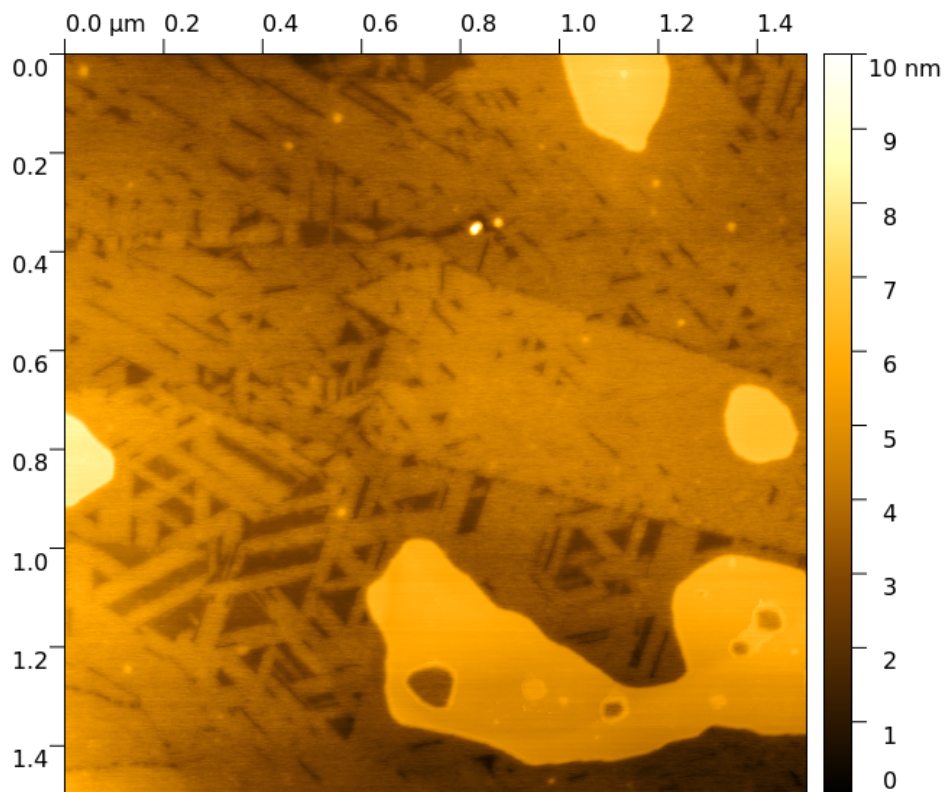


Abbildung 28: Probe 2: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG.

Bei näherer Betrachtung der Abbildungen 25-28 stellt man fest, dass sich die liegenden Lipide auch bei dieser Probe in eine geometrische Struktur begeben haben (vgl. Abb. 28). Wählt man einen kleineren Scanbereich um diese Form der Anordnung näher betrachten zu können, so erkennt man im Phasenbild dieselben Rillen wie bei Behensäure und auf der ersten Probe von Diyne-PC.

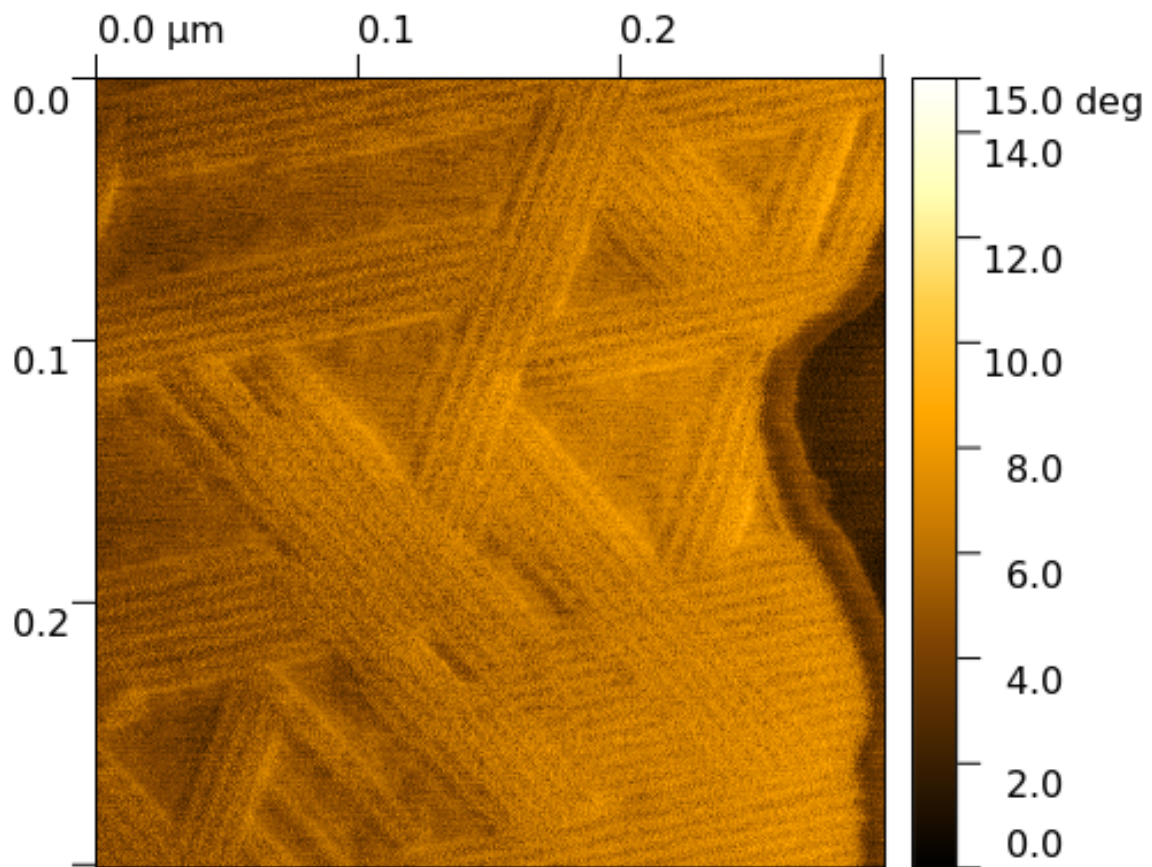


Abbildung 29: Probe 2: Phasenbild von Diyne-PC auf HOPG.

Unter denselben Parametern wie zuvor wurde eine dritte Probe mit Diyne-PC auf HOPG angefertigt. Diese wies das gleiche Muster auf.

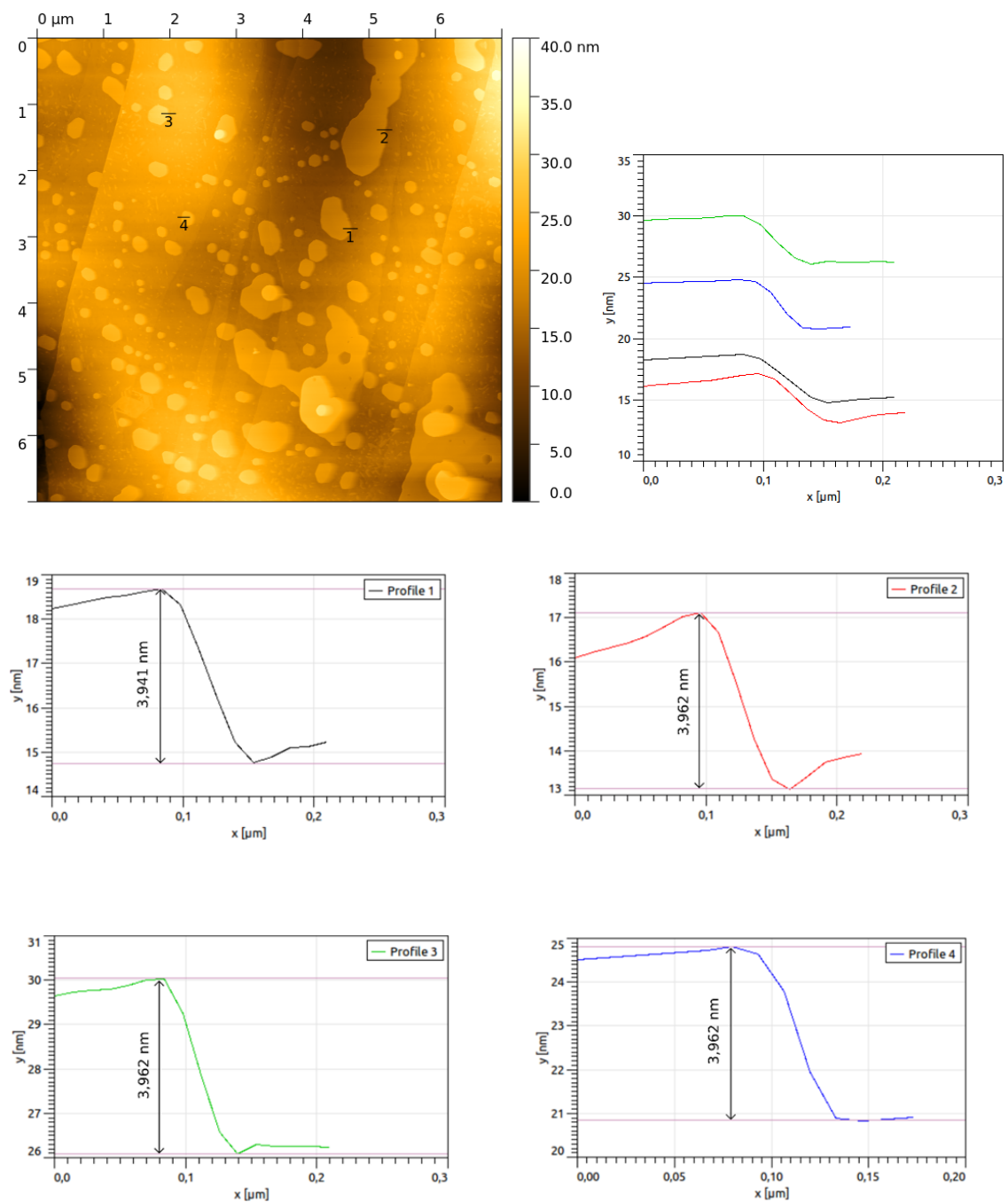


Abbildung 30: Probe 3: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG mit Höhenprofilen zur Bestimmung der Höhe der Monolagen.

Auch bei dieser Probe erkennt man flächendeckend kleine, vereinzelt große, Monolagen sowie kleinere Doppellagen. Ihre Höhe liegt zwischen 3,94 nm und 3,96 nm.

Dass auch liegende Lipide dazu in der Lage sind Doppellagen zu bilden wird in Abbildung 31 deutlich. Dabei übernimmt die zweite Lage liegender Lipide die Richtung in welche sich die Rillenstruktur der unteren Lage angeordnet hat. Zudem werden hier auch Fehlstellen in den einzelnen Rillen deutlich, die zuvor nicht zu sehen waren.

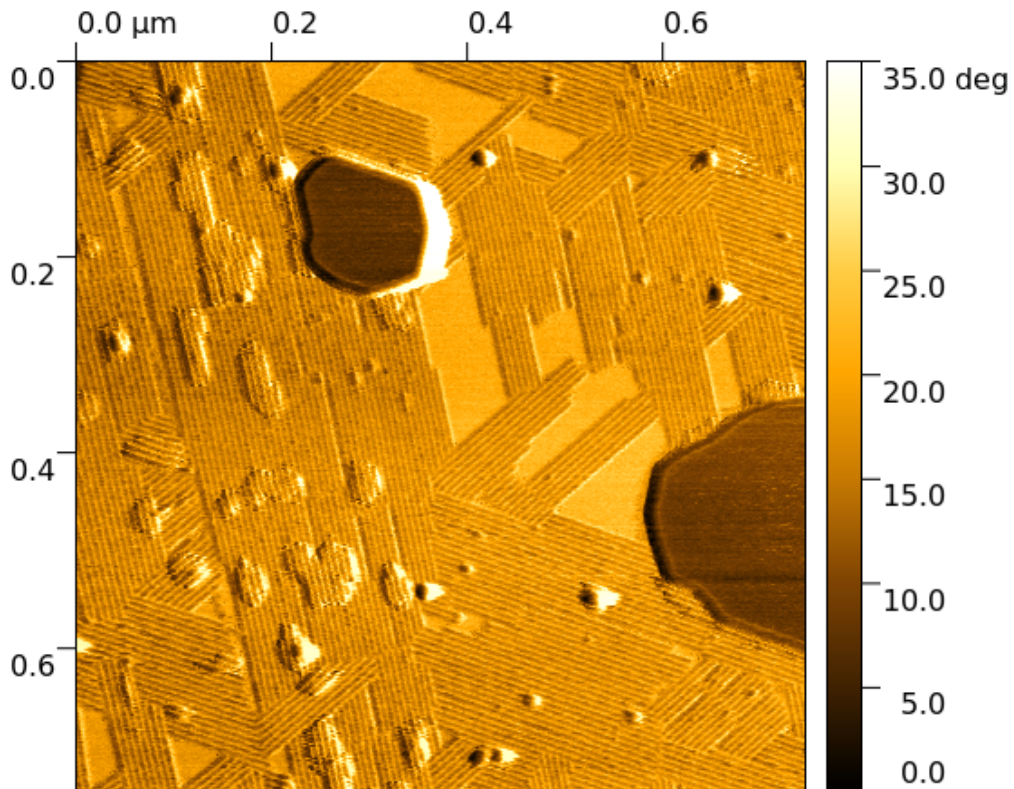


Abbildung 31: Probe 3: Phasenbild von Diyne-PC auf HOPG.

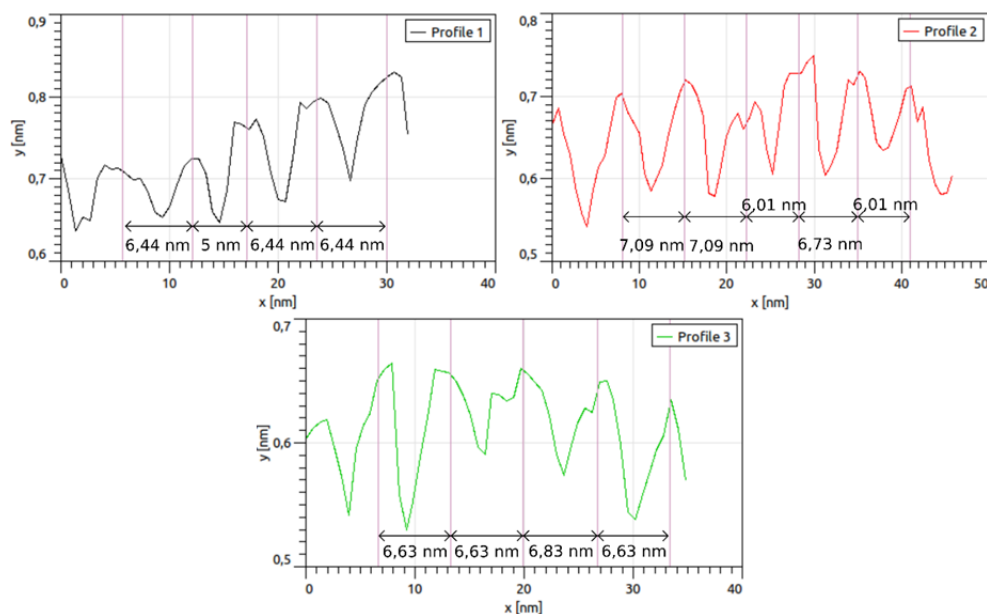
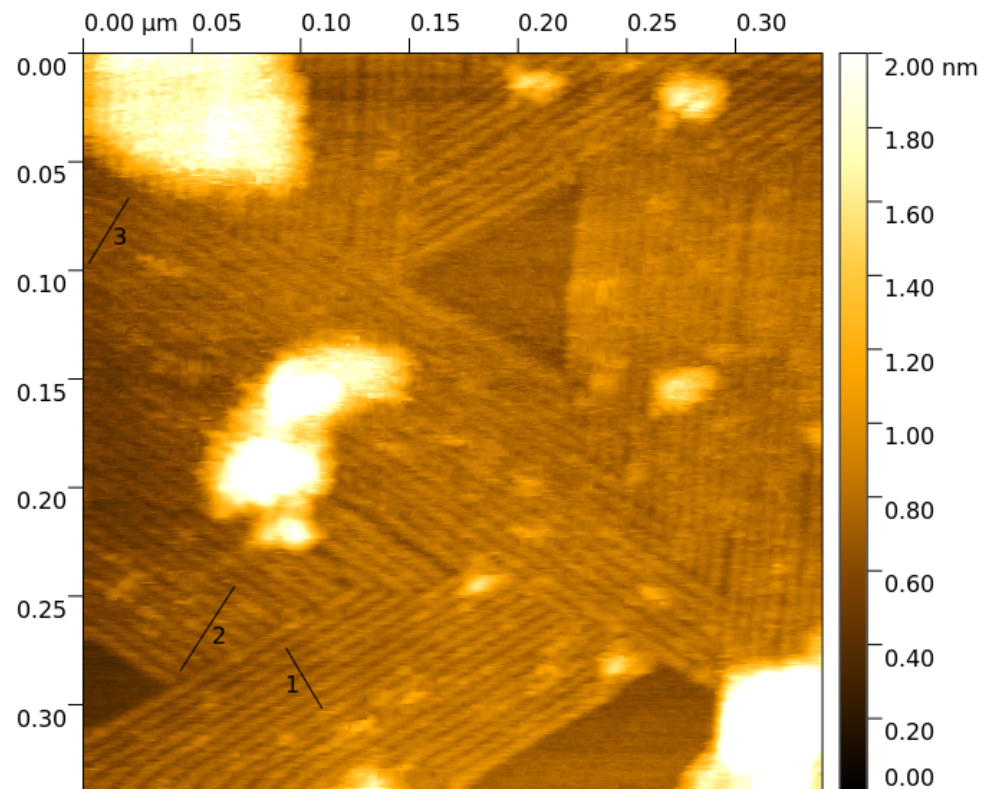


Abbildung 32: Probe 3: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG mit vier Phasenprofilen zur Vermessung der jeweiligen Rillenbreite.

Eine qualitativ hochwertige topographische Aufnahme, der durch die liegenden Lipide eingenommenen, dreieckigen Struktur, zeigt Abbildung 32. Hieraus lässt sich neben der Breite auch die Höhe der Rillenstruktur ablesen. Diese liegt bei 0,1 nm bis 0,15 nm

und damit sehr deutlich unter der Länge eines Diyne-PC Moleküls, was sämtliche Zweifel ausräumt, dass es sich hierbei um stehende Lipide handelt. Der Abstand zwischen den Rillen liegt, mit einer Ausnahme von 5 nm, in einem Bereich von 6,01 nm und 7,09 nm. Dies unterstützt wiederum die Theorie, dass sich die Kopf und Schwanzgruppen aneinanderlagern, wodurch diese Struktur entsteht. Diese Form der Anordnung kann mit Abbildung 33 veranschaulicht werden.

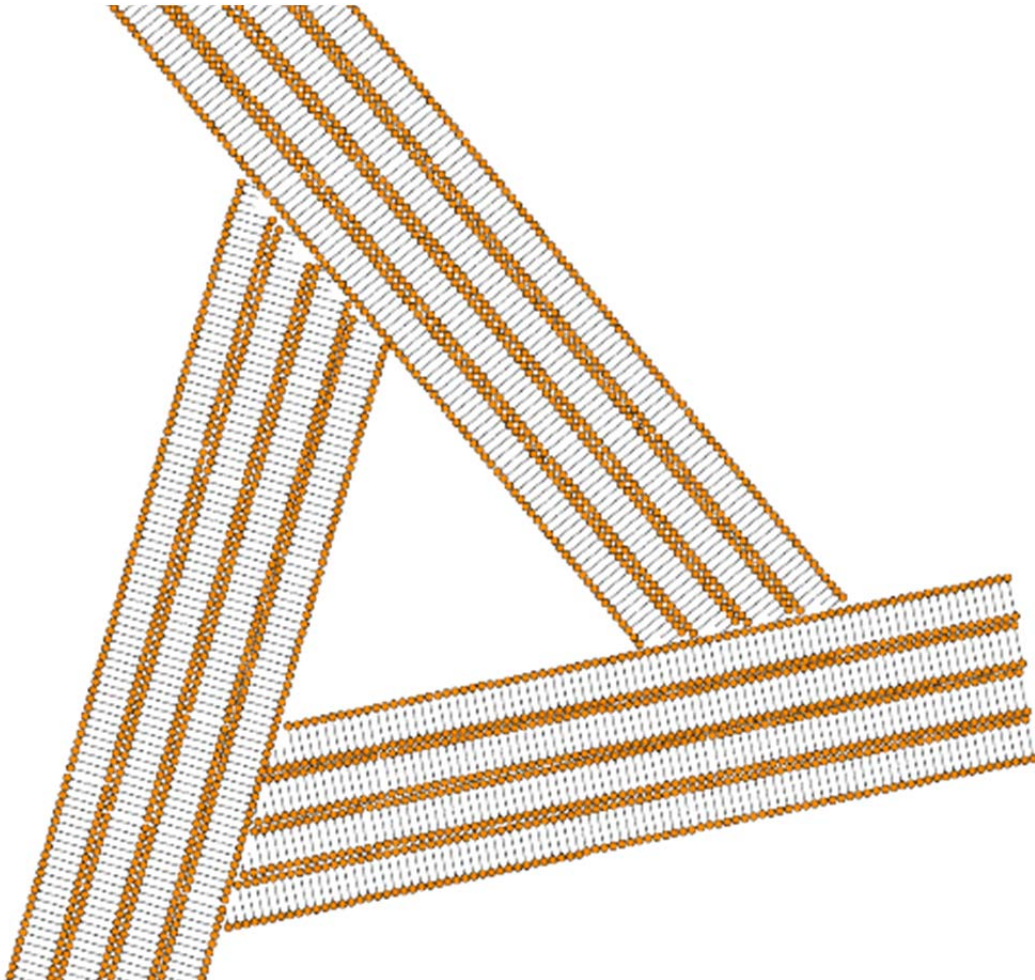


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Anordnungsweise der liegenden Lipide von Diyne-PC auf HOPG.

Eine Erklärung für die Entstehung der Rillenstruktur durch die liegenden Lipide liegt in der Hypothese, dass die Lipide auf dem hydrophoben Material die hydrophilen Kopfgruppen leicht von der Oberfläche anheben und so die Berge der Rillenstruktur bilden. Infolgedessen wird die effektive Länge des Moleküls verkürzt, was dazu führt, dass die Breite der Rillen nicht exakt mit der Länge der aufrecht stehenden Lipide übereinstimmt.

III.2 Monolagen auf Mica

Um zu überprüfen, ob diese Art der Ausrichtung von dem Substrat abhängig ist, wird Behensäure mit der Langmuir-Blodgett Methode auf Mica übertragen. Es wird wieder eine Menge von 50 μl mit Hilfe der Hamiltonspritze auf die Wasseroberfläche aufgetragen, komprimiert und bei einer Oberflächenspannung von 45 mN/m auf übertragen.

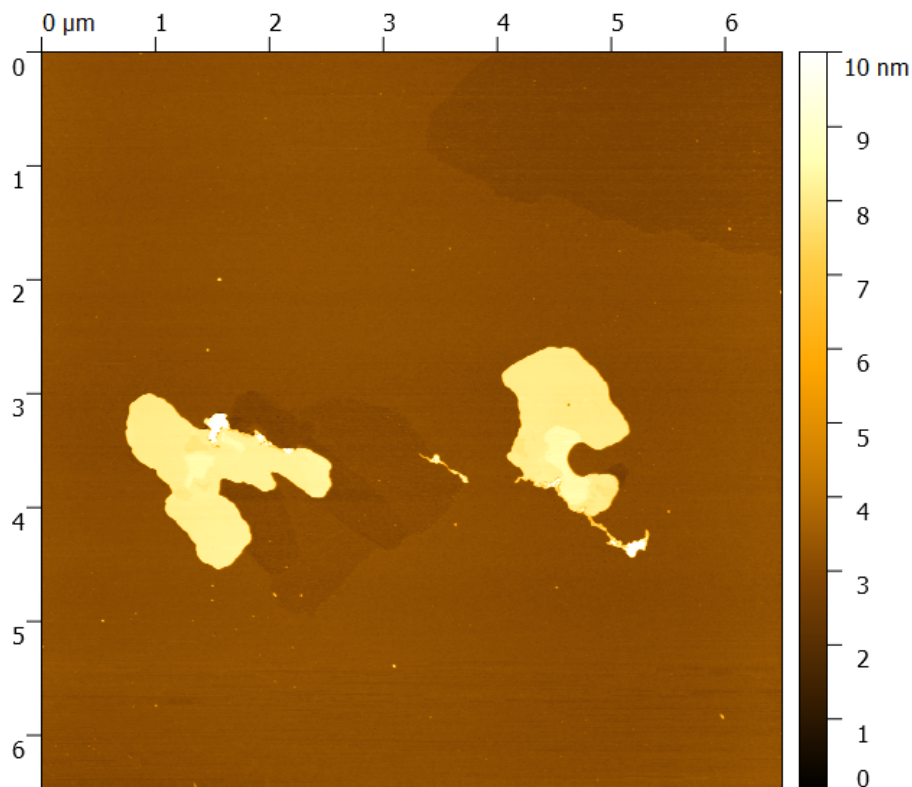


Abbildung 34: Topographische Aufnahme von Behensäure auf Mica.

Die Darstellungen des AFM's zeigen, dass sich auf Mica keine liegenden Lipide von Behensäure anordnen. Infolgedessen finden sich auch keine Rillen.

Da sich die Struktur der Rillen bei zwei unterschiedlichen Phospholipiden auf HOPG, jedoch nicht auf Mica ausbildet, scheint die Ausrichtungsart der liegenden Lipide von dem Substrat abhängig zu sein.

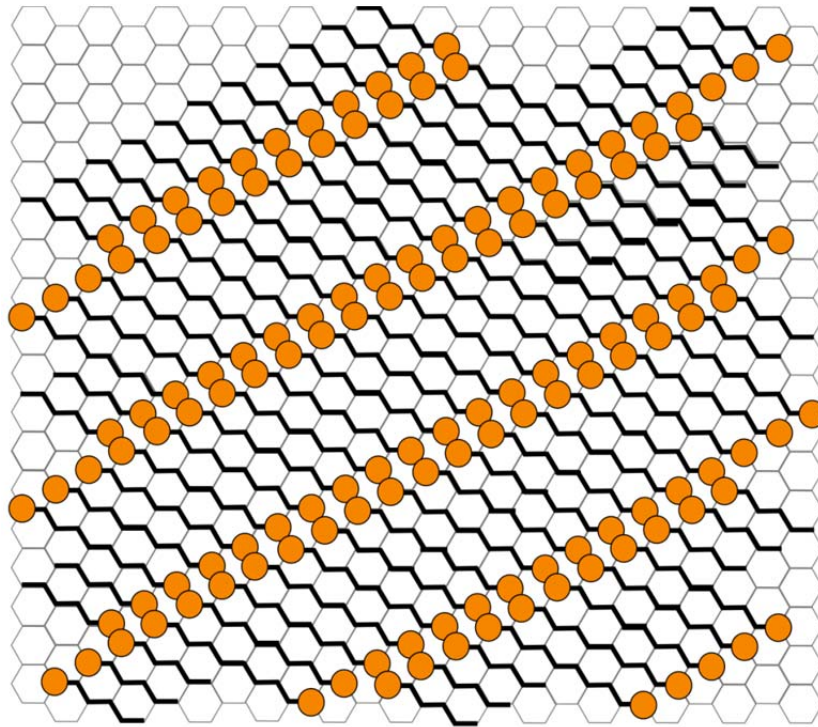


Abbildung 35: Schematische Darstellung zur Veranschaulichung der Anordnung der liegenden Lipide auf dem wabenförmigen HOPG.

Abbildung 35 veranschaulicht eine mögliche Erklärung für diesen Effekt. Die Lipide liegen hier auf dem wabenförmigen Graphen. Aufgrund des hydrophoben Substrats stellen sich die hydrophilen Kopfgruppen leicht auf und bilden die Berge der Rillen. Die hydrophoben Schwanzgruppen orientieren sich an die durch das HOPG vorgegebene Wabenstruktur. Durch dieses Modell sind auch die drei ausgebildeten Vorzugsrichtungen erklärbar, da sich die Kohlenstoffkette der Lipide an je zwei Seiten des Hexagons anlegt. Durch eine Fortführung der Reihen wird eine dreieckige Fläche ausgespart, die dann unter dem Rasterkraftmikroskop als freie HOPG-Fläche zu sehen ist (vgl. Abb. 32).

Fazit

„Das Experiment irrt nie, es irren nur eure Vorurteile, die sich eine andere Wirklichkeit versprechen, als sie in unserer Erfahrung begründet sind.“

Leonardo da Vinci

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass es eine große Diskrepanz zwischen der Vorstellung, man könne vom Trog aus eine defektfreie Monolage auf das geeignete Substrat übertragen und der tatsächlichen Anordnung, in welcher die Lipide auf dem Substrat angeordnet sind, gibt.

Die Messergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es trotz der Erfüllung der theoretischen Bedingungen, bspw. die Übertragung zum Zeitpunkt der festanalogen Phase, nicht möglich ist, mit Hilfe des Langmuir-Blodgett Trogs eine Monolage flächendeckend auf ein Substrat aufzubringen.

Bei der Untersuchung mit dem Rasterkraftmikroskop hat sich sowohl bei Behensäure, als auch bei Diyne-PC auf HOPG eine flächendeckende Rillenstruktur mit drei Vorzugsrichtungen ausgebildet. Diese Struktur zeigte sich nicht bei der rasterkraftmikroskopischen Untersuchung von Behensäure auf Mica. Dies lässt darauf schließen, dass die Form der Anordnung von dem verwendeten Substrat abhängig ist, nicht von dem Lipid. Neben der Ausrichtung in drei Vorzugsrichtungen konnte man bei Diyne-PC beobachten, dass die liegenden Lipide Dreiecke, bzw. Trapeze aussparten. Durch diese Aussparungen war das unbedeckte HOPG sichtbar. Diese geometrische Art der Anordnung lässt sich ebenfalls auf das Substrat, hier HOPG, zurückführen. Die Kohlenstoffketten der liegenden Lipide orientieren sich an der Wabenstruktur des HOPGs. Da im Fall von Diyne-PC das gesamte Molekül auf dem hydrophoben Substrat liegt, klappen sich die hydrophilen Kopfgruppen nach oben und bilden die Berge der Erhebungen der Rillenstruktur. Berücksichtigt man diese Form der Ausrichtung, ist die Hypothese begründet, dass sich die Rillen durch Aneinanderlagern der Kopf- bzw. Schwanzgruppen bilden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Skizze eines Amphiphils mit der hydrophilen Kopfgruppe (hier orangener Kreis) und der hydrophoben Schwanzgruppe.	2
Abbildung 2: Darstellung eines Liposoms, einer Doppellage und einer Mizelle (v.l.n.r.).	2
Abbildung 3: Strukturformel von Lecithin mit farblich gekennzeichnetem hydrophilen und hydrophoben Bereich.	4
Abbildung 4: Von oben fotografiertes Ausschnitt des mit Reinstwasser gefüllten Langmuir-Blodgett Trog.	5
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Langmuir-Blodgett Trogs mit Amphiphilen in der gasanalogen Phase (links) und als komprimierte Monolage (rechts).	6
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Wilhelmy-Plättchens in Wasser.	7
Abbildung 7: Charakteristischer Verlauf des Komprimierungsvorgangs.	8
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Langmuir-Blodgett Übertrags (links) und Langmuir-Schaefer Übertrag (rechts).	10
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Herstellungsvorgangs einer X-Beschichtung.	11
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Herstellungsvorgangs einer Y-Beschichtung.	12
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Herstellungsvorgangs einer Z-Beschichtung.	12
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.	13
Abbildung 13: Nahaufnahme des Federbalkens mit Spitze.	14
Abbildung 14: Strukturformel von Behensäure mit farblich markierter hydrophiler Kopfgruppe (orange) und hydrophiler Schwanzgruppe (blau).	18
Abbildung 15: Strukturformel von Diyne-PC mit farblich markierter hydrophiler Kopfgruppe (orange) und hydrophiler Schwanzgruppe (blau).	18
Abbildung 16: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von HOPG im Tapping-Mode.	19
Abbildung 17: Langmuir-Schaefer Übertrag auf HOPG: Während das Substrat mit der aufgetragenen Monolage langsam durch den Kran von der Wasseroberfläche entfernt wird, kann man aufgrund des hydrophoben Effekts einen Wassermeniskus beobachten. Dieser kann eine Höhe von einigen mm erreichen.	21
Abbildung 18: Topographische Aufnahme von Behensäure auf HOPG.	24
Abbildung 19: Phasenbild von Behensäure auf HOPG mit vier Phasenprofilen zur Vermessung der jeweiligen Rillenbreite.	25

Abbildung 20: Probe 1: dreidimensionale Darstellungsweise einer topographischen Aufnahme.	26
Abbildung 21: Probe 1: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG.	27
Abbildung 22: Probe 1: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG mit zugehörigen Höhenprofilen der jeweiligen Monolagen.	28
Abbildung 23: Probe 1: Phasenbild von Diyne-PC auf HOPG mit vier Phasenprofilen zur Vermessung der jeweiligen Rillenbreite.....	29
Abbildung 24: Probe 2: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG mit zugehörigen Höhenprofilen zur Bestimmung der Höhen der Monolagen.....	30
Abbildung 25: Probe 2: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG.	31
Abbildung 26: Probe 2: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG.	31
Abbildung 27: Probe 2: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG.	32
Abbildung 28: Probe 2: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG.	32
Abbildung 29: Probe 2: Phasenbild von Diyne-PC auf HOPG.	33
Abbildung 30: Probe 3: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG mit Höhenprofilen zur Bestimmung der Höhe der Monolagen.	34
Abbildung 31: Probe 3: Phasenbild von Diyne-PC auf HOPG.	35
Abbildung 32: Probe 3: Topographische Aufnahme von Diyne-PC auf HOPG mit vier Phasenprofilen zur Vermessung der jeweiligen Rillenbreite.....	36
Abbildung 33: Schematische Darstellung der Anordnungsweise der liegenden Lipidem von Diyne-PC auf HOPG.....	37
Abbildung 34: Topographische Aufnahme von Behensäure auf Mica.....	38
Abbildung 35: Schematische Darstellung zur Veranschaulichung der Anordnung der liegenden Lipide auf dem wabenförmigen HOPG.	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Messmethoden.	17
Tabelle 2: Bindungen von Behensäure und ihre Längen.....	18
Tabelle 3: Bindungen von Diyne-PC und ihre Längen.	19

Literaturverzeichnis

P. W. Atkins, J. de Paula (Hrsg.): Physikalische Chemie, 4. Auflage, Weinheim 2006.

K. Balasubramanian, M. Burghard: Chemie des Graphens. Dünnstes Kohlenstoffblatt verspricht Revolution, in: Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.): Chemie in unserer Zeit, 2011, S. 240-249.

G. Binnig, C.F. Quate und C. Gerber: Atomic Force Microscope, in: Physical Review Letters, vol. 56, 1986, S. 930-933.

K. S. Birdi: Lipid and biopolymer monolayers at liquid interfaces, New York 1989.

G. F. Fuhrmann: Toxikologie für Naturwissenschaftler. Einführung in die Theoretische und Spezielle Toxikologie, Wiesbaden 2006.

S. Gilles: Nanoimprint Lithographie als Methode zur chemischen Oberflächenstrukturierung für Anwendungen in der Bioelektronik, in: Forschungszentrum Jülich GmbH (Hrsg.): Schriften des Forschungszentrums Jülich, Bd. 19, Aachen 2010.

P. Gründler: Chemische Sensoren. Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Ingenieure, Berlin u.a. 2004.

C. Harder: Kraftmikroskopische und kraftspektroskopische Untersuchungen an Proteoglykanen, Bielefeld 2009.

S. A. Hussain: Langmuir-Blodgett Films a unique tool for molecular electronics, 2009.

J. Koolman, K.-H. Röhm: Taschenatlas Biochemie des Menschen, 4. Auflage, Stuttgart 2009.

R. M. Leblanc, Q. Huo: Langmuir and Langmuir-Blodgett films of proteins and enzymes, in: P. Somasundaran: Encyclopedia of surface and colloid science, Bd. 2, New York 2006, S. 3233-3260.

W. Mänteles: Biophysik, Stuttgart 2012.

V.J. Morris u.a.: Atomic force microscopy for biologists, London 1999 (ND 2001).

H. Müller: Polymerisierbare und polymere Langmuir-Blodgett_Monoschichten zur gezielten Kalziumcarbonatkristallisation an der Luft-Wasser-Grenzfläche (Dissertation), Mainz 2006.

B. Nölting: Methods in modern biophysics, Berlin 2004.

C. Obermair: Nanostrukturierung mittels Rasterkraftmikroskopie und Elektrochemie (Dissertation), Göttingen 2005.

H. Plattner, J. Hentschel (Hrsg.): Zellbiologie. Stuttgart 1997 (ND 2011).

E. Ridel, C. Janiak: Anorganische Chemie, 7. Auflage, Berlin 2007.

G. Roberts (Hrsg.): Langmuir-Blodgett Films. New York 1990.

G. Wise: Irving Langmuir. 1881–1957, in: P. A. Redhead (Hrsg.): Vacuum Science and Technology. Pioneers of the 20th Century, New York 1994, S. 79–82.

Erklärung

Ich versichere, die von mir vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst zu haben. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Arbeiten anderer entnommen sind, habe ich als entnommen kenntlich gemacht. Sämtliche Quellen und Hilfsmittel, die ich für die Arbeit benutzt habe, sind angegeben. Die Arbeit hat mit gleichem Inhalt bzw. in wesentlichen Teilen noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Datum:

Unterschrift: