
Dynamische Strukturierung von festkörpergestützten Lipidmembranen und adsorbierten Makromolekülen

Josef Martin Paul Hennig



München 2011

Dynamische Strukturierung von festkörpergestützten Lipidmembranen und adsorbierten Makromolekülen

Josef Martin Paul Hennig

Dissertation
an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Josef Martin Paul Hennig
aus München

München, am 14. März 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. Joachim O. Rädler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Matthias F. Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Einleitung | 3 |
| 3 | Grundlagen | 7 |
| 3.1 | Die Zellmembran | 7 |
| 3.1.1 | Die Lipiddoppelschicht | 7 |
| 3.1.2 | Phasenverhalten | 8 |
| 3.1.3 | Aufbau und Funktion der Zellmembran | 10 |
| 3.1.4 | Funktionale Phasendomänen „Lipid Rafts“ | 12 |
| 3.2 | Modellmembranen | 14 |
| 3.2.1 | Vesikel | 14 |
| 3.2.2 | Substratgestützte Membranen (SLBs) | 15 |
| 3.3 | Beeinflussung von Membranen und membrangebundenen Makromolekülen | 18 |
| 4 | Methoden | 21 |
| 4.1 | Fluoreszenzmikroskopie | 21 |
| 4.2 | Lithografie | 23 |
| 4.3 | Akustische Oberflächenwellen (Surface Acoustic Waves, SAWs) | 23 |
| 4.4 | Präparationsmethoden | 26 |
| 5 | Ergebnisse | 31 |
| 5.1 | Dynamik von substratgestützten Membranen und gebundenen Makromolekülen | 31 |
| 5.1.1 | Substratinduzierte Membranentmischung in Vesikeln (P1, Anhang 7.1) | 32 |
| 5.1.2 | Dynamik von DNA Elektrophorese auf SLBs (P2, Anhang 7.2) | 32 |
| 5.2 | Aktive Manipulation von substratgestützten Membranen und gebundenen Makromolekülen | 37 |
| 5.2.1 | Dynamische Entmischung von SLBs durch Surface Acoustic Waves (P3, Anhang 7.3) | 37 |
| 5.2.2 | Transport, Separation und Ansammlung von Proteinen auf SLBs (P4, Anhang 7.4) | 41 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.2.3 | Transport und Strukturierung von DNA auf SLBs (M1, Anhang 7.5) | 46 |
| 6 | Ausblick | 53 |
| 7 | Anhang | 55 |
| 7.1 | Originalpublikation P1 | 55 |
| 7.2 | Originalpublikation P2 | 57 |
| 7.3 | Originalpublikation P3 | 59 |
| 7.4 | Originalpublikation P4 | 61 |
| 7.5 | Manuskript M1 | 63 |
| 7.6 | Vesikelfusionsmethode zur Präparation von substratgestützten Membranen | 77 |
| 7.7 | Herstellung phasenseparierter grosser Vesikel (GUVs) | 77 |
| 7.8 | Elektronenstrahlolithographie zur Herstellung optischer Masken | 78 |
| 7.9 | Optische Lithographie zur Vorbereitung der IDT-Strukturen | 78 |
| 7.10 | Abkürzungsverzeichnis | 80 |

1 Zusammenfassung

In der Zellmembran spielt die lokale Dynamik von fluktuierenden Funktionseinheiten aus Proteinen und Lipidmikrodomänen eine entscheidende Rolle z.B. bei der örtlichen Anreicherung von Signalmolekülen, bei der Steuerung der Membranfluidität, der Regulation der Neurotransmission und dem Rezeptorenaustausch. Für die Entwicklung integrierter *Lab-on-a-chip* Anwendungen bieten substratgestützte Lipidmembranen interessante Möglichkeiten, da sie wichtige Eigenschaften der Zellmembran besitzen, nämlich Fluidität, Struktur und Zusammensetzung. Ihre Eigenschaften sind über einen weiten Bereich einstellbar und sie sind mit relativ geringem Aufwand präparierbar, und durch den engen Kontakt mit der Oberfläche stellen sie eine Schnittstelle zwischen weicher Materie¹ und klassischen Festkörpern dar. In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung lithographisch und piezoelektrisch strukturierter Oberflächen mit Lipidmembranen (Dicke ca. 4nm) benutzt, um Membranen lateral zu entmischen und damit membrangebundene Makromoleküle lokal zu akkumulieren und aufzutrennen.

Phasendomänen in den Membranen dreikomponentiger Riesenvesikel wurden durch den Kontakt mit lithographisch strukturierten Glassubstraten mit abwechselnd nanoglatter und nanorauer Oberfläche und abwechselnd freitragender und substratunterstützter Membran lokal angereichert und diese Beobachtung durch ein einfaches Modell über die Linien- spannung der Domänen beschrieben. Substratgestützte Membranen² auf piezoelektrischen Substraten wurden mit Hilfe akustischer Oberflächenwellen³ schaltbar entlang der Knoten und Bäuche der stehenden Welle entmischt und der Mechanismus thermodynamisch über die Modulation der Freien Energie und damit der Membrandichte erklärt. Diese neuartige Methode dynamischer Membranmanipulation konnte direkt benutzt werden, um die Diffusionskonstante der Membranlipide mit $2\mu\text{m}^2/\text{s}$ zu messen. Aufbauend auf dieser Methode konnte gezeigt werden, daß verschiedene membrangebundene Proteine unabhängig von der Art ihrer Bindung an die SLB (kovalent oder elektrostatisch) durch SAWs über Größenordnungen akkumuliert, lokal separiert und durch Schwebungen über makroskopische Distanzen transportiert werden können.

Elektrostatisch an SLBs gebundene DNA folgte einer ähnlichen Dynamik und konnte durch Verwendung zweier gekreuzter stehender Wellen schachbrettartig akkumuliert werden. Über die Beobachtung des zeitlichen Zerfalls dieses Musters konnten die Diffusionskonstanten von kurzen DNA-Strängen (DNA Oligos) verschiedener Länge mit einer neuarti-

¹Soft matter

²Supported Lipid Bilayers, SLBs

³Surface Acoustic Waves, SAWs

gen Methode gemessen werden und mit FRAP Messungen der Dynamik von DNA-Oligos in Abhängigkeit ihrer Länge, ihrer Flächendichte und der Salzkonzentration auf SLBs verglichen werden. Dabei wurde ein $1/N$ Zusammenhang der Diffusionskonstante mit der DNA Länge gefunden. Das dynamische Verhalten langer DNA Stränge auf SLBs in einem elektrischen Feld (Elektrophorese) konnte schließlich durch Fluoreszenzmikroskopie beobachtet und durch ein Modell ähnlich der Theorie der Gelelektrophorese erklärt werden (*Biased Reptation Model*).

Die in dieser Arbeit vorgelegten Erkenntnisse werden zum besseren Verständnis der Lipidmembran beitragen, neue Methoden zur Strukturierung substratgestützter Membranen bereitstellen, und den Weg ebnen zu einer Vielzahl denkbarer Anwendungen auf dem Gebiet der Miniaturisierung (*Lab-on-a-Chip*) von Analyse und Synthese. So rückt beispielsweise die Auftrennung von Transmembranproteinen, das Verschieben verschiedener biorelevanter Moleküle (z.B. DNA), gar der Aufbau von Funktionseinheiten einer molekularen Fabrik in zwei Dimensionen (*Flatland Factory*) durch Kombination mit anderen Methoden (z.B. Mikrofluidik, Laser, Oberflächenfunktionalisierung...) in greifbare Nähe. So ist beispielsweise der Aufbau synthetischer enzymatischer Netzwerke auf Oberflächen, kombiniert mit SAW-getriebenem Substrattransport denkbar.

2 Einleitung

Die Membranen von Zellen (z.B. eines roten Blutkörperchens mit Durchmesser $8\mu m$ [1]), die das Innere und Äussere von Zellen definieren, bestehen aus einer fluiden Doppelschicht von ungefähr $10^8 - 10^{10}$ Lipidmolekülen, die jeweils einige nm lang sind und einen Durchmesser von weniger als $1nm$ haben. In diese Lipiddoppelschicht eingebettet sind funktionale Proteine wie Ionenpumpen (z.B. ATPase, [2]) oder Zelladhäsionsproteine wie z.B. Integrine [3], die mechanische Reize von außen in die Zelle weiterleiten und so für die Zell-Zellwechselwirkungen wichtig sind, daran gebunden z.B. Annexin, das in der Membranorganisation eine entscheidende Rolle spielt [4]. Da auch die Organellen innerhalb der Zelle aus gefalteten Lipidmembranen bestehen¹, ist die Kenntnis der Funktionsweise von Lipidmembranen und an sie gebundener Makromoleküle für das Verständnis der Zelle und damit auch des menschlichen Körpers wichtig, z.B. zum Verständnis der Regulation der Neurotransmission und des Rezeptorenaustausches [6, 7]. Eine der wichtigsten Ursachen für Säuglingssterblichkeit ist Atemnotsyndrom des Neugeborenen (ANS), die durch fehlerhafte Lipidzusammensetzung der Lungenbläschenmembranen hervorgerufen wird. Sie kann durch Einbringen von Detergenzien in die Lunge geheilt werden, was die Elastizität der Lungenbläschenmembranen und damit den Sauerstoffaustausch erhöht [8, 9]. Da eine Vielzahl der bekannten Medikamente an Membranproteinen wirkt (allein 45% an Membranrezeptoren [10]) und die Gefährlichkeit eines Virus direkt mit seiner Bindungswahrscheinlichkeit an die Membran und seiner Fähigkeit, diese zu durchdringen zusammenhängt, besteht an diesem Gebiet auch medizinisches und pharmakologisches Interesse. Aufgrund der Komplexität einer realen Zellmembran, die aus einer Vielzahl verschiedener Lipide und Proteine in Wechselwirkung mit der Glykokalix und dem Zytoskelett besteht, untersucht man häufig zunächst Modellmembranen einfacherer und bekannter Zusammensetzung [11], in dieser Arbeit große Vesikel [12, 13] und substratgestützte Membranen [14]. Vesikel (auch Liposomen) sind kugelförmige Gebilde von $20nm - 100\mu m$ Durchmesser, die aus einer Lipiddoppelschicht bestehen und so als das einfachste denkbare Modell einer Zelle angesehen werden können [15]. Je nach Lipidzusammensetzung bilden sich selbst-assembliert verblüffend komplexe Gebilde [16, 17], deren Eigenschaften gut eingestellt und mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden können. Die Theorie zu Spannung und Biegeelastizität von Lipidmembranen, die diese Formenvielfalt erklären kann, entwickelten u.a. Helfrich [18], Evans [19] und Lipowsky [16, 20]. Durch die Minimalisierung der biegeelastischen Energie und durch induzierte Krümmungen wird die Form von Zellen und Organellen kontrolliert, die sich energetisch auf Minimalflächen der Biegeelastizität befin-

¹z.B. das endoplasmatische Retikulum, der Zellkern oder die Mitochondrien [5]

den. Substratgestützte Membranen² sind Lipiddoppelschichten, die auf Festkörper (z.B. Glas, Silizium, Mica) entweder direkt [14], oder auf einer Polymerkissenzwischen-schicht [21] aufgebracht werden. Sie behalten ihre Fluidität innerhalb der Ebene bei, sind aber in z-Richtung fixiert und sind auf der dem Substrat abgewandten Seite frei zugänglich. Es lassen sich Makromoleküle wie Proteine und DNA anbinden und untersuchen [22, 23]. An Lipidmembranen gebundene Makromoleküle wie z.B. Proteine oder DNA besitzen nur laterale Freiheitsgrade der Verschiebung [24, 25]. SLBs bieten so experimentell die Möglichkeit, Thermodynamik, Fluidodynamik und Polymerphysik in zwei Dimensionen zu untersuchen. Die Analogie zu gut untersuchten zweidimensional eingesperrten (*2D confinement*) Elektronengasen wie z.B. in dünnen leitenden Schichten auf Halbleitern [26, 27] oder Graphen [28], die spannende quantenmechanische Eigenschaften haben, liegt nahe. Gerade SLBs sind dankbare Modellmembranen, denn sie erlauben Untersuchungen mit hochauflösenden Methoden wie AFM³ [29], Röntgen- und Neutronenstreuung [30, 31], Fluoreszenzmikroskopie [32] und FCS⁴ [33], da sie dauerhaft in einer definierten z-Position gehalten werden. Desweiteren lassen sie sich optisch [34] und über ihren engen Kontakt mit dem Substrat strukturieren, z.B. durch klassische Mikrostrukturierung [35] oder verformbare Substrate [36]. Dynamisch beeinflussen kann man sie z.B. durch elektrische Felder [37] und hydrodynamischen Fluß [38].

Diese vielfältigen Untersuchungs- und Strukturierungsmöglichkeiten bieten interessante Perspektiven auf dem Weg zum Westentaschenlabor (*Lab-on-a-Chip*), also Analyse und Synthese von Substanzen im mikroskopischen Maßstab. Vor allem aber sind strukturierte Lipidmembranen auch in der Natur von großer Bedeutung, denn Zellmembranen sind keine rein passiven Gebilde, in denen Proteine wie in einer zweidimensionalen Flüssigkeit umherdiffundieren (*Fluid Mosaic Model* [39]). So ist beispielsweise die Funktion von Membranproteinen stark abhängig vom Zustand der sie umgebenden Lipide [40] und Proteine sind umgeben von einem Halo spezifischer Lipide [41]. Die Lipidzusammensetzung wird von der Zelle auch mit großem Aufwand konstant in der Nähe eines Phasenüberganges gehalten [42, 43]. So schlägt das *Lipid Raft* Modell [44] funktionale fluktuierende nanoskopische Domänen in Zellmembranen vor, die mit Membranproteinen assoziiert sind. Es wird auch diskutiert, ob Phasenumwandlungen eine Rolle bei der Nervenleitung spielen [45, 46, 47].

Letztlich fehlt jedoch noch immer das endgültige Verständnis, welche Rolle lokale Phasenumwandlungen in Zellmembranen spielen, und es fehlt ebenso an experimentellen Möglichkeiten, die Dichte von Modellmembranen lokal zu modulieren.

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode entwickelt, mehrkomponentige SLBs durch angelegte akustische Oberflächenwellen (SAWs) dynamisch schaltbar zu entmischen (Kap. 7.3). Als Mechanismus wird eine periodische Modulation der Membrandichte vorgeschlagen, was durch eine Vielzahl von Beobachtungen gestützt und durch ein thermodynamisches Mo-

²*Supported lipid bilayers*, SLBs

³Atomic Force Microscopy, Rasterkraftmikroskop

⁴Fluorescence Correlation Spectroscopy

dell erklärt wird. Diese Methode konnte benutzt werden, um die Diffusionskonstante von Lipidmembranen und angebundenen Makromolekülen zu messen (Kap. 7.5), DNA und Proteine lokal zu akkumulieren (Kap. 7.4, 7.5), über die Oberfläche zu schieben, und um membrangebundene Proteine ähnlicher Struktur voneinander zu trennen (Kap. 7.4). Aufbauend auf dieser Methode konnte gezeigt werden, daß verschiedene membrangebundene Proteine unabhängig von der Art ihrer Bindung an die SLB (kovalent oder elektrostatisch) durch SAWs über Größenordnungen akkumuliert, lokal separiert und durch Schwebungen über makroskopische Distanzen transportiert werden können.

Elektrostatisch an SLBs gebundene DNA verhielt sich ähnlich wie die membrangebundenen Proteine und konnte durch Verwendung zweier gekreuzter stehender Wellen schachbrettartig akkumuliert werden (s. Kap. 7.5). Die Diffusionskonstanten von kurzen DNA-Strängen (DNA Oligos) verschiedener Länge konnten über die Beobachtung des Musterzerfalls gemessen werden und mit FRAP⁵ Messungen der Dynamik von DNA-Oligos in Abhängigkeit ihrer Länge, ihrer Flächendichte und der Salzkonzentration auf SLBs verglichen werden. Die Dynamik langer DNA Stränge auf SLBs in einem elektrischen Feld (Elektrophorese) konnte schließlich durch Fluoreszenzmikroskopie beobachtet und durch ein „angepasstes Kriechmodell“ (*Biased Reptation Model*) ähnlich der Theorie der Gelelektrophorese erklärt werden (s. Kap. 7.2) in Übereinstimmung mit bisherigen Beobachtungen.

Die Domänen in phasenseparierten Riesenvesikeln ließen sich durch lithographisch mikrostrukturierte Substrate mit abwechselnd nanoglatter und nanorauer Oberfläche und abwechselnd freitragender und substratunterstützter Membran lokal akkumulieren. Diese Beobachtung konnte durch ein einfaches Modell über die Linienspannung erklärt werden (s. Kap. 7.1).

In Kapitel 3.1 werden die Grundlagen zu Lipiden und Membranen erklärt. Die verwendeten Methoden werden vorgestellt in Kapitel 4. Die Hauptergebnisse dieser Doktorarbeit sind die Publikationen im Anhang 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 und das Manuskript in 7.5, die in Kapitel 5 zusammengefaßt sind. In Kapitel 6 wird ein Ausblick auf zukünftige Projekte und mögliche weitere Entwicklungen dieses Projektes gegeben. Im Anhang sind neben den Originalpublikationen noch Details zur Präparation und ein Abkürzungs- und Literaturverzeichnis enthalten.

⁵Fluorescence Recovery after Photobleaching

3 Grundlagen

3.1 Die Zellmembran

3.1.1 Die Lipiddoppelschicht

Die Hauptkomponenten von Biomembranen sind neben den Membranproteinen Lipide und Cholesterol. Glycero-Phospholipide, Sphingolipide und Ganglioside bilden die drei Untergruppen der Lipide, die sich grundsätzlich in der Struktur des Verbindungsgliedes zwischen der hydrophilen Kopfgruppe und ein- oder zwei hydrophoben Kettengruppen unterscheiden [1].

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit Phospholipiden gearbeitet, die im Folgenden kurz Lipide genannt werden. Sie bestehen aus einer Kopfgruppe, die zwitterionisch, geladen oder auch stark modifiziert sein kann - in dieser Arbeit wurde z.B. mit fluoreszenzmarkierten Lipiden gearbeitet. Das Verbindungsglied (Rückgrat) besteht aus Glycerin, an das drei OH-Gruppen, zwei Fettsäurereste und eine Phosphatgruppe anschließen (s. Abb. 3.1). Die Kettengruppen schließlich unterscheiden sich nach Länge und Sättigungsgrad, d.h. der Zahl von unflexiblen ungesättigten Doppelbindungen, was sich sehr stark auf das Phasenverhalten der Membran auswirkt. Durch ihre Molekülstruktur bilden Lipide eine vergleichsweise hohe Elektronendichte in der Kopfgruppe aus. Dies führt zur elektrischen Polarisierung des Moleküls und zur Ausbildung ihres amphiphilen Charakters.

Getrieben durch den hydrophoben Effekt lagern sich diese Moleküle in Wasser zu geschlossenen Strukturen zusammen, wobei die Kopfgruppen zum Wasser und die Kettengruppen jeweils zueinander zeigen. Es erscheint zunächst paradox, daß sich hochgeordnete Strukturen wie Lipiddoppelschichten spontan aus einzelnen Lipidmolekülen bilden - der zweite Hauptsatz der Thermodynamik sagt stets ein spontanes Anwachsen der Entropie voraus. Der scheinbare Widerspruch löst sich auf, wenn man das reichlich vorhandene Wasser (bei den in dieser Arbeit verwendeten Systemen mehr als 99%) mitberücksichtigt: Jedes einzelne Lipidmolekül in Wasser ist umgeben von einer Wolke aus geordneten Wassermolekülen, die über fluktuierende Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken. Die Entropie des Gesamtsystems kann deutlich verringert werden, wenn sich mehrere Lipidmoleküle zusammenlagern und sich diese Wolke aus geordnetem Wasser teilen, bis schließlich nur noch die hydrophilen Kopfgruppen Kontakt mit dem Wasser haben. Aus der Geometrie der beteiligten Lipidmoleküle und deren Mischungsverhältnis zum Wasser ergeben sich direkt die sich tatsächlich bildenden Strukturen, nämlich Vesikel, Doppelschichten oder Mizellen (s. Abb. 3.2) bei sehr hohem Wasseranteil, sowie deutlich komplexere Strukturen

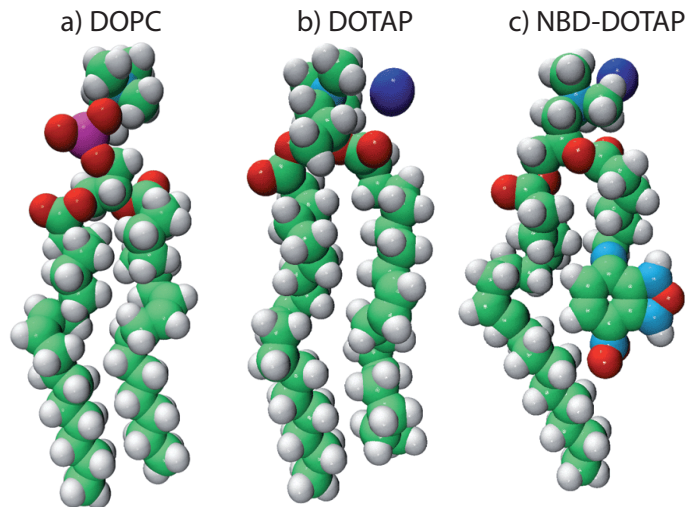


Abbildung 3.1: a) Typisches zwitterionisches Lipidmolekül DOPC. Es besteht aus hydrophoben Kohlenwasserstoffketten, einer phosphorylierten Zwischengruppe (Rückgrat) und einer hydrophilen Kopfgruppe. b) das kationische Lipid DOTAP hat ähnliche Struktur, jedoch kann unter Wasser das Chloridatom abgespalten werden und es bleibt eine positive Ladung zurück. c) einige der verwendeten Lipide tragen ein Fluoreszenzlabel. Das hier gezeigte NBD DOTAP trägt den Farbstoff NBD (Ringstruktur) in der rechten Kette. Kohlenstoff ist grün, Wasserstoff weiss, Sauerstoff rot, Phosphor violett, Stickstoff hellblau und Chlor dunkelblau dargestellt. (Nach www.avantilipids.com)

bei geringem Wasseranteil. Die Lipiddoppelschicht ist von besonderer Bedeutung, da sie als „Grundgerüst“ zellulärer Membranen dient, in der die Proteine als funktionale Einheiten verankert sind.

3.1.2 Phasenverhalten

Aus physikalischer Sicht stellen Membranen ein interessantes Forschungsgebiet dar. Als zweidimensionale Flüssigkeit besitzt die Membran viele Eigenschaften von Flüssigkristallen, sie kann beispielsweise als smektische Phase bezeichnet werden. Es existiert eine Vielzahl von Phasen, in denen sich die Lipide organisieren können. Die treibenden Kräfte sind entropischer und enthalpischer Natur, also Paradebeispiele für angewandte Thermodynamik komplexer selbstorganisierender Systeme [49].

Bei niedrigem Wasseranteil bilden sich mit steigendem Wasseranteil (abhängig von der geometrischen Form der Lipide) drei Klassen homogener Zustände: die hexagonale, kubische und lamellare Phase (s. Abb. 3.2), die im Falle sehr niedriger Wasseranteile (< 10%) invertiert (d.h. die Kopfgruppen zeigen zueinander) auftreten können. Im Grenzfall verdünnter Lösungen mit hohem Wasseranteil bilden sich Vesikel aus geschlossenen Lipiddoppelschichten aus (s. Abb. 3.2). Für stark von zylindrischer Gestalt abweichende Lipide existieren

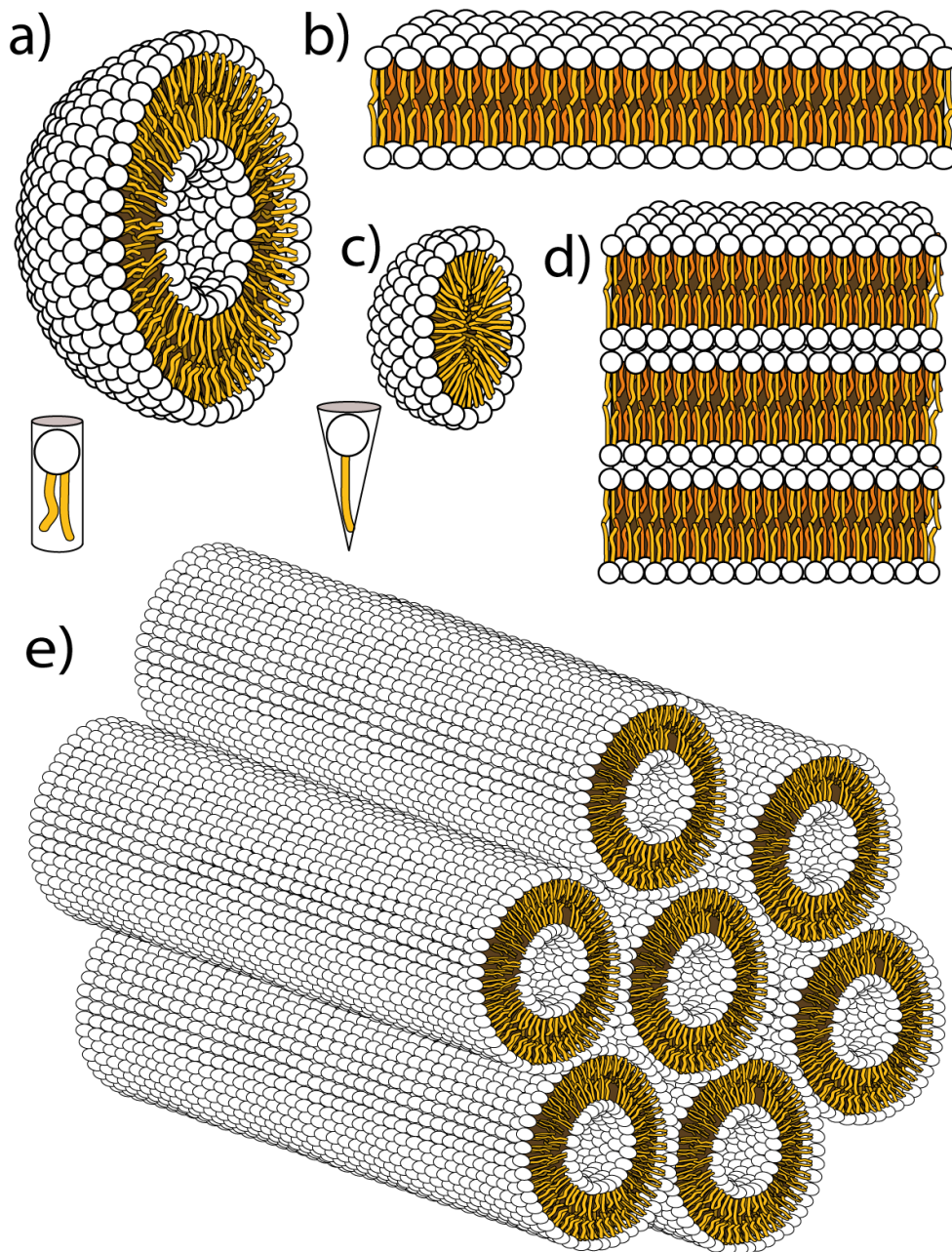


Abbildung 3.2: Verschiedene Lipidphasen mit geringem Wasseranteil. a) Unilamellares Vesikel. Diese relativ schwach gekrümmten Strukturen bilden sich spontan bei hohem Wasseranteil und zylindrischen Lipiden, genauso Lipiddoppelschichten b) und Lipidmultischichten (d) (lamellare Phasen). Mizellen c) bilden sich aus kegelförmigen Lipiden, komplexere Strukturen wie die hexagonale Röhrenstruktur in e) bei hohem Lipidanteil in der wässrigen Lösung. Die kubische Phase besteht aus Röhrensystemen, die in alle Raumrichtungen verbunden sind (nicht dargestellt) (Nach [48])

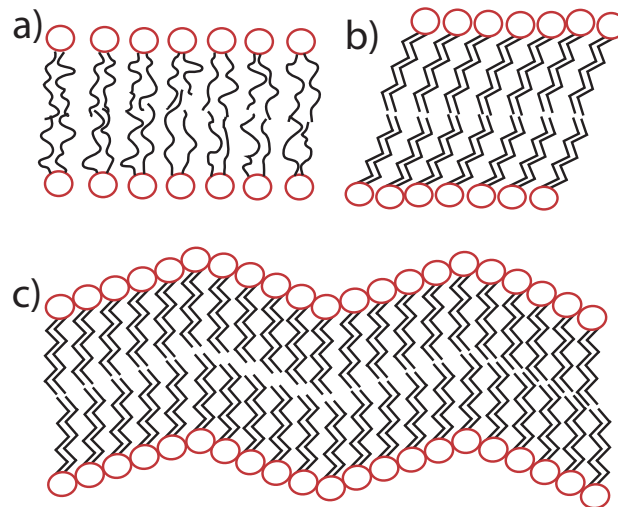


Abbildung 3.3: a) Fluide Phase L_α entsprechend smektisch A b) Quasikristalline Phase L_β c) quasikristalline Phase P_β (beide entsprechend smektisch B). Die gezeigten Phasen treten bei Membranen aus Lipiden mit großen Kopfgruppen und gesättigten hydrophoben Ketten auf, z.B. Phosphatidylcholinen (PC). L_β und P_β sind Tieftemperaturphasen, bei höheren Temperaturen „schmelzen“ die Ketten in die ungeordnetere Konfiguration L_α , bei der die Membran dünner, die mittlere Fläche pro Lipid aber größer ist.

auch Mizellenstrukturen, die ebenso invertiert vorkommen können. Die genaue Struktur von Lipidmembranen ist auch stark temperaturabhängig. Beispielsweise durchlaufen die in dieser Arbeit häufig verwendeten Phosphatidylcholine (z.B. DOPC) mit zunehmender Temperatur die in Abb. 3.3 gezeigten Phasenzustände L_β , P_β und L_α (entsprechen den flüssigkristallinen Phasen smektisch A und smektisch B, L_β und P_β werden auch Gelphasen genannt), wobei im Falle sehr kleiner Kopfgruppen P_β entfallen kann [1].

Entscheidend ist bei diesen Phasenübergängen der unterschiedliche Ordnungsgrad der Ketten: Während sie bei hohen Temperaturen in ungeordneter Form vorliegen und frei fluktuieren, sind bei niedrigeren Temperaturen etliche Freiheitsgrade „ausgefroren“ und die Membranen sind dichter gepackt - die durchschnittliche Fläche pro Lipid sinkt von $0,64\text{nm}^2$ (L_α) auf $0,52\text{nm}^2$ (P_β), dafür wird die Membran aufgrund der ausgerichteten Ketten dicker (von $4,1\text{nm}$ auf $4,6\text{nm}$) [1].

3.1.3 Aufbau und Funktion der Zellmembran

Biomembranen grenzen verschiedene Bereiche innerhalb der Zelle voneinander ab, im Falle der Zellmembran das Innere vom Äußeren. Sie bilden selektive Barrieren, die grundsätzlich für die meisten Stoffe (Ionen, polare Moleküle wie z.B. Wasser, größere Objekte wie z.B. Proteine, Viren...) undurchlässig sind. Häufig jedoch existieren Transportmechanismen durch die Membran hindurch (Pumpen, Ionenkanäle), die der Zelle den Aufbau hoher Konzentrationsgradienten bzw. schlicht die Kontrolle darüber erlauben, welche Stoffe inner-

und außerhalb eines umschlossenen Bereiches zu finden sind. Ihr hoher elektrischer Widerstand ($10^7 V/m$) ermöglicht den Aufbau elektrischer Potenzialdifferenzen und somit die Nutzung der Membran als Energiespeicher und den Antrieb molekularer Motoren z.B. über Protonenfluß durch die Zellmembran. Nicht nur als Barrieren dienen Biomembranen, sondern sie sind auch aufgrund ihres besonderen Aufbaus Ort zahlreicher proteinkatalysierter biochemischer Prozesse.

Biomembranen setzen sich aus zwei Hauptbestandteilen zusammen: Zum einen aus Lipiden, die sich aufgrund ihres amphiphilen Charakters, getrieben durch den hydrophoben Effekt, in wässriger Lösung zu Doppelschichten zusammenlagern, zum anderen aus Proteinen, die als funktionale Einheiten in der Lipiddoppelschicht eingebettet sind. Die Zellmembran wird von der Innenseite stabilisiert durch das Zytoskelett bestehend aus Aktin- und Myosinfilamenten, und ist von außen überzogen von der Glykokalix (Abb. 3.4).

Die Membranproteine machen einen wesentlichen Anteil der Zellmembran aus (25-80% Gewicht, je nach Funktion), sie sitzen also sehr dichtgedrängt. Gleichzeitig sollte man bei Betrachtung schematischer Abbildungen wie (Abb. 3.4) auch nie vergessen, daß molekulare Strukturen wie Membranen bei Raumtemperatur sehr stark fluktuieren, Proteine und Lipide also in starker Bewegung sind. Alle Membranbestandteile diffundieren innerhalb der Membranebene, gleichzeitig gibt es Fluktuationen der Membran in z-Richtung (Biegemoden). So werden alle energetisch zugänglichen Konformationen des gegebenen Systems kontinuierlich durchgespielt. Nicht nur direkte Wechselwirkungen zwischen den Proteinen sind für ihre Funktion wichtig, sondern auch Interaktionen, die über lokale Lipidzusammensetzungen und -phasen vermittelt werden. Interessanterweise hält die Zelle ihre Lipidmembranzusammensetzung mit großem Energieaufwand stets nahe eines Phasenüberganges [42, 43], sie reagiert beispielsweise auf fallende Temperaturen mit dem verstärkten Einbau von Cholesterol, was die Membran zwar versteift, jedoch ihren Übergang in die Gelphase verhindert. Diese Befunde führten zum aktuellen Lipid Raft Modell von Simons und Ikonen 1997 [44], die nanoskopische, funktionelle Mikrodomänen in Zellmembranen postulieren, die mit Proteinen assoziiert sind. Dieses Modell wird nach wie vor kontrovers diskutiert, klar scheint mittlerweile aber, daß die Lipide der Zellmembran mehr Aufgaben erfüllen als nur die Zelle einzuschließen und eine passive Diffusionsmatrix bereitzustellen [50].

Das Verständnis der Zellmembran hat sich im Laufe der Zeit langsam entwickelt. Besondere Schwierigkeiten, die experimentellen Erkenntnissen lange Zeit im Weg standen, ist die sehr geringe Dicke der Membran (ca. $4nm$), ihre optische Transparenz, sowie ihre hohe Dynamik. So vermutete Charles Overton 1895, daß die Zellmembran aus Lipiden besteht, da sie für lipophile Moleküle sehr viel leichter zu durchdringen ist als für hydrophile. Gorter und Grendel maßen 1925 die Fläche der Lipide von Blutkörperchen im Langmuirtrog, was für die Monolage das Doppelte der Zelloberfläche ergab, was auf die Anordnung der Membranlipide als Doppellage hindeutete [51]. Erstmals konnte der tatsächliche Aufbau aus Lipidmolekülen, deren hydrophobe Ketten sich berühren und deren hydrophile Kopfgruppen nach außen zum Wasser hin zeigen, postuliert werden. Jedoch konnte eine so

einfache Struktur wie die Lipiddoppelschicht unmöglich die vielfältigen Funktionen einer lebendigen Zellmembran haben - Proteine fehlen in diesem Modell noch völlig. Erste experimentelle Nachweise für die Assoziation von Lipiddoppelschicht und Proteinen gelangen 1935, als von Danielli und Davson im Elektronenmikroskop Doppelschichten gefunden wurden. Sie nahmen aufgrund ihrer Beobachtung eine „Sandwich-Struktur“ an, die aus einer Lipiddoppelschicht und außen daran gebundenen Proteinen besteht [52].

Singer und Nicholson entwickelten 1972 das lange gültige Flüssig-Mosaik-Modell, bei dem erstmalig die Dynamik der Membran berücksichtigt wurde [39]. Die Hauptneuerung hier war, die Zellmembran als zweidimensionale Flüssigkeit zu betrachten, in der Lipide und Proteine frei umherschwimmen können, jedoch die Ebene nur schwer verlassen. Die Fluidität der Zellmembran ist eine sehr zentrale Eigenschaft: Die Hülle der Zelle ist somit weich, flexibel, eventuelle Poren heilen sofort von selbst zu, sie kann ohne Weiteres wachsen und in sich geschlossene Bereiche können sich abschnüren. Letzteres ist von besonderer Bedeutung für den Transport von Stoffen durch die Membran hindurch¹ und natürlich für die Zellteilung. Auch können Proteine stets dahin transportiert werden, wo sie gerade gebraucht werden. Ungenügend beschrieben durch das Fluid Mosaic Model werden zwei Tatsachen: Zum einen, daß Proteine einen großen Anteil der Zellmembran ausmachen (25-80%), sie folglich nicht verdünnt umherschwimmen sondern stets interagieren, zum anderen, daß die meisten Proteine deutlich größer sind als eine ungestörte Lipiddoppelschicht. Den zweiten Punkt nahmen Mouritsen und Bloom 1984 zum Anlaß, das *Mattress*-Modell der Zellmembran zu entwickeln [53], das besagt, daß der in die Membran eingebettete hydrophobe Teil der Membranproteine nicht stets genau die entsprechende Größe der Zellmembran hat und sich somit Lipide verschiedener Kettenlänge passend um bestimmte Membranproteine lagern (vgl. Abb. 3.5).

Zusammengefaßt wurden diese neueren Erkenntnisse im Reviewartikel von Engelman „Membranes are more mosaic than fluid“, 2005 [54].

3.1.4 Funktionale Phasendomänen „Lipid Rafts“

Seit der Entdeckung detergentresistenter Membranbestandteile werden funktionale Mikrodomänen, die Kai Simons und Gerrit van Meer 1988 „Lipid Rafts“ nannten [42], als ein dynamisch strukturiertes Modell diskutiert (verfeinert von Simons und Ikonen 1997 [44]). Zellmembranen sind keine simplen homogenen Gebilde, sondern ihre Struktur hängt stark von ihrer lokalen Zusammensetzung ab: Beispielsweise lagern sich um Transmembranproteine mit großem hydrophoben „Bauch“ bevorzugt langkettigere Lipide [53]. Die Zellmembran befindet sich stets nahe eines Phasenüberganges [43], was über die Lipidzusammensetzung von der Zelle kontinuierlich nachgeregelt wird. Diese Fakten legen die Vermutung nahe, daß die lokale Membranstruktur wichtig für die Funktion der Membran ist, bzw. daß lokale Phasenübergänge für bestimmte Funktionalitäten, z.B. Schalten von Proteinen oder die lokale Ansammlung mehrerer Proteine, benutzt wird.

¹Pino- und Phagozytose

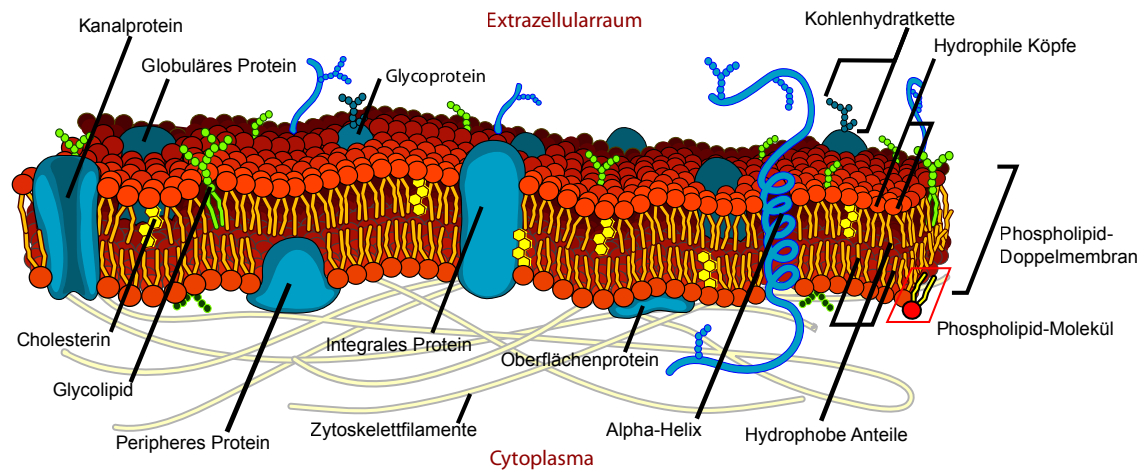


Abbildung 3.4: Schema einer Zellmembran. Hauptbestandteil ist die Lipiddoppelschicht, die aus amphiphilen Lipidmolekülen besteht, die sich spontan in Wasser zu solchen Doppelschichten zusammenlagern. In dieser Lipiddoppelschicht können Transmembranproteine diffundieren, andere Proteine sind lediglich in der Membran verankert oder sogar nur daran gebunden. Innerhalb der Zelle befindet sich das Zytoskelett, das aktiv die Membran beeinflusst, außerhalb eine Schicht aus Polysaccharidmolekülen (Glykokalix) (Nach [48]).

In Lipid Rafts wird ein zweifach erhöhter Cholesterol- und Sphingomyelinanteil vermutet, der diese Membranbereiche sowohl dicker als auch geordneter macht und somit bestimmte Proteine lokal anreichert. Das kleinere Cholesterol lagert sich zwischen die Ketten der umgebenden Lipide, nimmt ihnen so einen Teil ihrer Freiheitsgrade und zwingt sie in eine geordnetere Phase (s. Abb. 5.1). Diese Phase stellt nun den Ort erhöhter Aufenthaltswahrscheinlichkeit für bestimmte Proteine und Rezeptoren dar aufgrund der unterschiedlichen Größe des hydrophoben Bereiches (s. Abb. 3.5).

Die Definition des Begriffs „Lipid Raft“ ist nach wie vor uneinheitlich, jedoch unumstritten ist mittlerweile die Existenz und funktionale Bedeutung von Mikrodomänen in Zellmembranen. Es existieren fundamentale experimentelle Schwierigkeiten bei der Untersuchung dieser Objekte: Ihre Größe wird zwischen $1\text{nm} - 1\mu\text{m}$ geschätzt, ihre Lebensdauer zwischen ms und Minuten, was im Extremfall vermutlich beides nicht physiologisch relevant wäre und die Beobachtung stark erschwert. Direkt konnten Lipid Rafts bisher nicht beobachtet werden. In dieser Arbeit werden die begrifflichen Schwierigkeiten umgangen, indem der physikalische Begriff „Mikrodomänen“ für Phasenausscheidungen in Membranen verwendet wird.

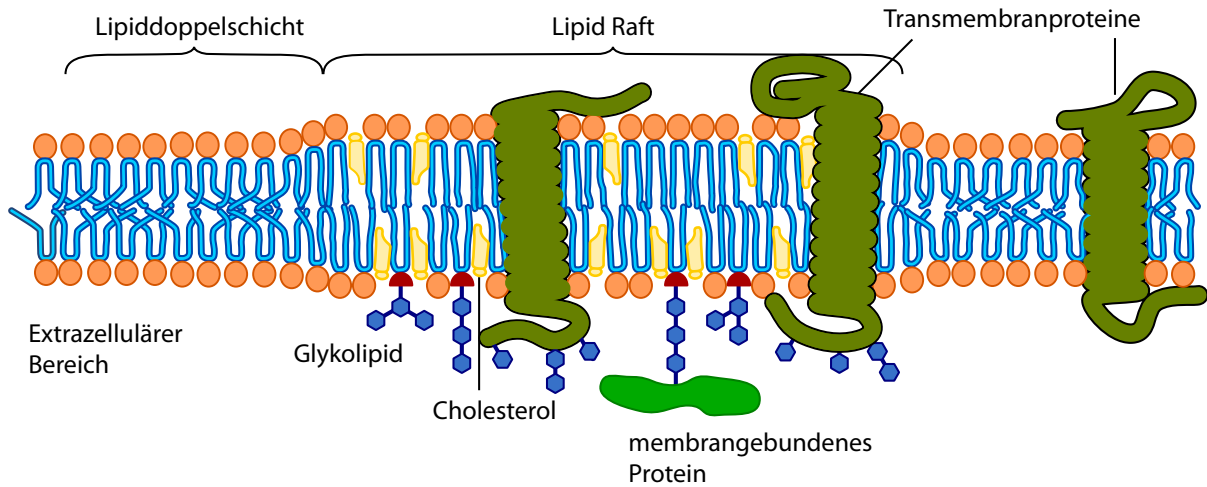


Abbildung 3.5: Ein *Lipid Raft*-Bereich innerhalb einer gewöhnlichen Lipiddoppelschicht. Die Membran ist in diesem Bereich dicker, die Ketten sind geordneter, was beides durch das eingelagerte Cholesterin bewirkt wird. Aufgrund der höheren Dicke ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für Transmembranproteine mit großen hydrophoben Gruppen hier stark erhöht, im Gegensatz zu Transmembranproteinen mit kleiner hydrophober Gruppe (Nach [48]).

3.2 Modellmembranen

Zell- und vor allem auch Modellmembranen besitzen über die Lipidzusammensetzung hochgradig einstellbare selektive Eigenschaften. Zum Einen können sie zum Aufbau smarter Biosensoren [55] oder als Zell-Siliziumschnittstelle [56] genutzt werden, zum anderen aber haben sie auch das Potential zur aktiven Manipulation von Proben im Einzelmolekülbereich als Teil eines integrierten Miniaturlabors (*Lab-on-a-Chip*).

Im Folgenden werden einige wichtige Modellmembransysteme vorgestellt, für eine vollständige Auflistung s. Reviewartikel [11]. Sie behalten alle die grundsätzliche Lipiddoppelschichtstruktur bei, vereinfachen aber das zu beobachtende System im Vergleich zur lebenden Zelle in unterschiedlicher Weise, so daß die Funktion, Dynamik und Organisation einzelner Komponenten untersucht werden können. Viele Details über die Struktur von Lipidmembranen finden sich im Reviewartikel von Nagle et al.[57].

3.2.1 Vesikel

Die grundlegendste Eigenschaft der Zellmembran ist es, eine Barriere zu bilden. Ein sehr einfaches Modellsystem dafür, das zudem der Zelle in einigen fundamentalen Eigenschaften sehr stark ähnelt, stellen Vesikel dar (s. Abb. 3.2a). Sie bestehen aus einer einzigen Lipiddoppelschicht, die eine Kugelschale bildet. Da sich Lipide in Wasser spontan zu Doppelschichten zusammenlagern, ist ihre Herstellung in weiter Größenverteilung einfach, auch in großen Mengen. Vesikel werden nach ihrer Größe benannt nach SUVs (*Small unilamel-*

lar Vesicles, etwa 10–100nm), LUVs (*Large unilamellar vesicles*, etwa 100nm–1µm) und GUVs (*Giant unilamellar vesicles*, etwa 1µm–100µm). Die Durchmesser lassen sich also über vier Größenordnungen variieren: SUVs ähneln den Liposomen, die in Zellen als „Verpackung“ für bestimmte Stoffe dienen. Beispielsweise ist der Neurotransmitter, der zur Kommunikation zwischen zwei Nervenzellen (Neuronen) an ihren Ausläufern Axon und Dendrit im synaptischen Spalt dient, zunächst in kleinen synaptischen Vesikeln verpackt. Diese fusionieren mit der Zellmembran und schütten so den Neurotransmitter aus, sobald ein Nervenpuls² das Synapsenendköpfchen des Axons erreicht. Große Vesikel (GUVs) hingegen dienen seit einiger Zeit als Modellsystem für ganze Zellen [58]: Sie haben dieselbe Größenordnung wie Zellen, lassen sich in zellnahen Modell-Lipidmischungen präparieren und bequem mit Standard-Fluoreszenzmikroskopie untersuchen.

Kleine Vesikel (SUVs) können durch Beschallung einer Lipidlösung oder durch Extrusion hergestellt werden. Bei der Beschallung zerstört man größere Strukturen in den zunächst ausgetrockneten und dann gewässerten Lipidproben durch Ultraschallpulse. Hierzu dient ein Rüsselbeschaller³, der hohe Ultraschalleistung auf engem Raum konzentrieren kann. Die SUVs bilden sich von selbst in relativ breiter Größenverteilung, die von der Schalleistung abhängig ist.

Eine schmalere Größenverteilung der SUVs (oder LUVs) bekommt man durch Extrusion: Hierbei preßt man die Lipidlösung mittels Spritze mehrfach durch einen Filter mit der gewünschten Porengröße. Diese Methode hat den Vorteil, genauer definierte Vesikelgrößen herstellen zu können und Metallspäne in den Proben zu vermeiden.

Riesenvesikel (GUVs) werden durch Elektroformation hergestellt (s. Kap. 4.4), wobei an lipidbeschichtete leitende Platten unter Wasser eine Wechsellspannung angelegt wird, was zu lokaler Ausstülpung und Ablösen der Membranen führt. Bei den Experimenten mit GUVs (s. Kap. 7.1, 5.1.1) wurde eine ternäre Lipidmischung aus DOPC, Sphingomyelin und Cholesterol verwendet, die bei Raumtemperatur Mikrodomänen bildet.

In dieser Arbeit wurden die verwendeten SUVs mit Beschallung hergestellt, da sich SLBs durch beschallte Vesikel zuverlässiger herstellen lassen - vermutlich aufgrund ihrer weiteren Größenverteilung.

3.2.2 Substratgestützte Membranen (SLBs)

Außer freitragenden Modellmembranen wie Vesikeln benutzt man häufig festkörper- oder substratgestützte Membranen (*supported lipid bilayers*, SLBs). Die SLB ist die zentrale Modellmembran, mit der hier gearbeitet wurde. Substratgestützte Membranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, die auf ein normalerweise hydrophiles Substrat (z.B. Glas) aufgebracht wurde (s. Abb. 3.6). Sie ist auf dem Glas fixiert, kann also nicht spontan die Ebene verlassen. Zwischen Substrat und Membran befindet sich typischerweise ein wenige Moleküllagen ($< 0,5\text{nm}$) dicker Wasserfilm aus geordnetem Wasser, so daß beide

²Aktionspotential

³Tip Sonicator

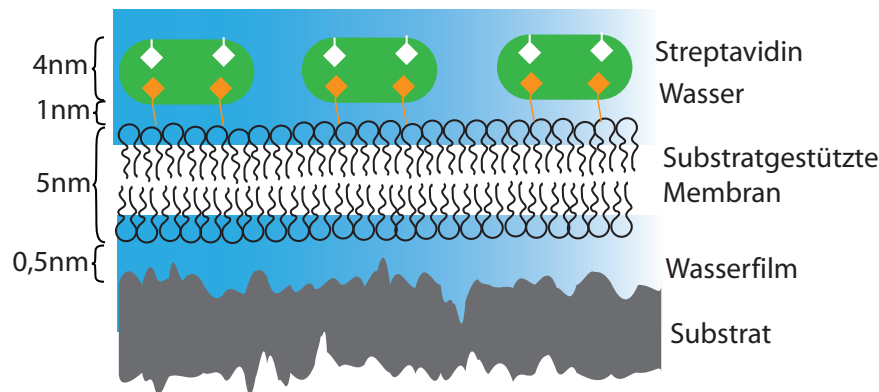


Abbildung 3.6: Schema einer substratgestützten Membran. Zwischen dem Substrat (z.B. ein Deckgläschen oder ein SAW-Chip) und der Membran befindet sich ein wenige Moleküllagen dicker Wasserfilm, der die Membran vom Substrat abhebt und fluide hält.

Monolagen der Membran fluide sind, d.h. sich die Lipidmoleküle frei in der Ebene diffusiv bewegen können. Trotzdem wird diskutiert, ob die ans Substrat grenzende Monolage durch Reibungseffekte abgebremst wird; diese Frage ist noch nicht abschließend geklärt - eine Beobachtung dieser Arbeit ließe sich so erklären, nämlich die zwei beobachteten Diffusionskonstanten in [59]. Sicher ist aber, daß sich Transmembranproteine aufgrund des begrenzten Platzes zwischen Substrat und SLB nicht in SLBs einlagern. Mikrometergroße Phasen sind in SLBs nicht mehr frei beweglich.

Um diese Beschränkungen zu umgehen, entwickelte man sog. polymerkissengestützten Membranen [21]: Bei diesen wird die Membran durch auf die Oberfläche aufgebrachte Polymere wie z.B. Polyethylenglykol (PEG) vom Substrat abgehoben. So lassen sich auch Membranproteine in die SLB einlagern. In dieser Arbeit wurde nicht mit Polymerkissen gearbeitet, da der enge Kontakt mit dem Substrat gewünscht war. Dennoch könnte diese Technik erlauben, auch große Transmembranproteine mit piezoelektrischen akustischen Oberflächenwellen (SAWs) zu transportieren und sogar eventuell aus nativen Membranen zu extrahieren.

SLBs erlauben eine Biofunktionalisierung von anorganischen Oberflächen wie Halbleitern oder optoelektronischen Anordnungen und auch polymerbeschichteten Materialien [14]. Membranen stellen eine gut kontrollierbare natürliche Umgebung dar für Proteine (wie z.B. Hormonrezeptoren oder Antikörper). Membranen können als nur nanometerdünne, aber kaum elektrisch leitende Schichten auf leitenden Materialien dienen, wobei in die Membran eingebrachte Rezeptoren Biosensoren darstellen (über elektrische oder optische Detektion). Substratgestützte Membranen, die durch weiche Polymerkissen oder nanometrische Wasserschichten vom direkten Kontakt mit der Oberfläche abgehoben sind, besitzen sehr ähnliche thermodynamische und strukturelle Eigenschaften wie freie Lipiddoppelschichten. Des Weiteren können SLBs biomimetisch präpariert werden mit genau definierten Adhäsionseigenschaften, z.B. der Rezeptordichte, was brauchbar für die Forschung an spezifischen Schlüssel-Schloß-Kräften während der Zelladhäsion und der Zell-

Zellerkennung ist. Diese Prozesse spielen eine entscheidende Rolle bei der Organisation von Zellen in Gewebestruktur.

Substratgestützte Membranen (SLBs) lassen sich mit mehreren Methoden auf Oberflächen aufbringen [60], hier werden die gängigsten kurz vorgestellt.

Die einfachste Methode ist, in Lösungsmittel (z.B. Chloroform, Isopropanol) gelöste Lipide auf die zu beschichtende Oberfläche aufzubringen, das Lösungsmittel zu verdampfen und dann die ausgetrocknete Lipidschicht unter Wasser zu setzen und durch Scherfluß zu spülen, bis nur noch eine Lipiddoppelschicht als stabilste Konformation übrig bleibt. Diese Methode wird in der Literatur häufig als „*spin coating*“ bezeichnet, da sich dünne Filme am besten durch schnelles Drehen des Substrates erzeugen lassen nachdem der Lösungsmitteltropfen aufgetragen wurde, ähnlich dem Auftragen von Photolacken für Lithographie mittels Lackschleuder. Es ist hier besonders auf ein vollständiges Verdampfen des Lösungsmittels zu achten, was nur durch längeres Lagern unter Vakuum erreichbar ist. Leider konnten die hauptsächlich in dieser Arbeit verwendeten Substrate nicht mit *spin coating* beschichtet werden, da es sich um in Platinen eingeklebte Chips handelte.

Eine weitere interessante und zuverlässige Methode ist die Methode des Lösungsmittel-austauschs (*solvent exchange*) [61]. Hier werden die Lipide in Alkohol-Wassermischungen in die Kammer gegeben, bei denen sie noch komplett gelöst sind. Schrittweise erhöht man den Wasseranteil, bis schlagartig der hydrophobe Effekt dominiert und sich die bekannten Doppelschichten bilden - überall in der Lösung, aber auch an den hydrophilen Oberflächen. Aufgrund der Benetzungseigenschaften von Alkoholen und der möglichen Empfindlichkeit der benutzten Kleber, Kunststoffe und des PDMS⁴-Dichtringes sowie der beobachteten niedrigeren Fluidität der mit Lösungsmittelaustausch hergestellten Membranen wurde diese Methode in dieser Arbeit kaum angewendet.

Die gängigste Methode, eine SLB zu erzeugen, ist die sogenannte Vesikelfusion [32]. Hierzu stellt man eine Emulsion aus kleinen Vesikeln (SUVs) am besten durch Beschallung (s. Anhang 7.6) her. Mit dieser Emulsion wird die Kammer befüllt. Die Vesikel binden an die zu beschichtende Oberfläche an und platzen schließlich auf (s. Abb. 3.7) bis das gesamte Substrat bedeckt ist. Nach etwa 45min hat sich eine durchgängig fluide Lipiddoppelschicht gebildet, und überschüssige sowie an die SLB gebundene Vesikel lassen sich wegspülen. Mit Vesikelfusion kann man auch schlecht zugängliche Oberflächen beschichten, z.B. Mikrofluidikkanäle oder sogar enge Kapillaren. Außerdem zeigen Erfahrungen am Lehrstuhl Rädler, daß mit Vesikelfusion erzeugte SLBs die höchste Fluidität aufweisen.

Bei richtig vorbehandelten Substraten funktioniert jede Methode, SLBs herzustellen mit hoher Zuverlässigkeit. Die Membranen sind sehr homogen, durchgängig fluide und weisen nur geringe Defekte auf. Sie sind über mehrere Tage stabil, solange sie unter Wasser bleiben. Luft an sich ist zwar nicht direkt schädlich, die sich beim Austrocknen bildende Wasser-Luft Grenzfläche reißt jedoch durch ihre hohe Oberflächenspannung große Löcher in die Membran.

⁴Polydimethylsiloxan

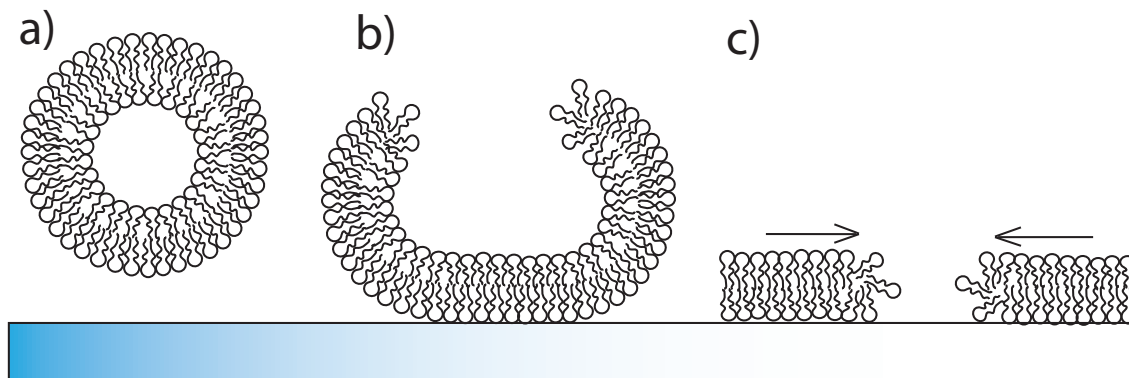


Abbildung 3.7: Kleine Vesikel in Suspension binden an die zu beschichtende Oberfläche (a), platzen auf (b) und viele geplatzte Vesikel beschichten schließlich die gesamte Oberfläche und eine durchgängige Lipiddoppelschicht bildet sich (c).

Der Vollständigkeit halber sollen hier noch etliche andere Modellmembranen erwähnt werden, die für die Forschung von allergrößter Bedeutung sind, in dieser Arbeit aber keine Rolle spielten: Über Poren gespannte Schwarze Lipidmembranen⁵, Monolagen z.B. zu untersuchen im Langmuirtrog, Nanodisks, Multilagen und Lipid-DNA-Komplexe [62].

3.3 Beeinflussung von Membranen und membrangebundenen Makromolekülen

In dieser Arbeit wurden zwei neuartige Methoden zur Manipulation von Lipidmembranen entwickelt: Die Phasentrennung von Riesenvesikeln (GUVs) durch Mikrostrukturen, sowie die dynamische Entmischung von substratgestützten Membranen und daran gebundenen Makromolekülen durch piezoelektrische Oberflächenwellen (SAWs).

Hier werden die bereits in der Literatur beschriebenen und zum Teil bereits seit etwa 15 Jahren gängigen Methoden, SLBs zu manipulieren, zusammengefasst.

Zunächst kann man die Membran mittels Diffusionsbarrieren in fluide Unterbereiche einteilen, sogenannte „corrals“ (Gehege). Dazu bringt man mittels Lithografie z.B. Gold-, Aluminiumoxid-, oder Photolackbarrieren auf ein Glassubstrat auf, auf denen keine Membran spreiten kann. Die membranbedeckten Bereiche sind in sich fluide, können aber voneinander separiert werden, Lipide können also nicht über die Barrieren hinweg diffundieren. Wenn die Lipide in einer Membran elektrisch geladen sind (oder zumindest eine von mehreren Komponenten eine Ladung trägt), kann man Membranen durch elektrische Felder entmischen. Man legt entweder über aufstrukturierte Goldelektroden oder über in die Lösung gehängte Drähte eine Spannung an, der die Lipide dann je nach Ladung folgen.

⁵Black Lipid Membranes, BLMs

Typischerweise bildet sich hier für den häufigen Fall eines quasihomogenen Feldes eine Boltzmannverteilung der Lipiddichte heraus [37, 63].

Membranen mit komplizierterer Zusammensetzung, die Phasen bilden können, reagieren direkt auf die Krümmung des Substrates [64]. In Bereichen hoher Krümmung sammeln sich andere Mikrodomänen an als in Bereichen niedriger Krümmung. So stark gekrümmte Substrate lassen sich z.B. durch „*Nano-wrinkles*“ (Faltenwurf) herstellen: das weiche Material PDMS wird durch Plasma oberflächlich gehärtet und schließlich in einer Richtung gedehnt. Dies führt in der anderen Richtung zu einer Kontraktion, welche an der härteren, weniger flexiblen Oberfläche zu Faltenbildung führt. Diese Methode kann zur gezielten lokalen Entmischung von SLBs verwendet werden [36]: Zwei verschiedene fluoreszenzgelabelte Lipide separieren, je nach Krümmung der Oberfläche.

Auch optisch lassen sich SLBs strukturieren: Sogenannte Diacetylene-Lipide polymerisieren, wenn sie durch UV-Licht beleuchtet werden [34]. Dadurch läßt sich das gewünschte Muster direkt in die ansonsten fluide Membran „hineinbelichten“.

Durch lokales Heizen, z.B. durch einen Laserstrahl, der von Nanopartikeln absorbiert wird, können lokale Phasenübergänge in Membranen ausgelöst werden [65].

Eine interessante dynamische Methode zur Membranmanipulation ist Mikrofluidik. Obwohl substratgestützte Membranen sich sehr nahe an der Oberfläche befinden, ist es dennoch möglich, sie durch Scherflüsse zu beeinflussen. Ein über die Membran hinwegfließender Wasserstrom reißt die fluide Membran teilweise mit und prägt ihr das Mikrofluidikprofil auf [38, 66]. Diese Methode läßt sich auch zum Beschichten einer Oberfläche mit einer SLB benutzen, indem Lipide aus einem Reservoir durch den Fluß über das Substrat gespreitet werden und es ist sogar möglich, membrangebundene Proteine lokal anzusammeln und in einem Nichtgleichgewichtszustand zu separieren [67].

Gebundene Makromoleküle wie z.B. DNA lassen sich elektrostatisch auf SLBs anbinden und durch elektrische Felder verschieben [68, 69] und durch ein mikrostrukturiertes Substrat beeinflussen [23, 70].

Als neue Methode der Membranbeeinflussung wurde in dieser Arbeit die SAW-induzierte Membranentmischung entwickelt, die auf piezoelektrischen Substraten basiert [59].

4 Methoden

4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopie ist eine der wichtigsten Techniken bei der Arbeit mit biologischen Proben (s. Abb. 4.1). Sie ermöglicht extrem hohen Kontrast, da interessante Komponenten der Probe zum Selbstleuchten angeregt werden und man so gezielt Strukturen betrachten kann, die eigentlich zu klein und kontrastarm für optische Mikroskopie sind wie z.B. Einzelmoleküle. Fluoreszenz basiert auf dem Effekt, daß bestimmte (fluoreszente) Moleküle Photonen absorbieren, wodurch ein Elektron in einen energetisch höheren Bereich angeregt wird. Dieses wiederum relaxiert im Regelfall strahlungslos auf ein wenig niedrigeres Niveau, von wo es zurück auf den Grundzustand springen kann - unter Aussendung eines im Vergleich zum Anregungslicht rotverschobenen, da niederenergetischeren Photons. Durch optische Filtersysteme - Anregungs- und Emissionsfilter sowie den Strahlteiler - lassen sich Anregungs- und Fluoreszenzlicht eindeutig trennen, so daß man nur das Licht der fluoreszenten Proben beobachtet. Biologische Proben sind zumeist mehr oder weniger transparent, also wenig kontrastreich. Zudem liegen intrazelluläre Strukturen häufig weit unter der optischen Auflösungsgrenze (je nach verwendetem Licht 300 – 600nm). Fluoreszenzmikroskopie bietet die Möglichkeit, einzelne Moleküle zu verfolgen, und selektiv interessante Systeme „anzufärben“. Das funktioniert normalerweise so: Ein Fluoreszenzfarbstoff wird in die Probe eingebracht, der selektiv nur an die zu beobachtenden Teile, z.B. die DNA bindet. In dieser Arbeit wurden die gewünschten Lipide und Proteine bereits gelabelt gekauft, DNA wurde meist mit einem interkalierenden Farbstoff selbst gelabelt. In den Experimenten dieser Arbeit wurde ein invertiertes Zeiss Axiovert 100M Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen) verwendet. Als Beleuchtung dienten eine Quecksilberdampfampe oder verschiedene kollimierte LED-Module (Thorlabs). Je nach Dicke der verwendeten Substrate kamen ein Ölimmersionsobjektiv (100x/1.3), ein 20x/0.75 Objektiv und ein Long Distance (40x/0.3) (alle Zeiss) zum Einsatz. Als Kamera wurde eine gekühlte rauscharme Sensicam QE (PCO, Kelheim) verwendet, zur Steuerung des Mikroskops und für die Bildauswertung die Freeware ImageJ und das Plugin Micromanager benutzt.

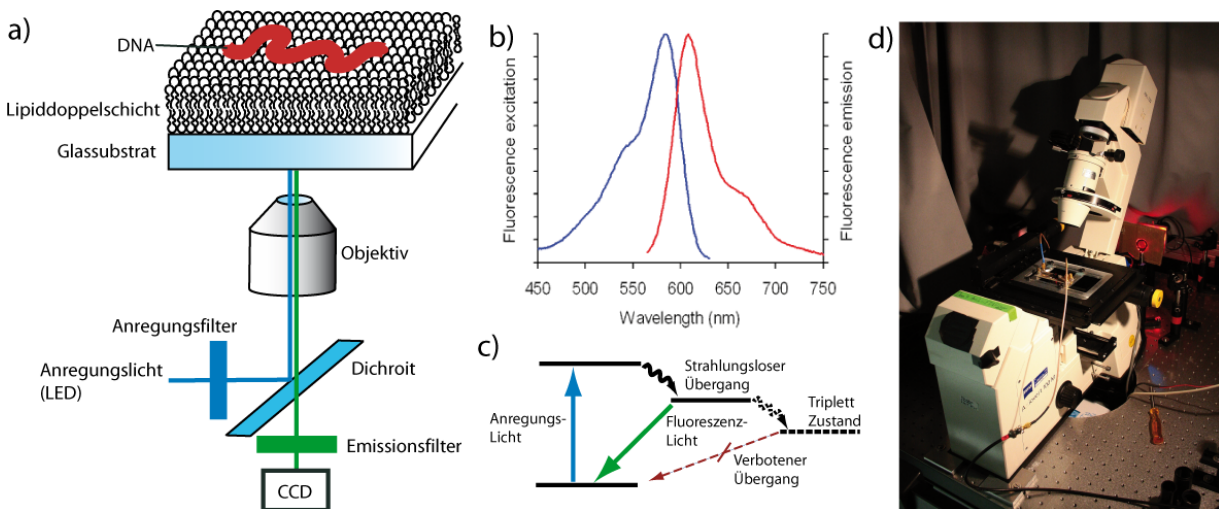


Abbildung 4.1: a) DNA gebunden an eine SLB, betrachtet mit Fluoreszenzmikroskopie. Die Probe wird mit dem Anregungslicht der LED durch das Objektiv beleuchtet, welches das von der Probe ausgesendete Fluoreszenzlicht auf den CCD Sensor abbildet. Durch geeignete Wahl von Anregungsfilter, Dichroit und Emissionsfilter (Zusammen Filtersatz) läßt sich das Anregungslicht sauber vom Fluoreszenzlicht trennen. b) Fluoreszenzspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes Texas Red c) Energieschema der Elektronen in einem Fluoreszenzfarbstoffmolekül (Beispiel) Ein Elektron wird durch das Anregungslicht in ein höheres Energieschema angehoben. Von dort relaxiert es strahlungslos in einen dritten Zustand, und von dort unter Aussendung eines rotverschobenen Fluoreszenzphotons zurück in den Grundzustand. In seltenen Fällen gelangt es in einen Triplettzustand, den es nur über einen verbotenen Übergang wieder verlassen kann. Eine hohe Besetzung von Triplettzuständen ist eine Ursache für Photobleichen. d) Das in dieser Arbeit verwendete invertierte Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiovert 100M).

4.2 Lithografie

Für diese Arbeit wurde zur Strukturierung harter Oberflächen wie z.B. Glas oder Lithiumtantalat optische Lithografie benutzt. Dies ist eine Standardmethode der Halbleitertechnologie, um mikro- bis nanometergroße Strukturen wie etwa Leiterbahnen herzustellen. Nötig ist hierfür ein Reinraum, der für diese Arbeit vom Lehrstuhl Kotthaus (LMU) und vom Lehrstuhl für Experimentalphysik 1 (Prof. Wixforth, Universität Augsburg) zur Verfügung gestellt wurde.

Die Herstellung einer Grabenstruktur wie in P1 beschrieben läuft folgendermaßen ab (s. Abb. 4.2): Zuerst wird unter schneller Drehung des Substrates eine wenige μm dicke Fotolackschicht aufgeschleudert (*spin coating*). Diese wird unter Wärme stabilisiert (*soft bake*), an eine Chrommaske angepreßt und mit UV-Licht beleuchtet. Der Fotolack wird in der gewünschten Struktur belichtet und je nach Fotolack (*positive or negative resist*) an den belichteten Stellen entweder sensibilisiert oder stabilisiert auf den Entwickler, der den Lack an bestimmten Stellen wegwäscht und so ein Bild der letztlich gewünschten Struktur zurückläßt. Der Fotolack wird nun durch weiteres Ausbacken verfestigt (*hard bake*). Die Lücken im Fotolack können nun mit aufgedampftem Metall gefüllt werden, was in dieser Arbeit bei den Fingerstrukturen zur SAW-Anregung so gemacht wurde, oder wie für das erste Projekt verwendet, mit reaktivem Ionenätzen abgetragen werden, so daß Gräben entstehen.

Mit Aceton und Piranhalösung (Schwefelsäure und Wasserstoffperoxyd, 3:1) kann man den verbleibenden Fotolack restlos entfernen.

4.3 Akustische Oberflächenwellen (Surface Acoustic Waves, SAWs)

Akustische Oberflächenwellen, kurz SAWs¹ sind Scherwellen in Festkörpern, die sich nur planar an der Oberfläche ausbreiten, sie reichen etwa eine Wellenlänge in das Material hinein. Normalerweise haben sie eine Longitudinal- und eine Transversalkomponente, ein Oberflächenpunkt vollführt so im Allgemeinen eine elliptische Bewegung. Je nach Richtung der Hauptauslenkung kann man als Spezialfälle Rayleighwellen² in z-Richtung, Scherwellen³ in y-Richtung und Schallwellen⁴ unterscheiden (s. Abb. 4.3). In dieser Arbeit wurden vor allem Scherwellenchips verwendet.

Erstmals beschrieb Lord Rayleigh 1885 Oberflächenwellen mathematisch, noch bevor diese beobachtet werden konnten. Große Bedeutung haben Rayleighwellen in der Erdbebenforschung, da diese Art Oberflächenwelle die zerstörerischste ist. Scherwellen oder Lovewellen wurden 1911 erstmals von Augustus Love mathematisch beschrieben. Sie stellen die

¹surface acoustic waves

²benannt nach Lord Rayleigh, 1842-1919

³auch Love-Wellen, benannt nach Augustus Love, 1863-1940

⁴nur longitudinal in x-Richtung

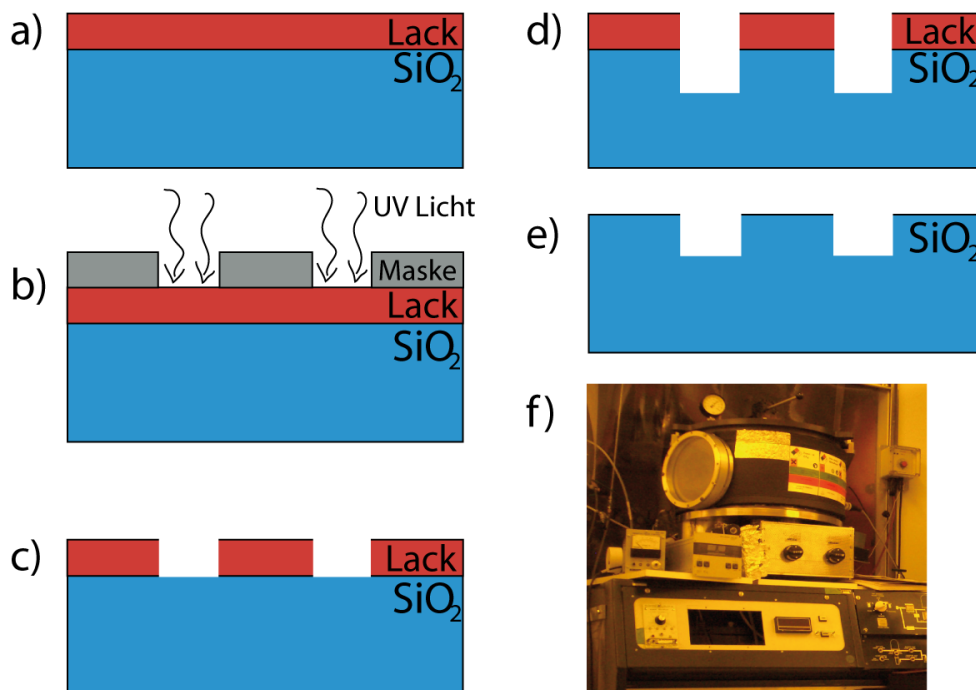


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Ätzprozesses. a) Aufschleudern einer Fotolackschicht und *softbake*, b) Belichten der Fotolackschicht mit der gewünschten Struktur, c) Entwickeln der belichteten Fotolackstruktur und *hardbake*, d) Reaktives Ionenätzen, e) Entfernen des Fotolacks mit Piranhalösung. f) Bild der verwendeten Parallelplatten-RIE Anlage im Reinraum des LS Kotthaus.

schnellsten Oberflächenwellen dar. Diese Wellen eignen sich für Experimente an substratgestützten Membranen besonders, da sie keine z-Komponente besitzen und so aufgrund des fehlenden Schubmoduls von Flüssigkeiten nur sehr schwach in das Wasser einkoppeln und somit kaum gedämpft werden.

Akustische Oberflächenwellen auf piezoelektrischen Substraten lassen sich auf vielfältige Art und Weise erzeugen [71], beispielsweise durch Elektronenstrahlen und intensive Laserbestrahlung. Der technische Durchbruch erfolgte allerdings erst 1965, als White und Voltmer eine sehr effiziente Methode fanden, Oberflächenwellen auf piezoelektrischen Substraten anzuregen [72]: Sie brachten mittels Lithographie ineinandergreifende metallische Fingerstrukturen⁵ auf ein Quarzsubstrat auf (s. Abb. 4.4). Durch Anlegen einer Wechselspannung mit der richtigen Frequenz, die sich mit $f = v/\lambda$ aus der Wellenausbreitungsgeschwindigkeit v und der verwendeten Strukturgröße λ ⁶ ergibt, ließen sich effizient Oberflächenwellen anregen und über den umgekehrten Mechanismus an einer entfernten Stelle mit einer gleichartigen Fingerstruktur nachweisen. Durch gepulste Signale kann man durch Messung der Signallaufzeit die Wellengeschwindigkeit messen, bei Quarz $3200 - 3370\text{m/s}$, je nach verwendeter Kristallorientierung. In dieser Arbeit wurde vor allem mit Scherwellenchips aus Lithiumtantalat (LiTaO_3) gearbeitet, die bei einem Kristallschnitt von $36^\circ - Y$ eine Wellengeschwindigkeit von 4150m/s aufweisen. Diese Geschwindigkeiten sind sehr hoch, verglichen mit den typischen Chipgrößen einiger mm und Fluoreszenz-Belichtungszeiten im Sekundenbereich. Deshalb wurden in dieser Arbeit ausschließlich mit stehenden Wellen experimentiert. Stehende Wellen bilden sich aus, wenn sich zwei gegenläufige Wellen gleicher Wellenlänge, gleicher Amplitude und fester Phasenlage überlagern. Die Phasenlage dieser Wellen zueinander bestimmt die Position der sich ausbildenden Knoten und Bäuche, also Bereiche maximaler Amplitude und Bereiche, die nicht schwingen. Genau umgekehrt verhalten sich die Verzerrungen im Material: in Bäuchen (maximale Auslenkung) ist die Verzerrung minimal, in Knoten (minimale Auslenkung) dagegen maximal. Diese Überlegung spielt eine zentrale Rolle bei der Erklärung, wie eine stehende Oberflächenwelle auf SLBs wirkt.

Die Anregung erfolgte über einen Signalgenerator (SML, Rhode und Schwarz), dessen Ausgangssignal verstärkt (ZHL2 bzw. ZHL-2010, MiniCircuits) und mit einem Leistungsteiler (ZFSC-2-4, MiniCircuits) auf die beiden gegenüberliegenden IDTs aufgeteilt wurde (s. Abb. 4.5). Für die Anordnung mit gekreuzten IDTs (s. Abb. 5.13 und 5.14) wurde die Anordnung doppelt benötigt, da sowohl Anregungseffizienzen als auch Anregungsfrequenzen der 90° Grad senkrecht zueinander angeordneten IDTs unterschiedlich sind. Es zeigte sich, daß sowohl die verwendeten Mikrowellengeneratoren phasengekoppelt stabil über Stunden exakt ihre Frequenz und Phasenlage zueinander halten und außerdem trotz der zwangsläufig unterschiedlichen Kopplungsbedingungen (Stecker, Kabel, Lötstellen...) die Amplituden hinreichend ähnlich über die Laufstrecke sind. Dies hat vor allem aufgrund der Dämpfung der Wellen unter Wasser besondere Beachtung: Rayleighwellen bei-

⁵interdigital transducers, IDTs

⁶Wellenlänge entsprechend dem doppelten Transducerabstand

spielsweise werden innerhalb der ersten drei Wellenlängen unter Wasser auf $1/e$ ihrer Amplitude gedämpft. Da bei den verwendeten Scherwellenchips etwa $3,5\text{mm}/27\mu\text{m} = 130$ Wellenlängen („Doppelstreifen“) beobachtet wurden, liegt die Dämpfung im vernachlässigbaren Bereich, genauso wie auch die mögliche lokale Erwärmung.

Über eine leichte Verstimmung der beiden Generatoren⁷ konnten Schwebungen erzeugt werden, die effektiv zu einem verschiebbaren Streifenmuster führten. Die Bewegungsrichtung und -geschwindigkeit hängen vom Frequenzunterschied der beiden Generatoren ab.

Direkt nachweisen kann man SAWs durch Röntgenbeugung, indem man laufende Wellen stroboskopartig mit Röntgenblitzen beleuchtet [73], durch Ramanspektroskopie und AFM (Kap. 7.1). Meist beschränkt man sich aber darauf, an einem zweiten Transducer gegenüber dem Anreger die Welle wieder auszukoppeln und die Transmission des Chips zu messen.

Akustische Oberflächenwellen kommen in einigen integrierten und miniaturisierten Anwendungen zum Einsatz, z.B. als Frequenzfilter, SAW-Tag, Sensor [74], Flüssigkeitsmischer [75] oder Mikrofluidikpumpe [76]. Zwei gegenüberliegende Transducer stellen in Transmission einen sehr selektiven Frequenzfilter dar, der in praktisch allen Mobiltelefonen zum Einsatz kommt. SAW Tags (Chips in Reflexionsgeometrie) werden ähnlich wie RFID⁸-Tags zur kontaktlosen elektronischen Identifikation verwendet und bieten einige Vorteile gegenüber den üblichen induktiven Bauweisen. Als Sensor werden SAW Chips in Transmission verwendet, ähnlich wie in Quarzkristallmikrowaagen (QCM) nutzt man hier die Tatsache aus, daß sich Amplitude und Phase einer Oberflächenwelle mit dem Massebelag des Chips ändern. SAW getriebene Mikrofluidik schließlich basiert gerade auf der starken Dämpfung von Rayleighwellen durch Wasserbelag: Die Welle koppelt ins Wasser ein, wird gedämpft und überträgt ihren Impuls auf das Wasser. Ein Wassertropfen auf einem Rayleighchip beispielsweise bewegt sich in Wellenausbreitungsrichtung über das Substrat [76]. In geschickter Geometrie ist es auch möglich, Teilchen in Mikrofluidikströmungen durch SAWs zu beeinflussen [77, 78].

Diese Beispiele machen deutlich, daß akustische Oberflächenwellenchips Standardbauteile sind, in Massenproduktion hergestellt werden und die gesamte Peripherie auch stark miniaturisierbar ist. Dies macht einen Einsatz für *Lab-on-a-Chip* Systeme auch in industriellem Maßstab denkbar.

4.4 Präparationsmethoden

Die wichtigsten Präparationsmethoden finden sich als Protokolle im Anhang. SLBs wurden mit der Vesikelfusionsmethode hergestellt, bei der kleine Vesikel durch Beschallen einer Lipidemulsion hergestellt, diese an eine Oberfläche binden, aufplatzen und dort eine durch-

⁷z.B. 0,1 Hz bei einer Arbeitsfrequenz von 153 MHz

⁸Radio Frequency Identification

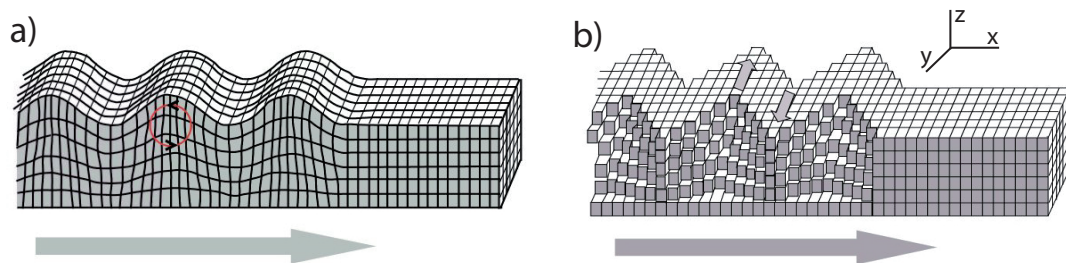


Abbildung 4.3: Vergleich von Rayleighwelle (a) und Love- oder Scherwelle (b). Die Ausbreitungsrichtung ist hier stets mit x bezeichnet. Rayleighwellen besitzen ausschließlich eine z-Komponente, Scherwellen ausschließlich eine y-Komponente in der Auslenkung. In einem realen Material sind immer Überlagerungen zu finden, in unserem Aufbau dämpft jedoch die Wasserschicht Wellen mit z-Komponente effizient. Nach [48]

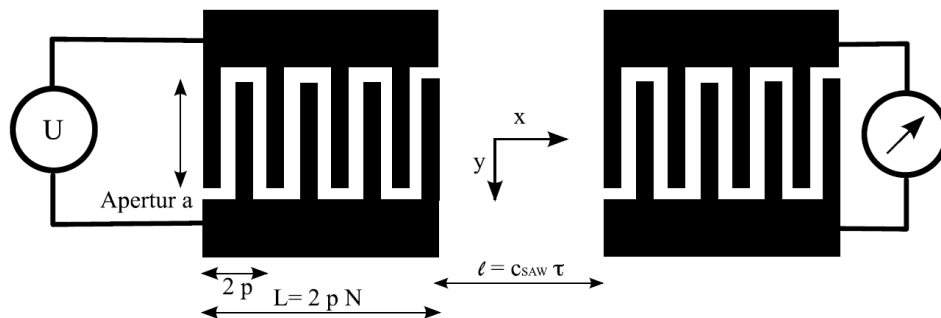


Abbildung 4.4: Prinzipskizze metallischer Fingerstrukturen (IDTs) zur Anregung von akustischen Oberflächenwellen auf piezoelektrischen Substraten. Die Wellenausbreitung erfolgt senkrecht zu den Fingern (x), wobei die Breite der Wellenfront durch die Apertur a festgelegt wird. Die Periodizität $2p$ der Finger bestimmt die möglichen Anregungsfrequenzen, wobei die Grundfrequenz (Mittelfrequenz bzw. Resonanzfrequenz) durch $f_0 = c_{SAW}/\lambda$ mit $\lambda = 2p$ festgelegt wird. Der Abstand l zwischen den IDTs wird bei SAW-Sensoren als Verzögerungsstrecke (*delayline*) bezeichnet, da hier das Signal von Licht- auf Schallgeschwindigkeit „verlangsamt“ wird.

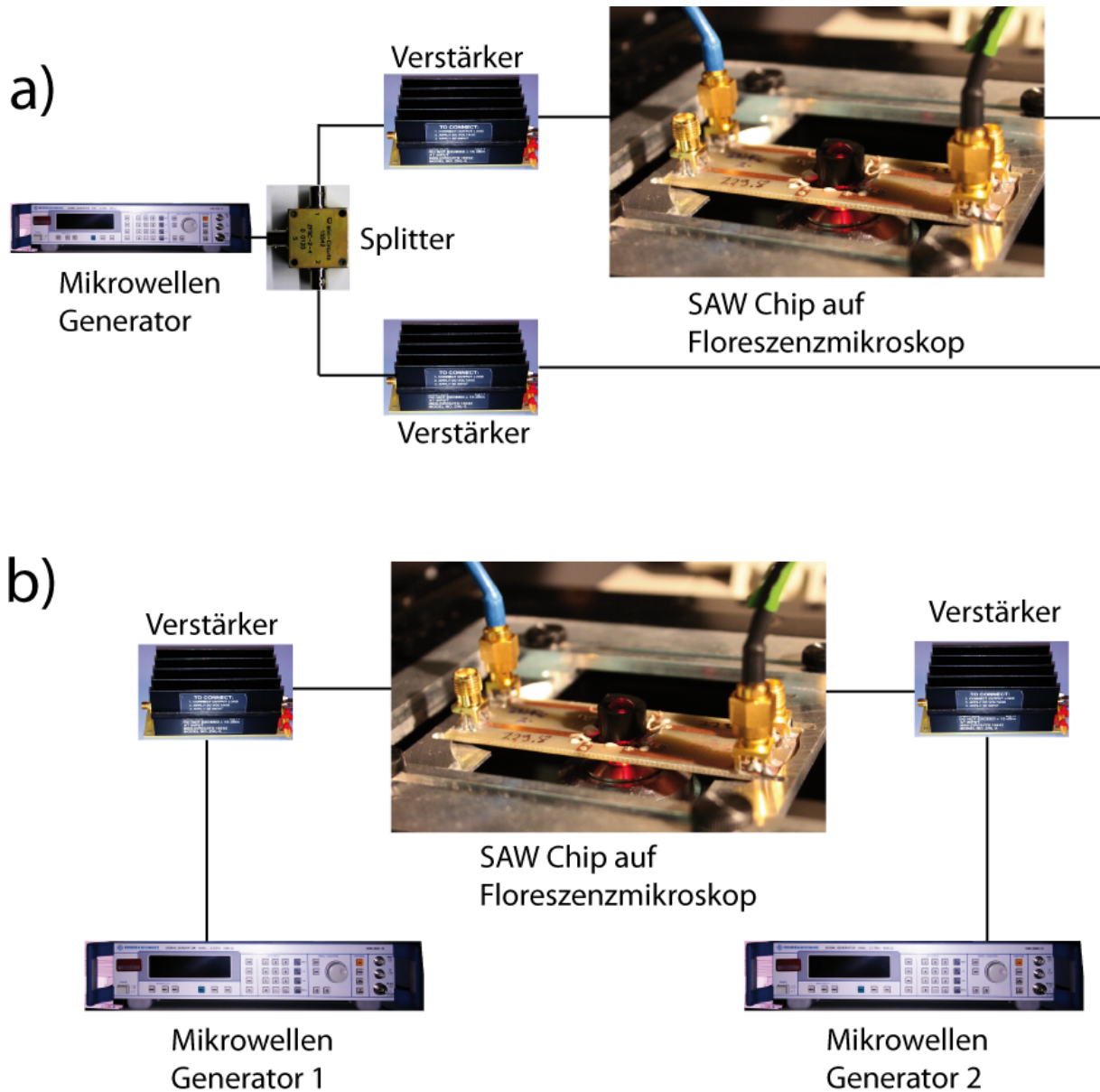


Abbildung 4.5: a) Das Signal eines Mikrowellengenerators wird gesplittet, verstärkt und von zwei Seiten in den SAW-Chip eingekoppelt. Dieser Aufbau sichert stabile Phasenlage, die Position und Ausprägung des Musters ist aber abhängig von den genauen Ankoppelbedingungen wie z.B. der Kabellänge. In b) wurden zwei phasengekoppelte Generatoren verwendet, was über leichte Frequenzverstimmung ermöglicht, Schwebungen zu erzeugen.

gehende Lipiddoppelschicht formen (7.6). Phasenseparierte Riesenvesikel (GUVs) lassen sich am besten durch Elektroformation (7.7) herstellen: in Lösungsmittel gelöste Lipide werden hier auf mit ITO leitend beschichtete Glasplatten aufgebracht, ausgetrocknet und lösen sich in wässriger Lösung durch Anlegen einer geeigneten Wechselspannung als GUVs ab.

Die Elektronenstrahlolithographie zur Herstellung optischer Masken und Optische Lithografie zur Herstellung von IDT Strukturen sind im Anhang 7.8 und 7.9 zu finden.

5 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Veröffentlichungen P1 (Anhang 7.1), P2 (Anhang 7.2), P3 (Anhang 7.3), P4 (Anhang 7.4) und das Manuskript M1 (Anhang 7.5) kurz zusammengefaßt präsentiert.

5.1 Dynamik von substratgestützten Membranen und gebundenen Makromolekülen

Um ein besseres Verständnis von komplexen biologischen Systemen wie z.B. der Zellmembran zu erlangen, beschäftigt man sich experimentell mit vereinfachten Modellsystemen. In dieser Arbeit dienten Riesenvesikel und substratgestützte Membranen und daran gebundene Makromoleküle als solche. Die Riesenvesikel haben den Vorteil, vom Krümmungsgrad und der hier gewählten ternären Lipidmischung mit einem extrem einfachen System sehr nahe an die natürliche Zellmembran heranzukommen, wobei natürlich Proteine und alle aktiven Komponenten wie Zytoskelett oder Glykokalix fehlen. Die substratgestützten Membranen andererseits bieten experimentell einige Vorteile (in Kap. 3.2.2 beschrieben) - in dieser Arbeit wurden speziell die Wechselwirkungen von Lipidmembran und Substraten untersucht.

In diversen Vorarbeiten wurde der Einfluß mikrostrukturierter statischer Oberflächen auf Modellmembranen untersucht. Mikrostrukturierung bedeutet in diesem Fall im Reinraum lithographisch hergestellte Strukturen. Von Groves et al. wurden effiziente Diffusionsbarrieren zwischen verschiedenen Membranbereichen hergestellt („*corralls*“) [35], Sanii et al. zeigten den Einfluß von gekrümmten Strukturen auf Membranen [36] und Hochrein et al. die Streckung von langen DNA Molekülen in den Kanten membranbeschichteter Mikrogräben [23]. Des weiteren verwendeten Höök et al. hydrodynamischen Fluß, um SLBs zu entmischen [38] und angebundene Makromoleküle zu beeinflussen [67].

An diese Arbeiten knüpft der erste Teil dieser Dissertation an. So wurde der Einfluß von Mikrogräben auf Membranen von Riesenvesikeln und die Dynamik von DNA gebunden an substratgestützte Membranen untersucht.

5.1.1 Substratinduzierte Membrantmischung in Vesikeln (P1, Anhang 7.1)

In heterogenen Membranen, die wie echte Zellmembranen aus verschiedenen Lipiden bestehen, hängt die laterale Lipidzusammensetzung von der lokalen Krümmung ab. Genauso ist natürlich die Biegungsenergie von der Zusammensetzung abhängig. Diese fundamentalen Zusammenhänge wurden in dieser Arbeit am Beispiel von Riesenvesikeln (GUVs) untersucht, die auf mikrostrukturierte Oberflächen gesetzt wurden. Als Lipidzusammensetzung dieser Vesikel wurde eine dreikomponentige Mischung aus den Hauptbestandteilen der Zellmembran DOPC, Sphingomyelin und Cholesterol nahe der natürlichen Zusammensetzung gewählt, deren Temperaturverhalten bereits gut bekannt ist [13] (s. Abb. 5.1). Diese Mischung zerfällt bei Raumtemperatur in zwei koexistierende Phasen, deren Verhältnis zueinander von der Temperatur abhängt [79]. Diese beiden Phasen werden „geordnete flüssige Phase“ (L_O , *liquid ordered*) und „ungeordnete flüssige Phase“ (L_D , *liquid disordered*) genannt. Sie unterscheiden sich im Ordnungsgrad der Lipidketten, der chemischen Zusammensetzung und der physikalischen Eigenschaften wie z.B. der Steifigkeit. So sind die Ketten in der L_O Phase geordneter und fluktuieren weniger, so daß diese zwar dichter gepackt, aber auch dicker ist. In den geordneten Bereichen sammelt sich bevorzugt das Sphingomyelin, dessen Ketten durch eingelagertes Cholesterol stabilisiert sind. In der ungeordneten Phase L_D befindet sich bevorzugt DOPC, dessen Ketten frei fluktuieren, so daß sie insgesamt fluider ist und eine geringere Linienspannung hat. Die Minimierung der hohen Linienspannung der L_O Phasen führt dazu, daß sie rund erscheinen und, wie im Konfokalmikroskop ersichtlich aus dem Vesikel hervorstehen [15], somit (trotz ihrer höheren Steifigkeit!) stärker gekrümmt sind als L_D Phasen. Im Experiment erscheint die L_D Phase meist hell, da sich das häufig verwendete fluoreszenzgelabelte Lipid Texas Red-DHPE in dieser Phase ansammelt.

In diesem Teil der Arbeit wurde gezeigt, daß diese L_O Phasen durch den Kontakt mit mikrostrukturierten Gräben in Quarzglas sortiert und deformiert werden. Ein ähnliches Phänomen zeigt sich bei Vesikeln, die auf flache Borosilikatsubstrate mit abwechselnd „nanorauher“ und „nanoglatte“ Oberfläche aufgebracht wurden. Die L_O Phase sammelt sich in Bereichen grabenüberspannender freitragender Membran bzw. glatter Oberfläche. Verformung von L_O Phasen tritt auf, wenn die Domänen über die Strukturbreite hinauswachsen.

5.1.2 Dynamik von DNA Elektrophorese auf SLBs (P2, Anhang 7.2)

DNA kodiert die Erbinformation und nimmt deshalb in der Forschung eine herausragende Stellung ein. Zugleich spielen DNA-Analysemethoden wie z.B. die Elektrophorese eine extrem wichtige Rolle im Laboralltag. Verbesserungen und neue Methoden in diesem Bereich haben so natürlich auch ein enormes kommerzielles Potential. DNA ist auch an sich ein

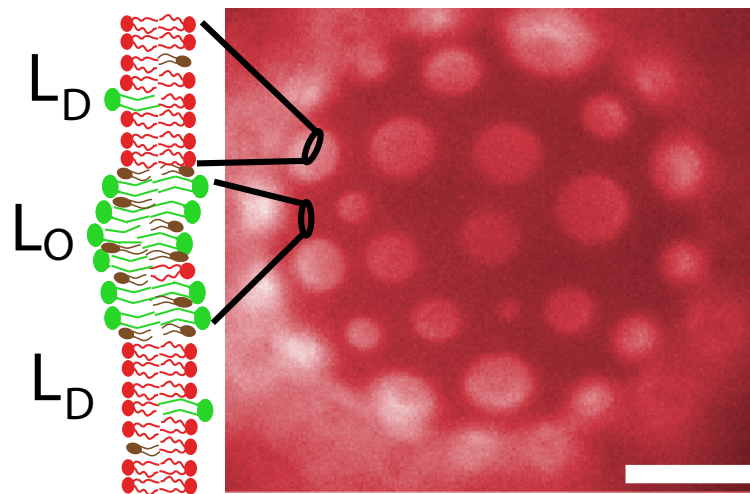


Abbildung 5.1: Phasentrennung in einem ternären GUV. Die unterschiedliche chemische Zusammensetzung und der unterschiedliche Ordnungsgrad der L_O und L_D Phasen ist links illustriert. Die höhere Linienspannung der runden L_O Phasen (die diese auch in runde Form zwingt) sorgt gleichzeitig dafür, daß die eigentlich steiferen L_O Phasen sich aus dem GUV herauswölben und somit stärker gekrümmt sind. Maßstab $6\mu\text{m}$.

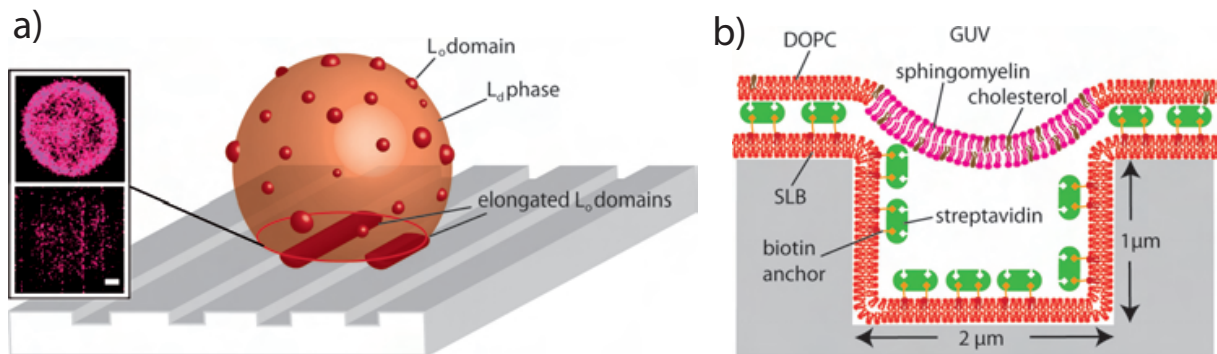


Abbildung 5.2: a) Schema eines dreikomponentigen Riesenvesikels auf einer mikrostrukturierten Glasoberfläche mit $1\mu\text{m}$ tiefen Gräben. Das Vesikel ist unten im Kontaktbereich mit dem Substrat abgeflacht, wobei die Vesikelmembran die Mikrogräben überspannt. Liquid Ordered Domains L_O (nicht ganz korrekt auch „Gelphasen“ genannt) bilden Ausbuchtungen am Vesikel und werden deshalb aus den Plateauregionen zwischen den Gräben verdrängt. Die Grabenkanten bilden eine Barriere, die die Domänen im Bereich der freihängenden Membran in eine längliche Form zwingen. Im konfokalen Mikroskop (*Laser scanning Microscope*, LSM) ist das Überspannen der Gräben direkt sichtbar (inset). (Maßstab $4\mu\text{m}$). b) Um das Aufplatzen der Riesenvesikel im Kontakt mit Glassubstraten zu verhindern, wurden diese mit einer SLB passiviert und die Bindungsstärke mit einer auf die SLB aufgetragenen Streptavidin-Zwischenschicht auf ein Optimum eingestellt.

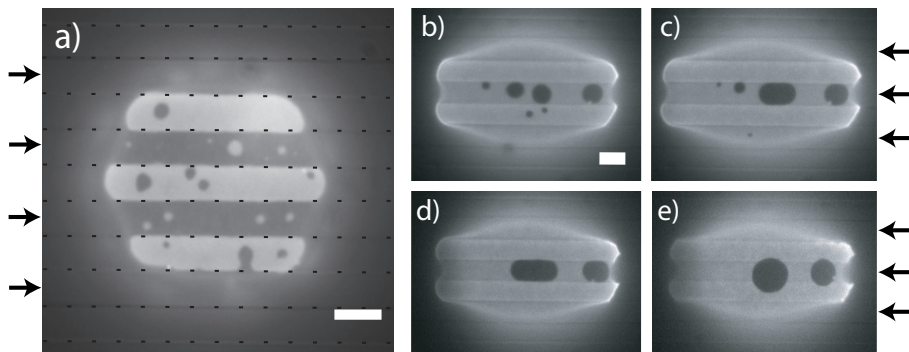


Abbildung 5.3: Mikroskopbilder von Vesikeln auf nanorauen und nanoglaten Oberflächen. a) Geordnete und ungeordnete Flüssigkristalline Phasen werden durch die Energiebarriere, die die Grabenkante darstellt, nahezu vollständig voneinander getrennt. Die L_O Phase sammelt sich über glatten, die L_D Phase über rauhen Bereichen des Substrates. b-e) Zeitserie mobiler, aber in einem flachen Graben mit geringer Rauigkeit angesammelter L_O Domänen. Im Laufe der beobachteten Dauer wuchsen die Domänen an und fusionierten, bis ihr Durchmesser die Grabenbreite erreichte und in eine längliche Form zwang. Mit weiterem Wachstum führte die wachsende Linienspannung schließlich zu lokalem Abheben der Vesikelmembran von der Oberfläche, und die Domäne nahm schließlich wieder kreisrunde Gestalt an. In weiteren Experimenten konnte beobachtet werden, daß solche Domänen immer noch bevorzugt in Grabenbereichen anzutreffen sind. Die Pfeile deuten die Position der flachen Gräben an, Maßstab $4\mu m$.

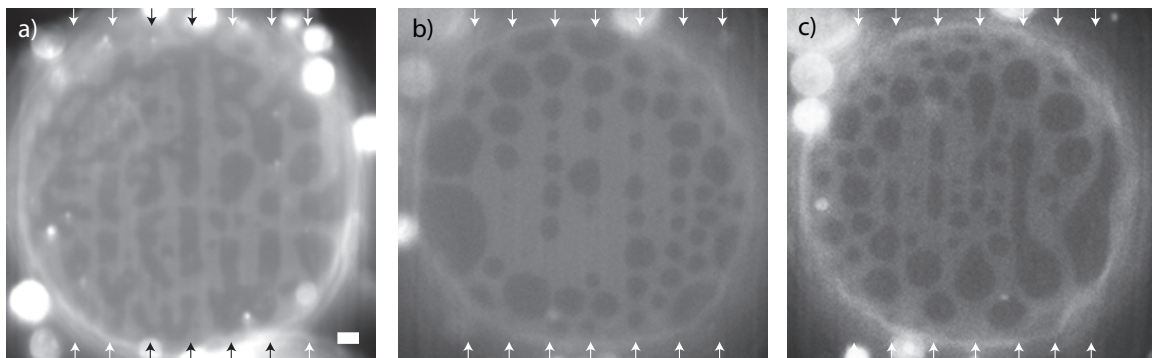


Abbildung 5.4: Fluoreszenzbilder von lokal angesammelten und länglichen L_O Domänen (dunkel) in einem Riesenvesikel auf einem Substrat mit $1\mu m$ tiefen Gräben. a) Wenn die Oberfläche mit BSA (*Bovine Serum Albumine*) überzogen war, sammelten sich L_O -Domänen in den freitragenden Bereichen der Vesikelmembran an und nahmen längliche Form an. b) Mit einer SLB als Deckschicht anstelle von BSA um allzu engen Kontakt des Vesikels mit der Oberfläche zu vermeiden, konnte auch Domänenverformungen beobachtet werden. Diese jedoch wurden leicht durch Beleuchtung gestört, nahmen kreisförmige Gestalt an und wurden von der Unterseite der Vesikel weggepresst wie in c). Pfeile geben die Position der Gräben an, Maßstab ist $4\mu m$.

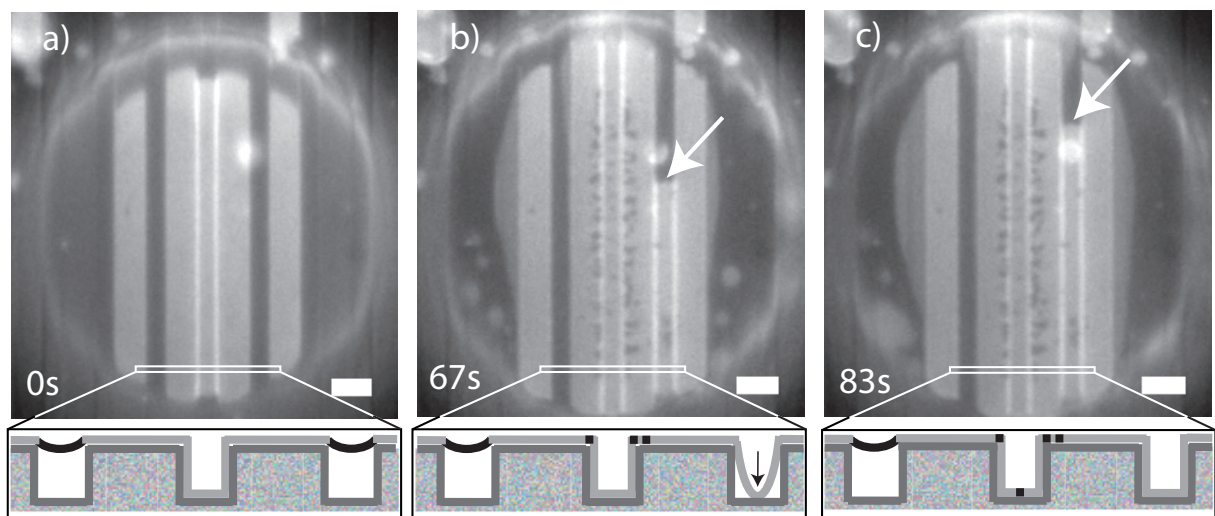


Abbildung 5.5: Bildsequenz eines phasenseparierten Riesenvesikels, das an eine streptavidinbedeckte SLB gebunden ist. L_O Domänen sammelten sich in freitragenden Membranbereichen und füllten bei Wachstum schließlich den gesamten Graben aus. Die Vesikelmembran wurde heruntergezogen, so daß sie der Grabenkontur folgte, sobald die Bindungsstärke an das Streptavidin einen bestimmten Wert überschritt. Die L_O Domäne wurde dann aus dem Kontaktbereich entlang des Grabens verdrängt (Pfeil in b und c). Dauerhafte Beleuchtung unter dem Mikroskop führte zur Bildung kleiner immobiler L_O Domänen im gebundenen Bereich des Vesikels (kleine Punkte entlang des mittleren Grabens, b und c). Der Maßstab ist $4\mu m$.

faszinierendes Material, aus dem durch Selbstassemblierung faszinierende Strukturen hergestellt werden können [80], die in Kombination mit modernen Strukturierungsmethoden eine Vielzahl von Anwendungen haben.

In diesem Teil der Arbeit geht es um folgende zwei Aspekte: Einerseits stellen lange DNA-Stränge gebunden an SLBs eines der wenigen quasi-zweidimensionalen Polymermodelle dar [24], andererseits verspricht man sich von Elektrophorese einzelner Moleküle an Oberflächen ein besseres (oder zumindest anderes) Auftrennungsverhalten als in Gelen, so daß sich möglicherweise bei Fortentwicklung der Technik eine neue Methode zur Längenanalyse von DNA Proben ergeben wird [81].

In diesem Projekt wurde die Dynamik elektrostatisch an SLBs gebundener DNA mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Membranen bestanden hier zu 5-25% aus dem kationischen Lipid DOTAP, an das die negativ geladenen DNA-Stränge elektrostatisch binden. In Lösung globuläre DNA-Stränge gehen so beim Kontakt mit der positiv geladenen Membran in einen „entfalteten“ zweidimensionalen Zustand (random coil) über und zeigen das typische diffusive Verhalten eines Polymers in zwei Dimensionen, die sogenannte Rouse-Dynamik [82]. Das bedeutet, DNA verhält sich wie zur Kette verbundene Kugeln, die Reibung als auch die Ladung skaliert linear mit der Länge N .

Wenn an die Probe ein elektrisches Feld angelegt wird, beginnen die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung des Pluspoles zu wandern (Elektrophorese). Bei langsamen Geschwindigkeiten (niedrigen Feldern) beobachtet man Selbstdiffusion der Moleküle, überlagert von einer Schwerpunktsbewegung, deren Geschwindigkeit vom elektrischen Feld abhängt. Überraschenderweise ändert sich die Dynamik bei höheren Feldern und damit höheren Geschwindigkeiten (etwa $0,3\text{mm/s}$) drastisch: Die DNA Moleküle strecken sich aus, nehmen verzweigte Konfigurationen ein und bewegen sich „blitzförmig“ (s. Abb. 5.6). Der Grund für dieses Verhalten ist folgender: Kationische Lipide sammeln sich unter der anionischen DNA an und begrenzen so als Ensemble die Diffusion der DNA auf ihren „Gegenladungsabdruck“ (d.h. die mit positiv geladenen Lipiden angereicherte Stelle) auf Zeitskalen, die kürzer sind als die Relaxationszeit dieses Abdruckes, der sich auch direkt im Fluoreszenzmikroskop beobachten läßt (s. Abb. 5.7). In anderen Worten, die elektrophoretische Geschwindigkeit (in Bewegungsrichtung) übersteigt die diffusive (quer zur Bewegungsrichtung). Die Vielzahl der beteiligten Lipidmoleküle verursacht eine gewisse „diffusive Trägheit“ und die Bewegung des DNA Moleküls ist nun auf ihren eigenen Abdruck beschränkt.

Interessanterweise beobachtete man nun im Gegensatz zu langsamen Geschwindigkeiten, bei denen Rouse-Dynamik vorherrscht und es somit keine Längenabhängigkeit der Geschwindigkeit gibt, bei höheren Geschwindigkeiten eine $1/N$ -Abhängigkeit. Dies ist analog zum theoretisch sehr gut erforschten Fall der Gelelektrophorese, bei der die wandernden DNA Moleküle durch Poren im Gel wandern und dadurch in ihrer Bewegung längenabhängig gebremst werden [83].

Die Rolle der Poren im Gel spielt hier direkt der Gegenladungsabdruck unter der DNA. Entwickelt wurde hier ein Biased Reptation Model in zwei Dimensionen, das die Bewegung

der DNA auf kationischen Membranen qualitativ gut beschreibt.

5.2 Aktive Manipulation von substratgestützten Membranen und gebundenen Makromolekülen

In diesem Abschnitt wird das Hauptprojekt der vorgelegten Dissertation dargestellt, das in enger Zusammenarbeit mit Jürgen Neumann (Universität Augsburg, Nachwuchsgruppe von Matthias Schneider) durchgeführt wurde. Zuerst wird die SAW-induzierte dynamische Entmischung zweikomponentiger SLBs beschrieben und der zugrundeliegende Mechanismus thermodynamisch erklärt (Kap. 5.2.1). Danach wurde der vorgestellte Mechanismus verwendet, um membrangebundene Proteine lokal zu akkumulieren, zu verschieben und zu separieren (Kap. 5.2.2). Schließlich konnten durch zwei überlagerte gekreuzte stehende Wellen Schachbrettmuster membrangebundener DNA erzeugt werden (Kap. 5.2.3).

5.2.1 Dynamische Entmischung von SLBs durch Surface Acoustic Waves (P3, Anhang 7.3)

Substratgestützte Membranen lassen sich durch den Einfluß des stark mit ihnen wechselwirkenden Substrates beeinflussen. Dabei nutzt man aus, daß sich die Lipiddoppelschicht äußerst nahe an der benetzten Oberfläche befindet, lediglich durch eine wenige Atomlagen (einige Ångström) dicke Wasserschicht abgehoben - gerade genug um die Fluidität zu erhalten.

Substratinduzierte Membranentmischung wurde bisher durch Mikrostrukturierung der Oberfläche, elektrische Felder und hydrodynamischen Fluß erreicht. In diesem Kapitel wird eine neue Methode vorgestellt, SLBs durch akustische Oberflächenwellen zu entmischen. Erstmals handelt es sich hierbei um eine dynamische Methode, die erlaubt Membranen „auf Knopfdruck“ zu entmischen, nach Belieben wieder diffusiv ins Gleichgewicht relaxieren zu lassen und streifenförmige Bereiche bestimmter Membranzusammensetzung in einer Richtung frei zu verschieben.

Auf einem piezoelektrischen Chip erzeugt man mithilfe ineinandergreifender Gold-Fingerstrukturen (*interdigital transducers*, IDTs) durch Anlegen einer Wechselspannung mit geeigneter Frequenz zwei gegenläufige akustische Oberflächenwellen. Diese überlagern sich, und bei gleicher Frequenz und Amplitude sowie stabiler Phasenbeziehung der beiden Wellen bildet sich eine stehende Welle aus. Dies bedeutet im Falle der hier verwendeten Scherwellen (s. Kap. 4.3), aufgrund der engen Kopplung von Substrat und gespreiteter Membran liegen abwechselnd Bereiche minimaler und maximaler Amplitude (Knoten und Bäuche) zeitlich stabil nebeneinander, d.h. die Membran wird in einem streifenförmigen Bereich periodisch geschert.

Wenn eine solche Oberflächenwelle auf eine substratgestützte Membran einwirkt, beobachtet man lokale Entmischung der Membran (s. Abb. 5.8): Fluoreszenzgelabelte Lipide (hier:

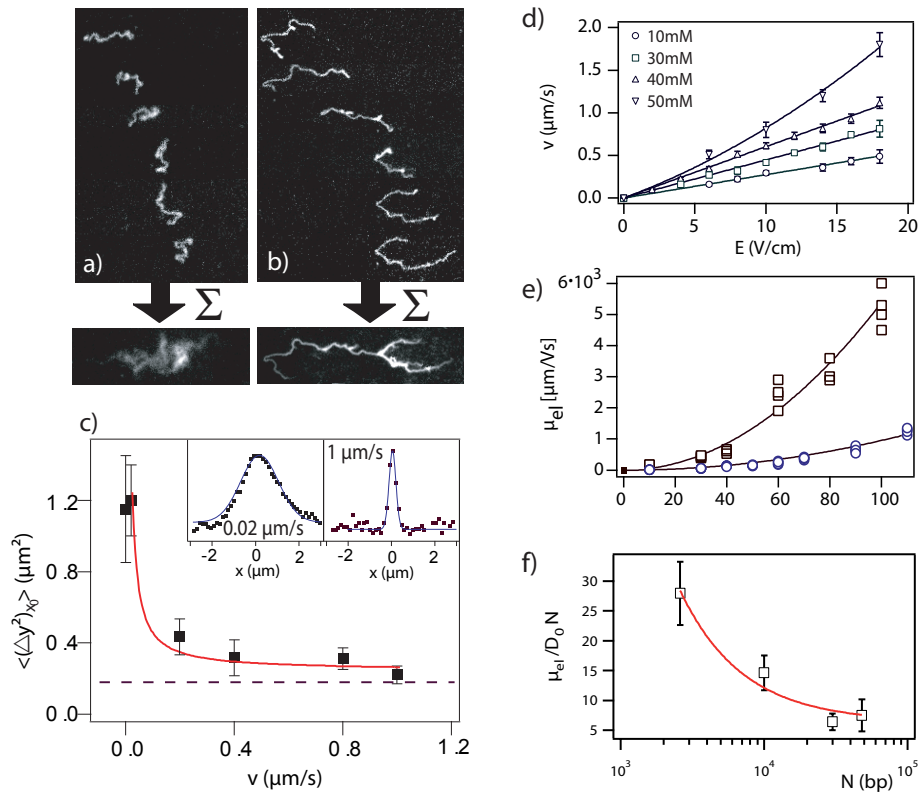


Abbildung 5.6: a), b) Überlagerung einer Zeitserie von λ -DNA bei zwei verschiedenen Bewegungsgeschwindigkeiten $v_a = 0,02 \mu\text{m/s}$, $E_a = 0,2 \text{V/cm}$, $v_b = 1 \mu\text{m/s}$, $E_b = 10 \text{V/cm}$, beide 50mMol NaCl). Das letzte Bild stellt die Überlagerung zu allen Zeitpunkten dar. Bei niedriger Geschwindigkeit sind Selbstdiffusion und Schwerpunktsbewegung überlagert, während bei hohen elektrophoretischen Geschwindigkeiten das Molekül bestimmten „blitzförmigen“ Pfaden folgt (b). In c) ist das mittlere Abstandsquadrat gegen die Geschwindigkeit aufgetragen. d) Elektrophoretische Geschwindigkeit gegen elektrische Feldstärke für einzelne λ -DNA Moleküle bei vier verschiedenen Ionenkonzentrationen (10, 30, 40, 50mM NaCl). e) Elektrophoretische Mobilität gegen Ionenkonzentration für zwei unabhängige Proben, die nach demselben Protokoll hergestellt wurden. f) Normalisierte elektrophoretische Mobilität aufgetragen als Funktion der Molekularen Größe N (Anzahl der Basenpaare) von λ -DNA. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Durchschnitt über 34 Moleküle. Rot ist $1/N$ gefittet.

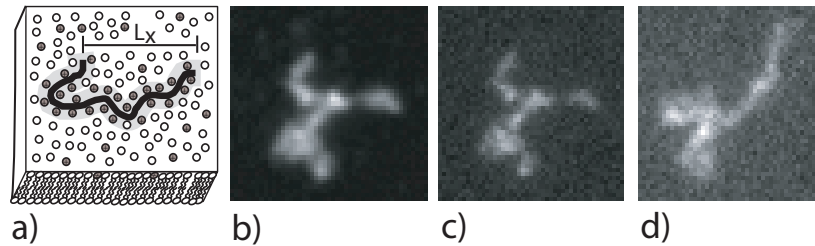


Abbildung 5.7: Schema der DNA gebunden an eine zweikomponentige Lipidmembran. Die kationischen Lipide DOTAP sammeln sich unter der DNA an und begrenzen vertikale Diffusion der DNA auf Zeitskalen, die unter der Lipiddiffusion liegen. Wenn die DNA entlang ihrer eigenen Kontur rutscht, ist keine elektrostatische Barriere zu überwinden. Unter dem Mikroskop läßt sich dieser Effekt direkt beobachten: b) fluoreszenzgelabeltes kationisches Lipid (NBD-DOTAP) Kontur unter c) DAPI gelabelter DNA. Als Kontrolle in d) ungelabelte DNA auf einer Membran, die gelabelte kationische Lipide enthält.

Texas Red DHPE) sammeln sich gemäß der Periodizität der stehenden Welle streifenförmig an, der Streifenabstand entspricht genau der halben Wellenlänge bzw. dem Transducerabstand. Man beobachtet, daß dieses Muster völlig reversibel ist, also beim Ausschalten der stehenden Welle nach einigen Sekunden verschwindet.

Wir erklären den Mechanismus dieser dynamischen und reversiblen Membranentmischung folgendermaßen: durch die wiederholte Streckung und Stauchung wird Energie in die Membran eingebracht. Dies geschieht allerdings nicht gleichmäßig, sondern eben mit unterschiedlicher Effizienz in den Bereichen der Knoten und Bäuche der stehenden Welle. Physikalisch betrachtet befindet sich die Membran in einem periodischen Potential. Für ein zweikomponentiges thermodynamisches System (gelabelte und ungelabelte Lipide) ist es typisch, in Anwesenheit eines genügend starken Potentials auf dieses in Form einer Boltzmannverteilung zu reagieren und sich entsprechend umzuverteilen. Man denke z.B. an die barometrische Höhenformel, die die Dichteverteilung der Atmosphäre unter Annahme von Gasmolekülen in einem homogenen Gravitationsfeld mit einer Exponentialfunktion beschreibt.

In unserem Fall handelt es sich bei dem angelegten Potential um eine periodische Funktion. Aus Symmetriegründen und aufgrund des angelegten elektrischen Sinussignals der Mikrowellengeneratoren gehen wir von einer näherungsweise sinusförmigen Oberflächenwelle aus. Da diese jedoch bei einer Frequenz von 150 MHz viel zu schnell ist, um direkt Einfluß auf Lipide unter Wasser zu nehmen (Lipide diffundieren in einer Schwingungsperiode nur einzelne Ångstrom weit) und die Belichtungszeiten der CCD-Kamera am Fluoreszenzmikroskop im Bereich von Sekunden Millionen Schwingungszyklen umfassen, erwarten wir, daß die substratgestützte Membran auf die Intensität der stehenden Welle reagiert. Bei angenommen linearer Kopplung der Welle an die Membran erwartet man daher einen

Potentialverlauf

$$\Delta G(x) \propto \sin^2 kx.$$

Dies in die Boltzmannverteilung eingesetzt ergibt eine Konzentration von

$$c_f(x) = c_0 \exp(-\Delta G(x)/k_B T),$$

was experimentell gut bestätigt werden kann. Hierfür betrachtet man einen Intensitätsschnitt durch das erzeugte Muster (Abb. 5.9) und fittet

$$I_F(x) = I_B + I_0 \exp\left(-\frac{\alpha \sin^2 kx}{k_B T}\right).$$

Man kann sich vorstellen, daß durch die wiederholte Verzerrung der Membran im Bereich der Knoten der stehenden Welle Energie in die Membran eingekoppelt wird, etwa durch Vibration der Ketten. Diese beanspruchen dadurch im Mittel mehr Platz, und die lokale Dichte der Membran sinkt. Man kann sich auch ähnlich wie bei nicht-newtonschen Flüssigkeiten vorstellen, daß durch die Vibration eine lokale Ordnung der Ketten aufgebrochen wird, was wiederum zu einer lokalen Dichtereduktion und damit erhöhter Fluidität führt. Als letzte Analogie mag das absolut komplexe Verhalten von Granulaten dienen: Beim Rütteln von Steinen verschiedener Korngröße trennen sich diese im Gravitationsfeld auf, meist kommen die großen Körner oben zu liegen (Paranußeffect), aber nicht immer (z.B. bei Treibsand). Da alle Körper im Gravitationsfeld dieselbe Beschleunigung erfahren, ist dies überraschend und bisher keinesfalls befriedigend erklärt, da es auf die genaue Form und Oberflächenbeschaffenheit der Körner ankommt [84].

Letztlich ist es also eine Dichtemodulation der Membran proportional zur Intensität der stehenden Welle, die die Membranmischung verursacht: Zwei unterschiedliche Lipide reagieren verschieden auf Dichteschwankungen innerhalb der Membran, sie sortieren sich beispielsweise nach der Größe, wobei sich z.B. das größere Molekül in der dünneren und das kleinere in der dichteren Phase ansammelt. Da die genauen Mechanismen aber bisher ungeklärt sind (man denke hierbei auch an das Beispiel mit den ungleich einfacher zu beobachtenden Steinen), können außer der Größe auch die Geometrie, die elektrischen Ladungen, die Freiheitsgrade der Ketten oder andere Parameter entscheidende Rollen spielen. Ob sich ein bestimmtes gelabeltes Lipid innerhalb bestimmter Hauptbestandteil-Lipide (bulk) eher in der dichteren oder dünneren Phase ansammelt, muß (wie bei Granulaten) für den jeweiligen Fall experimentell bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde übereinstimmend mit der Literatur z.B. [85, 86] beobachtet, daß sich Texas Red DHPE in der dünneren, die meisten anderen untersuchten gelabelten Lipide (Biotin-DHPE, Fluoreszein-DHPE, Oregon Green DHPE und Bodipy-HPA [87]) in der dichteren Phase ansammeln.

Die hier durchgeführten Experimente helfen, sowohl die Dynamik substratgestützter Membranen und damit auch echter Biomembranen besser verstehen zu lernen, als auch auf dem Weg zum Westentaschenlabor (*Lab-on-a-Chip*) einen Schritt weiterzukommen. Beispiels-

weise ist es denkbar, dynamische biomimetische Oberflächen zu erzeugen, um etwa das Bindungsverhalten von Zellen an bestimmte Rezeptoren innerhalb der Membran zu untersuchen.

5.2.2 Transport, Separation und Ansammlung von Proteinen auf SLBs (P4, Anhang 7.4)

Transport, Separation und lokale Ansammlung von Proteinen in ihrer nativen Umgebung sind zentrale Ziele der Biotechnologie. Zur Separation und Aufreinigung von Proteinen stehen im Labor nur wenige Methoden, z.B. HPLC¹ zur Verfügung. Die Manipulation von Membranproteinen innerhalb der Membran ist bisher unmöglich, wobei die Struktur und Funktion von Proteinen stark von ihrer Umgebung abhängt.

In diesem Teil der Dissertation wird nun aufbauend auf den Erkenntnissen des letzten Kapitels eine neuartige Methode zum Transport und zur dynamischen Separation von membrangebundenen Proteinen vorgestellt.

Eine substratgestützte Membran bestehend aus einer Mischung von zwei verschiedenen Lipiden entmischt sich lokal, sobald man auf dem darunterliegenden Substrat eine akustische Oberflächenwelle erzeugt. In diesem Teil der Arbeit wurden Lipide verwendet, die ein Biotinmolekül an der Kopfgruppe tragen. Dieses Biotin bindet spezifisch sehr stark an bestimmte Proteine, z.B. an Streptavidin. Mit diesem Biotinanker wurde fluoreszenzmarkiertes Streptavidin (und die ähnlichen Derivate Avidin und Neutraavidin) an lediglich eine Spezies in der Membran gebunden.

Die beim Einschalten der akustischen Oberflächenwelle induzierte lokale Membrantmischung führt nun zu lokaler Anreicherung der Streptavidinmoleküle in den Bäuchen der stehenden Welle - wo sie von den Biotin-DHPE Lipiden hingezogen werden (s. Abb. 5.10). Der Mechanismus der lokalen Anreicherung ist prinzipiell derselbe wie in Kap. 5.2.1 beschrieben: Die SAW moduliert über ihre Wechselwirkung mit der Membran deren Dichte, woraufhin sich die Membran entmischt. Nur war diesmal eine Sorte der Lipide nicht direkt fluoreszenzmarkiert, sondern trug Biotin und fluoreszenzmarkiertes Streptavidin am Kopf. Genauso wie innerhalb der Membran war die lokale Proteinanreicherung bei geringen Belegungsdichten voll reversibel und über Schwebungen - erzeugt durch leichte Frequenzverschiebung der beiden überlagerten SAWs - in einer Richtung beliebig verschiebbar über die makroskopische Distanz von 3,5 mm Transducerabstand. Zwischen Knoten und Bauch der stehenden Welle wurde eine zehnfache lokale Proteinanreicherung beobachtet.

Als die zwei ähnlichen mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proteine Avidin und Streptavidin etwa zu gleichen Teilen an die DOPC/Biotin-DHPE Membran gebunden und die SAW eingeschaltet wurde, beobachtet man eine Auftrennung der beiden Proteine. Dies ist erstaunlich, da sich die beiden in Struktur, Größe und natürlicher Funktion stark ähneln und an dasselbe biotinmarkierte Lipid DHPE gebunden sind.

¹High performance liquid chromatography

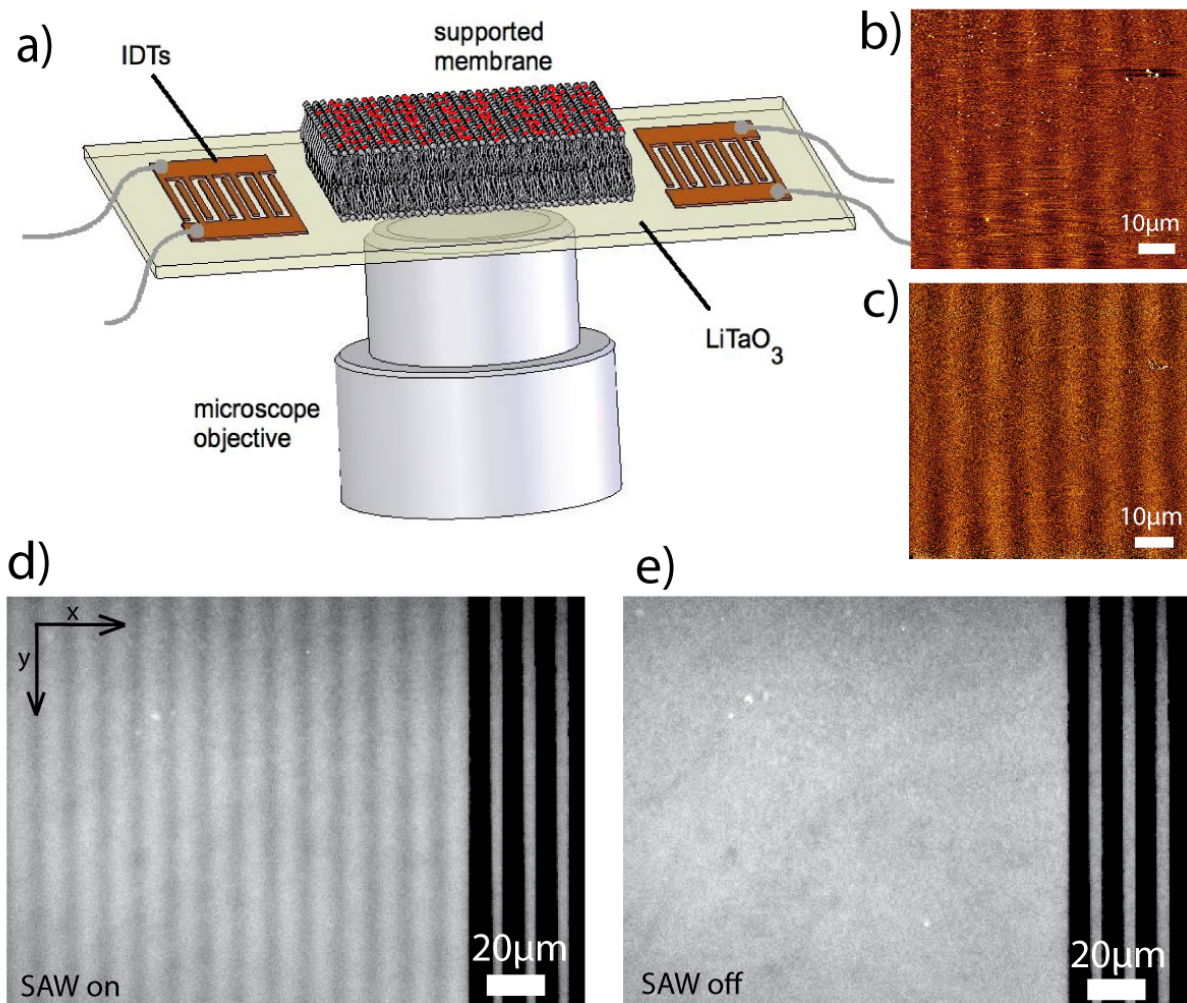


Abbildung 5.8: a) Schema des experimentellen Aufbaus mit piezoelektrischem Chip und invertiertem Mikroskop. Die Fingerstrukturen (IDTs) regen eine stehende akustische Oberflächenwelle an, die zu lateraler Entmischung der substratgestützten Membran führt. b) Scherwellen abgebildet mittels AFM unter Wasser im Kontaktmodus. Die Musterperiodizität entspricht der halben Wellenlänge der SAW ($13,3\mu\text{m}$). c) AFM-Bild der Scherwelle an Luft d) Typisches Mikroskopbild einer fluoreszenzgelabelten entmischten Membran wenige Sekunden nachdem die SAW angeschaltet wurde. Das Membranmuster entspricht der Periodizität der IDTs (schwarze Streifen rechts im Bild). e) Wenn die SAW ausgeschaltet wird, relaxiert der Farbstoff diffusiv innerhalb von Sekunden in seine Gleichgewichtsverteilung.

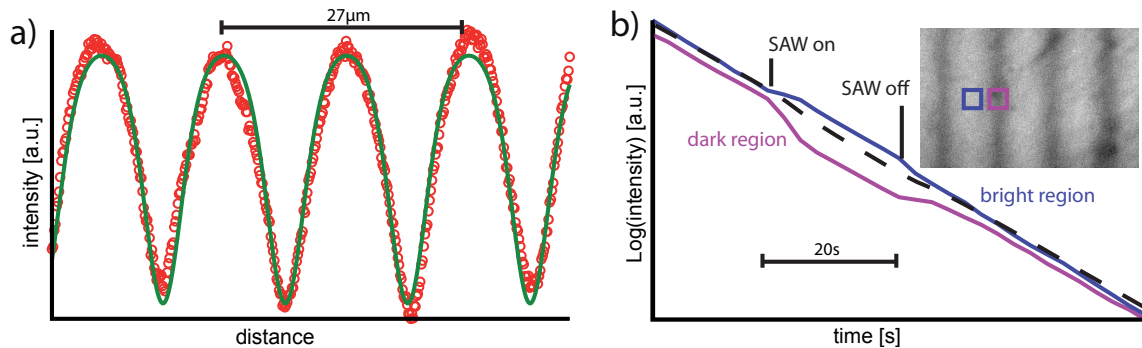


Abbildung 5.9: a) Typisches Intensitätsprofil einer SAW-entmischten Membran (rot, Datenpunkte). An das Intensitätsprofil kann $\exp(\sin^2 x)$ gefittet werden (grüne Linie). b) Zeitliche Entwicklung der integrierten Fluoreszenzintensität an der Stelle eines Knotens und eines Bauchs der stehenden Welle (inset). Die gestrichelte Linie zeigt den Durchschnitt über das Bild, es handelt sich also um eine echte Lipidumverteilung. Die Gesamtabnahme der Helligkeit resultiert aus dem Bleichen.

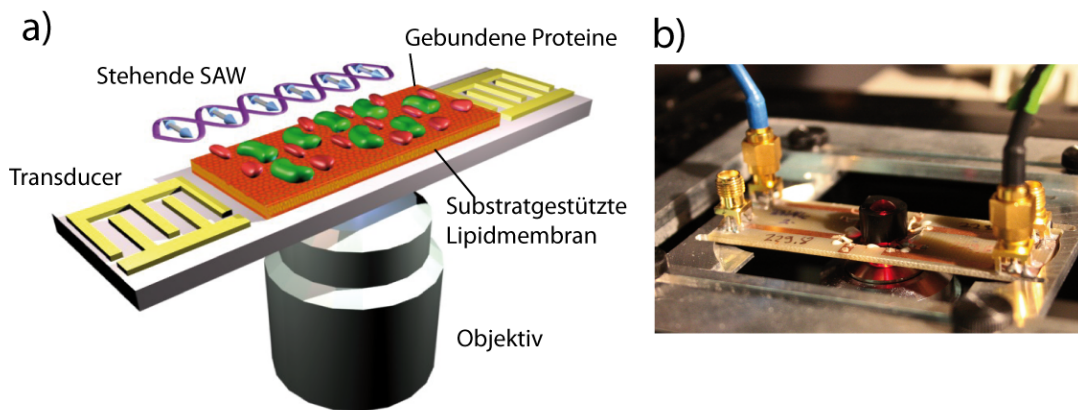


Abbildung 5.10: a) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaues. Auf einem Lithiumtantalchip mit zwei IDTs (interdigital transducers, Frequenz 153MHz , Wellenlänge $26.6\mu\text{m}$) an gegenüberliegenden Seiten wurden stehende Scherwellen erzeugt. Die SLB (ca. 4nm Dicke) und die partiell angesammelten Proteine lassen sich mit Fluoreszenzmikroskopie durch den transparenten Chip beobachten. b) Foto von einem SAW Chip im Fluoreszenzmikroskop. Der Lithiumtantalchip ist in der Mitte in die Platine eingeklebt, an der die Hochfrequenzleitungen befestigt sind. Die Probe wird durch einen aufgeklebten PDMS Zylinder begrenzt und ist oben frei zugänglich.

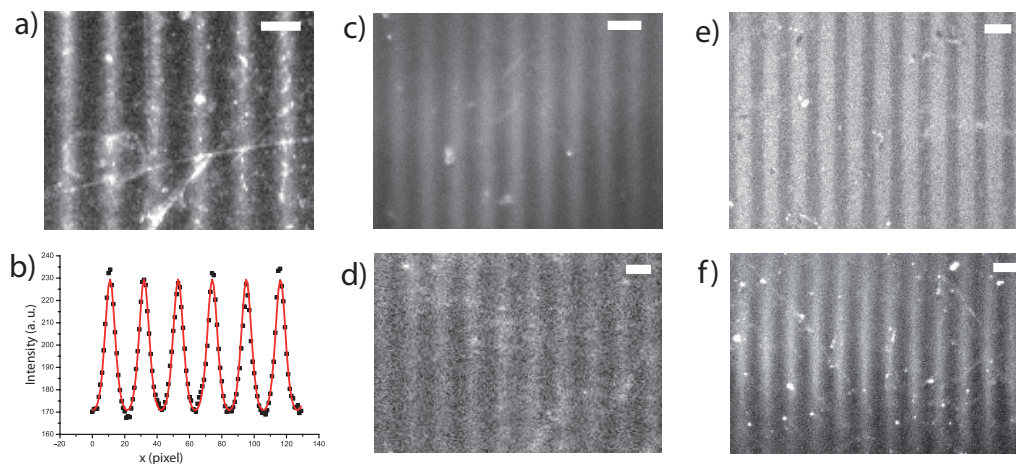


Abbildung 5.11: Fluoreszenzbilder verschiedener an SLBs gebundener Proteine, die durch SAWs segregiert wurden: a) Mobile Neutravidinansammlung bei niedriger Belegungsdichte auf einer DOPC/0,1% Biotin-DHPE Membran. b) Profil des Fluoreszenzbildes von a) (Datenpunkte) mit einem Fit von $I(x) \propto -\exp(\sin^2 x)$ (rote Linie). Die Hintergrundintensität ist 140 (+-10), gemessen an den intransparenten Goldstrukturen. c) Streptavidinansammlung bei niedriger Belegungsdichte d) Avidinansammlung bei niedriger Belegungsdichte e) immobiler Faktor-VIII-Ansammlung bei hoher Belegungsdichte auf einer POPC/10%POPS Membran, f) Immobiler Annexin-Ansammlung bei hoher Belegungsdichte auf einer POPC/POPS Membran. Der Streifenabstand und der Maßstab entspricht der halben SAW-Wellenlänge von $13,3 \mu\text{m}$.

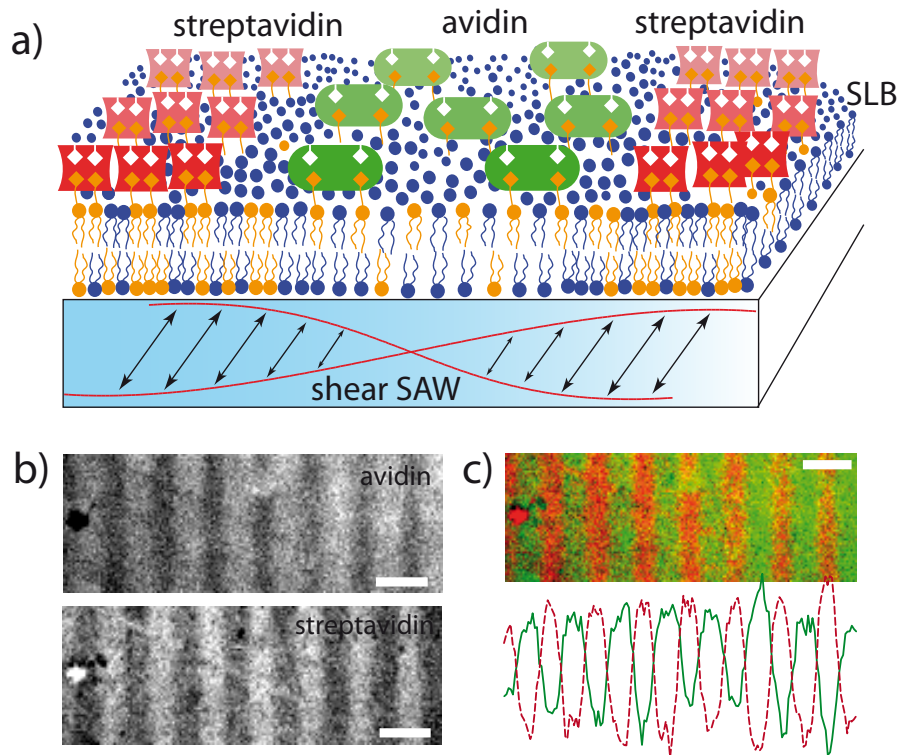


Abbildung 5.12: SAW-induzierte Auftrennung membrangebundenen Streptavidins (rot, Texas Red label) und Avidins (grün, Atto 488 label). Schema a) stellt den vorgeschlagenen Proteinauftrennungsmechanismus dar: Im Bauch der stehenden Welle ist die Membrandichte höher als in den Knotenbereichen, die biotinylierten Lipide (orange) sammeln sich in diesem Bereich. Da Avidin etwas größer ist als Streptavidin und weniger leicht kristallisiert, erlaubt ein streptavidinreicher Bereich insgesamt eine höhere Biotindichte als avidinreiche Regionen und das System relaxiert in einen insgesamt niedrigeren energetischen Zustand indem Avidin in die Bereiche niedriger Dichte gedrückt wird. b) Ursprünglich homogen verteiltes Avidin (grün) und Streptavidin (rot) trennen sich auf, wenn die SAW angeschaltet wird. Die hintergrundkorrigierten Profile beider Fluoreszenzbilder sind in c) geplottet, wobei Avidin grün und Streptavidin rot gestrichelt dargestellt ist.

5.2.3 Transport und Strukturierung von DNA auf SLBs (M1, Anhang 7.5)

DNA ist eines der wichtigsten Moleküle in der Wissenschaft, da es die Erbinformation kodiert und viele interessante biologische und physikalische Eigenschaften hat [80]. Es gibt viele Methoden zur Analyse von DNA Proben, z.B. Elektrophorese, die zwar Standardmethoden im Labor sind, sich jedoch nicht ohne weiteres miniaturisieren lassen. Die Beweglichkeit von SLB-gebundener DNA ist längenabhängig, wie für lange Stränge [69] und für kurze Einzelstränge [88] bereits gezeigt wurde.

In diesem Teil der Arbeit wurden kurze DNA Stränge an kationisch geladene SLBs gebunden und durch angelegte SAWs lokal akkumuliert (s. Abb. 5.13). Die kurzen DNA Stränge (Oligomere) sind elektrostatisch an das positiv geladene Lipid DOTAP gebunden, welches nach dem in Kapitel 5.2.1 beschriebenen Mechanismus in einer Umgebung von DOPC durch die angelegte SAW lokal akkumuliert wird. Die lose an die kationischen Lipide gebundene DNA [69] folgt diesen und reichert sich entlang der Bäuche der stehenden Welle an (s. Abb. 5.14). Man beobachtet für die entmischte DNA dasselbe charakteristische $\exp(\sin^2 x)$ Muster, das sich auch bei der Lipidentmischung und bei der Anreicherung membrangebundener Proteine einstellt. Dies läßt sich thermodynamisch über einen Boltzmannansatz erklären, wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben. Interessant ist hier, daß sowohl gelabelte Lipide innerhalb der Membran, spezifisch gebundene Proteine, als auch elektrostatisch gebundene DNA dasselbe Verhalten zeigen. Dies deutet darauf hin, daß der Mechanismus membrandominiert ist, also die segregierte Membran die gebundenen Makromoleküle beeinflusst.

Es gelang nicht nur, membrangebundene DNA in Streifenmustern entlang der Bäuche der stehenden SAW anzuordnen, es kamen in diesen Experimenten auch erstmals vier jeweils rechtwinklig gegenüber angeordnete IDTs zum Einsatz (s. Abb. 5.13 b). Diese erzeugen zwei rechtwinklig aufeinander stehende SAWs, die bei Überlagerung ein Schachbrettmuster zeigen, das unter dem AFM sichtbar wird (s. Abb. 5.13 c). Eine Schwierigkeit beim Erzeugen solcher gekreuzter SAWs ist es, daß sich die hier verwendeten Scherwellen nur in einer Richtung des anisotropen piezoelektrischen Kristalls effizient erzeugen lassen. Akzeptable Ergebnisse konnten erst erzielt werden, als die gesamte Anordnung um 45° gedreht wurde und somit zwei weniger effiziente SAWs überlagert wurden.

Mit diesen gekreuzten stehenden Wellen konnten membrangebundene kurze DNA Stränge schaltbar in Schachbrettmustern mit $10\mu\text{m}$ Strukturgröße angereichert werden (s. Abb. 5.14 c). Diese konnten mehrfach ein- und ausgeschaltet werden und sind prinzipiell über Schwebungen auch beweglich. Die Schachbrettmuster traten nur in dem Bereich auf, in dem sich die beiden stehenden SAWs überlagerten (etwa $0,25\text{mm}^2$), die Streifenmuster waren jedoch über den gesamten Bereich einer stehenden Welle ($3,5\text{mm} \times 0,5\text{mm}$) zu beobachten (s. Abb. 5.14 c).

Nach dem Ausschalten der SAW mischt sich die Membran wieder homogen durch, und membrangebundene DNA verteilt sich wieder gleichmäßig (s. Abb. 5.15 a). Durch Beob-

achtung der Zerfallszeit τ , kann man die umgekehrt proportionale Diffusionskonstante D berechnen. Im Falle der entmischten Membran geht man von normaler Diffusion aus, der Hauptfourierpeak (s. Abb. 5.15 b) fällt exponentiell ab (s. Abb. 5.15 c), woraus sich über $y = A \exp(t/\tau) + c$ die Abklingzeit und über $y = A \exp(Dt) + c$ die Diffusionskonstante berechnen läßt. Für entmischte Membranen ergeben sich auch plausible Werte von etwa $2\mu\text{m}^2/\text{s}$. Für membrangebundene DNA Oligos beobachtet man jedoch dieselbe „Diffusionskonstante“ unabhängig von ihrer Länge (s. Abb. 5.15 d), was im deutlichen Widerspruch zur Literatur und auch zu eigenen Messungen (s. Abb. 5.16) steht.

Als Grund hierfür schlagen wir folgende Erklärung vor: Die lokal akkumulierte DNA folgt nicht mehr normaler Diffusion, da sie aufkonzentriert ist, sich die Stränge also gegenseitig elektrostatisch abstoßen. Sobald die SAW als treibende Kraft wegfällt, verteilt sich die DNA deutlich schneller wieder gleichmäßig über den Chip als man bei der Annahme normaler Diffusion erwarten würde. Gebremst wird dieser Prozeß durch die Dynamik der SLB, an die die einzelnen DNA Stränge schließlich gebunden sind, und man beobachtet für alle untersuchten DNA Längen dieselbe membrandominierte „Diffusionskonstante“ von $2\mu\text{m}^2/\text{s}$ unabhängig von ihrer Länge. Unabhängig davon erstmals an doppelsträngigen DNA Oligos durchgeführte FRAP Experimente ergaben eine $1/N$ -Abhängigkeit von ihrer Länge, die Werte lagen außerdem deutlich unter den durch SAW-Musterzerfall gemessenen, was die hier gegebene Erklärung stützt.

Die auf SAW Chips beobachtete schnellere Musterrelaxationszeit ist für mögliche Anwendungen wie SAW-getriebenen DNA Transport von Vorteil, da sie die nötigen Zeitkonstanten etwa eine Größenordnung beschleunigt.

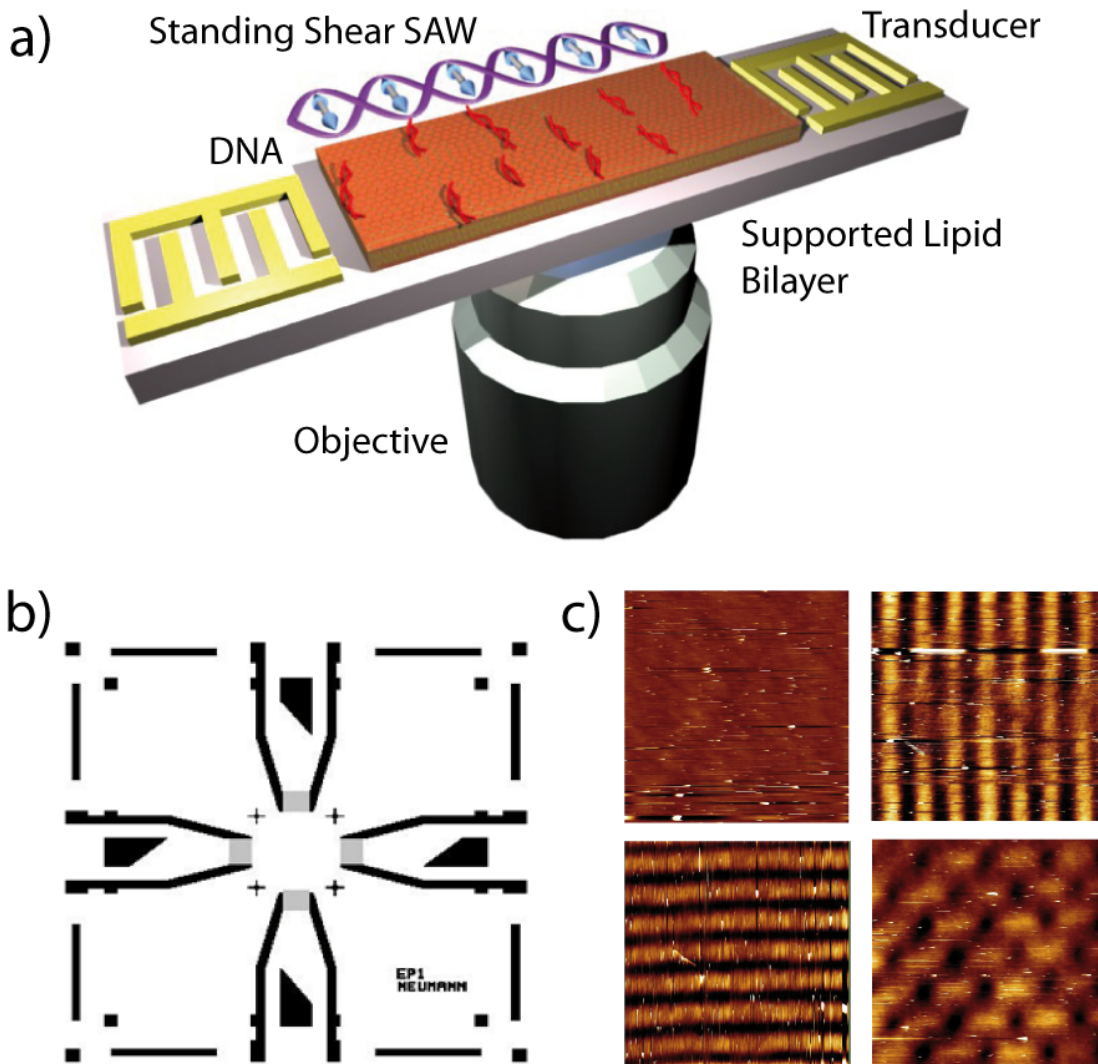


Abbildung 5.13: a) Schema des Versuchsaufbaus. Auf einem Lithiumtantalchip mit zwei gegenüberliegenden IDTs werden SAWs in Form von stehenden Scherwellen erzeugt. Die auf den Chip aufgebrachte SLB und elektrostatisch angebundene DNA Moleküle können durch den transparenten Chip hindurch mit Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. b) Lage der Transducer bei Experimenten mit zwei überlagerten stehenden Wellen, die c) Streifenmuster in zwei Richtungen oder Schachbrettmuster als Überlagerung erzeugen können (AFM Bilder).

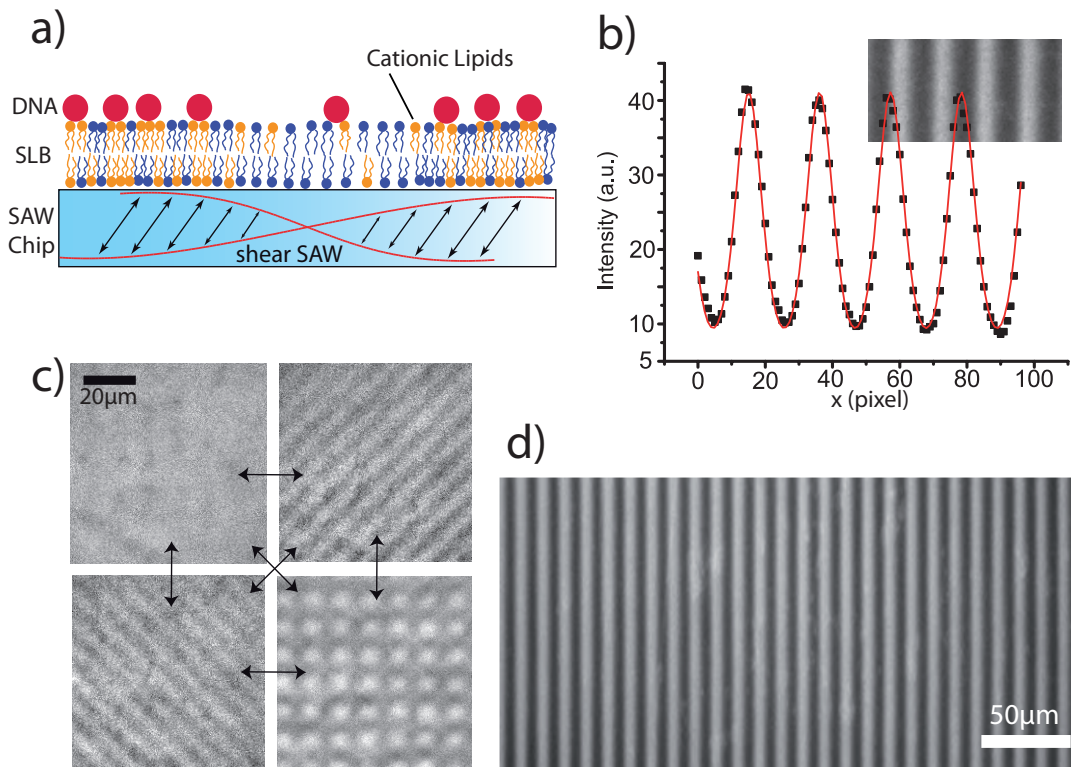


Abbildung 5.14: a) Ansammlung von DNA Oligos (rot) im Bereich des Wellenbauches, wo sich die kationischen Lipide (DOTAP, orange) ansammeln. b) SAW getriebene DNA Musterbildung folgt wie nach den Vorarbeiten zu erwarten einer $\exp(\sin^2 x)$ Verteilung. c) DNA Ansammlung auf einem SAW chip mit zwei gekreuzten IDTs. d) Fluoreszenzbild von DNA Oligoansammlung auf einem Scherwellenchip. Die Helligkeitswerte lassen auf eine lokale 10fache DNA Ansammlung schließen.

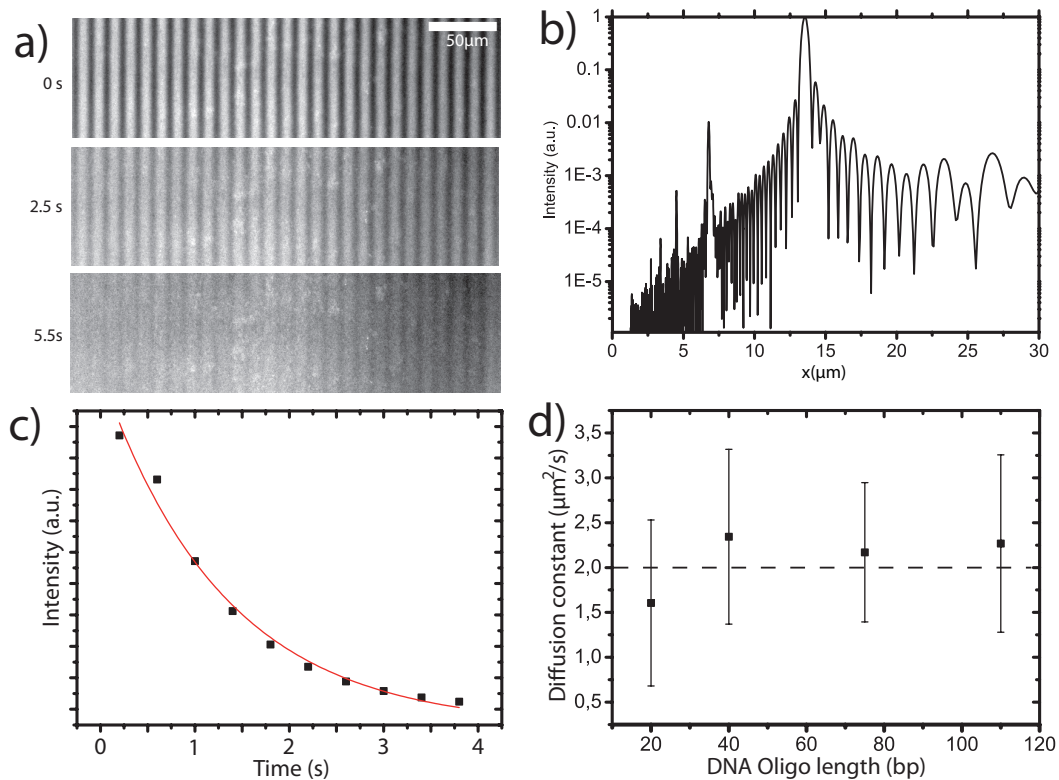


Abbildung 5.15: a) SAW akkumulierte DNA und Zerfall des Musters nach Ausschalten b) FFT von vertikal aufsummiertem Bild a), logarithmisch aufgetragen. Hauptmerkmal ist der dominante Peak bei dem Transducerabstand (halber SAW Wellenlänge) bei $13,3\mu\text{m}$ und einige höhere Moden z.B. bei $6,7\mu\text{m}$. c) Plot und Fit des Zerfalls des Musters nach Ausschalten der SAW gibt die Diffusionskonstante D als Fitparameter. d) Diffusion verschieden langer DNA-Stränge gemessen mit dieser Methode.

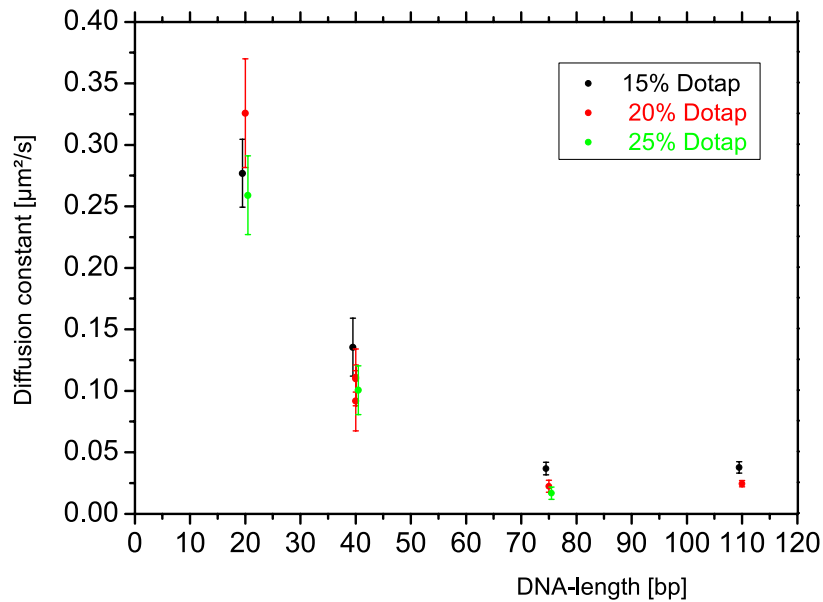


Abbildung 5.16: Diffusionskonstanten von SLB-gebundener DNA in Abhängigkeit von der Oligolänge. Die Werte liegen insgesamt deutlich unter den in 5.15 c) gezeigten Werten und sind stark längenabhängig. Man erwartet einen zu diesen Datenpunkten plausiblen $1/N$ Zusammenhang.

6 Ausblick

In dieser Arbeit wurden Modelllipidmembranen durch engen Kontakt mit verschiedenen Festkörperoberflächen entmischt und strukturiert mit dem Ziel, ihre Dynamik besser zu verstehen und Anwendungen für integrierte Analyse- und Synthese (*Lab-on-a-Chip*) zu entwickeln.

Die Arbeiten zur Erklärung des Bewegungsmusters membrangebundener DNA sind von grundlegender physikalischer Bedeutung, da es sich hierbei um Polymere in quasi zweidimensionaler Umgebung handelt, die zwar theoretisch gut erforscht sind, für die es aber bislang nur wenige Aufbauten gibt um sie experimentell zu untersuchen [24]. Die beobachtete Segregation der Lipide unter dem Einfluß der DNA (Prinzip der „Lipidladungsröhren“) löst den Widerspruch auf, daß man die beobachteten elektrophoretischen Bewegungsmuster der DNA nicht mit der gemessenen Hindernisanzahl innerhalb der Membran erklären kann [68]. Schließlich wurde aufgezeigt, daß sich DNA nach einem $1/N$ Gesetz elektrophoretisch der Länge nach auf Lipidmembranen auftrennen läßt. Diese Methode könnte auch im Rahmen integrierter *Lab-on-a-Chip*- Analysesysteme Anwendung finden und so z.B. als DNA Sensor Bedeutung erlangen.

Mikrodomänen in ternären Riesenvesikeln ließen sich durch den Kontakt mit mikrostrukturierten Oberflächen lokal separieren, was eventuell für die weitere Forschung an Lipid Rafts interessant sein könnte.

Des weiteren wurde die Methode der SAW induzierten Membranmanipulation neu entwickelt, thermodynamisch schlüssig erklärt und durch Simulationen gestützt. Dies trägt zum tieferen Verständnis der Lipidmembran bei, da eine neue Methode entwickelt wurde, um lokale Dichteänderungen zu erzeugen, was bisher nur mit wenigen Methoden möglich war, z.B. durch Membranspreiten, dies allerdings nur im Fließgleichgewicht [89, 38].

Es konnte gezeigt werden, daß der Mechanismus zur dynamischen Entmischung von Lipidmembranen benutzt werden kann, um angebundene Makromoleküle lokal zu akkumulieren, zu schieben und sogar ähnliche Proteine zu separieren. Damit ergeben sich analytische Anwendungen für *Lab-on-a-Chip*: Membranproteine könnten beispielsweise aus Zellmembranen extrahiert, akkumuliert und sogar sortiert werden, denkbar wäre auch eine Auftrennung ähnlich der Gelelektrophorese. Damit wäre eine Vielzahl an Informationen über einzelne Zellen zugänglich.

Die Experimente zur lokalen dynamischen Strukturierung von DNA lassen sich möglicherweise weiterentwickeln zu einem miniaturisierten Sensor für DNA Analyse, oder für die Synthese komplexerer DNA Strukturen wie z.B. DNA Origamis.

Auch miniaturisierte Syntheseanwendungen sind durch Kombination der vorgestellten

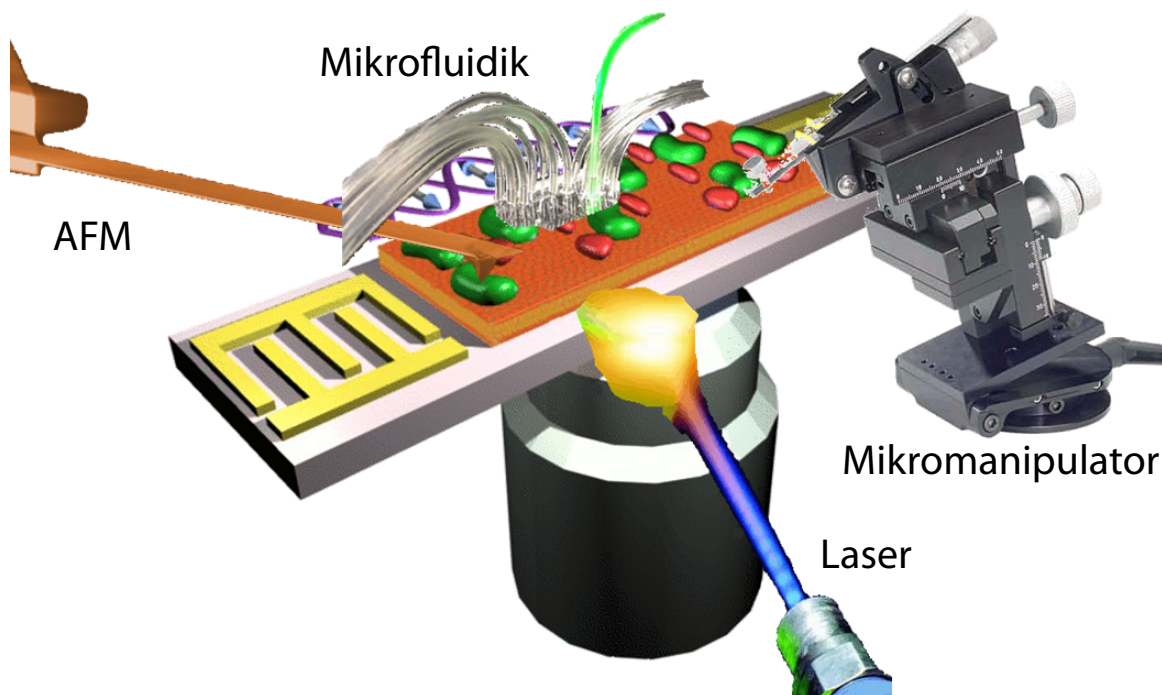


Abbildung 6.1: Vision eines molekularen Fließbandes. Auf der substratgestützten Membran (Dicke 4nm , Ausdehnung ca. 10mm^2) werden wie oben beschrieben, Makromoleküle wie auf einem Förderband transportiert und von bereits verfügbaren Geräten wie z.B. einem AFM, einem Laser oder Mikromanipulator bearbeitet. Da der hier beschriebene Aufbau oben offen ist, läßt er sich auch nach Belieben mit Mikrofluidik verbinden.

Technik mit bereits etablierten Techniken wie z.B. AFM, Laserheizung, Mikromanipulatoren und Mikrofluidik (s. Abb. 6.1), [78, 76, 90] vorstellbar. Dieses „molekulare Fließband“ könnte für den systematischen Aufbau und Untersuchungen an synthetischen enzymatischen Netzwerken benutzt werden [91], um sukzessive Makromoleküle wie z.B. DNA von einem fest verankerten Enzym zum nächsten zu schieben und dort jeweils zu bearbeiten. In den Bereich des Möglichen rückt auch eine dynamische Zellstrukturierung: Ganze Zellen gebunden an SLBs könnten sich schieben, und sortieren lassen, größere SAW-Wellenlängen könnten hierfür benutzt werden. Bei der Verwendung kürzerer Wellenlängen bis hinunter zu 100nm sollte es möglich sein, die Substruktur der Zellen, also die Membranproteine und Lipid Rafts direkt zu beeinflussen.

7 Anhang

7.1 Originalpublikation P1

Tobias Stögbauer, Martin Hennig, Joachim Rädler

Alignment and Deformation of Lipid Bilayer Domains in Vesicles adhering to Microstructured Substrates

Biophysical Reviews and Letters, Vol. 5, No. 3, 1-9, 2010

Copyright: World Scientific Publishing Company, Pte. Ltd., 2010

DOI: 10.1142/S1793048010001160

Reproduced with permission from World Scientific Publishing Company, Pte. Ltd.

This article can be downloaded at

<http://www.worldscinet.com/brl/05/preserved-docs/0503/S1793048010001160.pdf>

7.2 Originalpublikation P2

Valentin Kahl, Martin Hennig, Berenike Maier, Joachim O. Rädler

Conformational Dynamics of DNA-Electrophoresis on Cationic Membranes

Electrophoresis, Vol. 8, 30, 1276-1281, 2009

copyright 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
DOI 10.1002/elps.200800430

with permission

This article can be downloaded at:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.200800430/pdf>

7.3 Originalpublikation P3

Martin Hennig, Jürgen Neumann, Achim Wixforth,
Joachim O. Rädler, Matthias F. Schneider

Dynamic patterns in a supported lipid bilayer driven by surface acoustic waves

Lab on a Chip, 9, 3050-3053, 2009

copyright The Royal Society of Chemistry 2009
DOI:10.1039/B907157A

Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry

This article can be downloaded at
<http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2009/LC/B907157A>

Electronic supplementary information (ESI) available: Movie showing the formation and decay of lateral patterns in a lipid membrane subjected to a standing surface acoustic shear wave (sSAW). See DOI: 10.1039/b907157a

<http://www.rsc.org/suppdata/LC/b9/b907157a/B907157A.AVI>

7.4 Originalpublikation P4

Jürgen Neumann, Martin Hennig, Achim Wixforth,
Stefan Manus, Joachim Rädler, Matthias Schneider

Transport, Separation and Accumulation of Proteins on Supported Lipid Bilayers

Nano Letters, 10, 2903-2908, 2010

copyright by the American Chemical Society
DOI: 10.1021/nl100993r

This article can be downloaded at
<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nl100993r>

Reproduced by permission of the American Chemical Society

Supplementary Information available at
<http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/nl100993r>
(Materials and Methods)

and
<http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/nl100993r>
(Movie)

7.5 Manuskript M1

Switchable DNA patterning on Supported Lipid Bilayers driven by Surface Acoustic Waves

Martin Hennig, Manuel Wolff, Jürgen Neumann,
Achim Wixforth, Matthias F. Schneider, Joachim O. Rädler

Switchable DNA patterning on Supported Lipid Bilayers driven by Surface Acoustic Waves

M. Hennig¹, M. Wolff¹, J. Neumann², A. Wixforth³, M.F. Schneider⁴, J.O. Rädler¹

[¹] J.O. Rädler, M. Hennig, M. Wolff
Center for NanoScience, Ludwig-Maximilians-Universität, Fakultät für Physik
Geschwister Scholl Platz 1, D-80539 München (Germany)

[²] J. Neumann
Center for NanoScience, Biozentrum der LMU München,
Großhaderner Str. 2, D-82152 Planegg-Martinsried (Germany)

[³] A. Wixforth
Center for NanoScience, Universität Augsburg, Institut für Physik,
Universitätsstr. 1, D-86159 Augsburg (Germany)

[⁴] M.F. Schneider
Boston University, Mechanical Engineering
110 Cummington Street, Boston, MA, 02215 (USA)

On chip DNA sequencing and genotyping require development of miniaturized manipulation and handling techniques. Here we demonstrate the application of standing surface acoustic waves (SAWs) as DNA manipulator: DNA, bound to a supported lipid bilayer is segregated into movable checkerboard arrays (~10µm scale) and accumulated more than 10fold. The pattern decay is shown to be superdiffusive by comparison with results from FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) measurements on DNA-oligo diffusion. It confirms our model of a membrane mediated transport mechanism.

Supported lipid bilayers (SLBs) provide a versatile platform for applying surface sensitive techniques in studying the properties of lipid bilayers [Sackmann1996]. The properties of the only 4nm thick SLB can be well tuned by the lipid mixture. The incorporation or association of macromolecules (proteins as well as DNA) has been developed and used to study e.g. the role of lock and key forces during cell adhesion [Smith2008] or the mobility of laterally confined macromolecules. Structuring of SLBs with spacially static geometries has been achieved by many approaches, e.g. through substrate micro patterning [Groves1997, Sani2008, Stögbauer2010], via electrical fields [Groves1998] or UV lipid crosslinking [Morigaki2002]. The alignment of DNA has also been demonstrated by micro-textured surfaces, microchannels or fluid-flow [Hochrein2006, Krishnan2007, Jönsson2009]. On the other hand, we have recently shown, that the oscillating mechanical deformation induced by standing in-plane shear SAWs causes reversible density modulations within SLBs [Hennig2009]. These modulations can be controlled in time and space. Rayleigh-wave substrates (often made of quartz or lithium niobate, LiNbO₃) strongly couple into the liquid (acoustic streaming) [Frommelt2008] and are used to drive liquids [Fillafer2009], accumulate and separate particles in microfluidics [Franke2010, Shi2009], but cannot be used for the application presented here due to their strong attenuation [Shiokawa1988]. Membrane demixing and local DNA accumulations can be observed by the redistribution of fluorescent dye molecules and thermodynamically explained by substrate-membrane coupling [Hennig2009]. These induced density modulations within SLBs can be used to accumulate, transport and separate membrane-bound proteins [Neumann2010].

In this article, we report on the application of SAWs to generate, control and move patterns of DNA along the water-membrane interface. Using fluorescence microscopy, we demonstrate that the interaction of SAWs with an SLB can lead to reversible continuous accumulation of DNA at obstacles and its local accumulation in switchable checkerboard-patterns of ~10µm feature size. We achieved to support the thermodynamical explanation of this membrane processes given in [Hennig2009, Neumann2010] by diffusion constant measurements of different length DNA oligos extracted from SAW pattern decay and independent FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) measurements.

Technically, SAWs are generated on piezoelectric crystals using interdigital transducers (IDTs) [White1965] as shown in **Fig. 1a**. The lithium tantalate (LiTaO₃) substrates used are only 200-400µm thick, transparent and mirror polished on both sides, allowing for high optical resolution by fluorescence microscopy. A crystal cut of (36°Y), is employed which

predominantly generates in-plane shear waves [Shiokawa1987]. Standing acoustic waves were excited by continuous and simultaneous stimulation on both opposed IDTs (**Fig. 1a**). The standing shear SAW reaches over the whole distance between both transducers (3.5 mm) even in the presence of water. Chips with two crossed SAW paths were built allowing superposition of two standing SAWs realizing a checker board pattern of nodes and antinodes (**Fig. 1b**). For the crossed IDTs, the chip design was rotated 45° such that efficient wave stimulation with equal frequency could be achieved in both pathways that are equally rotated against the ideal wave propagation direction. Using AFM in deflection mode, the shear SAWs could be visualized under water (**Fig. 1c**) – separately for each active sound path and also for the superposition of two standing waves.

Supported lipid bilayers were prepared by the vesicle fusion method [Sackmann1996]. SLBs contained 20% of the cationic lipid DOTAP in a neutral DOPC bulk environment if not reported differently. Cy5-labelled DNA was added in excess and bound electrostatically to the membrane. After 15min, when the surface coverage reached saturation, unbound DNA was removed by water rinsing, whereby the exact density depends on the percentage of cationic DOTAP within the membrane.

The coupling of a SAW to a SLB causes local membrane density modulations, resulting in the accumulation of labeled lipids (TR-DHPE), directly observable by fluorescence microscopy (**Fig 2a,c 3a**). The attached DNA which is loosely bound to cationic lipids via electrostatic forces at the membrane remains laterally mobile [Maier1999] and can be moved by external electrical fields [Kahl2009, Olson2001, Athmakuri2010] results in a length dependent diffusion according to $1/N$. Short DNA oligonucleotides behave similar like membrane bound proteins [Neumann2010]. They accumulate reversibly along stripes parallel to the wave front of the SAW (**Fig. 2c, 3a**) as clearly visible by fluorescence microscopy. The DNA molecules associated with the cationic DOTAP lipids [Kahl2009] accumulate in regions of higher membrane density, whereas e.g. Texas Red labeled lipids (TR-DHPE) migrate to regions of lower density [Nissen2001, Hennig2009, Neumann2010] (**Fig. 2a**). In the case of two standing waves orthogonal to each other (using four transducers and two split-wave generators), reversible localized checker-board dots of DNA oligonucleotides can be observed (**Fig. 2c**). Depending on which wave was switched on or off, the pattern is realizing one of the most important features of our set up: It *reversibly* organizes DNA in a “soft” 2D environment.

When one of two coupled wave generators creating a standing SAW is slightly detuned (e.g. 0.1 Hz at an operating frequency of 153MHz), the generated beat starts moving across the

chip resulting in a continuous shift of the pattern. If chosen decently slow such that the membrane can reorganize and follow, DNA is being transported across the chip.

After the SAW has been switched off, the DNA is free to diffuse back again. This realizes a switchable crossover between a 2D and a 1D system and may also possibly enable DNA length separation: After a mixture of different DNA strands has been accumulated at a scratch, the beat direction can be reversed or an electrical field could be switched on driving the molecules away from the obstacle. This is expected to lead to a length separation of DNA molecules [Kahl2009] comparable to DNA electrophoresis in gels where different size DNA molecules show different electrostatic drift.

Observing the diffusive decay of DNA stripe patterns on supported lipid membranes can be used to determine its diffusion constant [Stelzle1992]. In [Hennig2009] we showed, that patterns of fluorescently labeled lipids within a supported membrane relax in accordance with literature values around $2\mu\text{m}^2/\text{s}$ of supported lipid bilayers measured by others, e.g. by FCS [Benda2003]. In this work, DNA oligonucleotides of different lengths (20-40-75-110bp) are bound to SLBs, a SAW induced pattern is created and (assuming diffusive dynamics) diffusion constants were calculated by analyzing the exponential decay of the main Fourier component of the periodic pattern [Stelzle1992, Hennig2009]: First, a movie of DNA pattern creation and relaxation is recorded. Images are cropped and turned such that the DNA accumulation stripes appear vertically (**Figure 3a**). In a next step, images were summed-up vertically and FFT transformed using zero padding (**Figure 3b**). The height of the main Fourier peak gives a measure of the deflection from the equilibrium of the system. Last, diffusion constants could be extracted by fitting an exponential to the decay of the main Fourier peaky according to

$$y = A \exp(-t / \tau) + c \quad \text{equ. 1}$$

(**Figure 3c**), where the measured value is the decay time $\tau = 1 / D$. For comparability with figure 4, D instead of τ was plotted. For the distinct DNA oligos with lengths 20, 40, 75 and 110bp we find that their diffusion constants are all around $2\mu\text{m}^2/\text{s}$ – which perfectly fits the dynamics of a supported lipid bilayer. On the other hand, this is not what is expected from DNA bound to a SLB of the composition used in these experiments. Instead, a strong length dependence $1/N$ of the DNA diffusion constant would be expected as reported by [Athmakuri2010] for short single stranded Oligos, [Kahl2009] for very long double stranded DNA and own FRAP measurements (**Figure 4**). Furthermore, diffusion constants of DNA would be around factor ~ 6 (for 20bp) to factor 20 (for 75 and 110bp Oligos) smaller. Part of

the large scattering of data points results intrinsically from the system of DNA bound to SLBs [Kahl2009], part of it from the fact, that the membrane fluidity depends on the history, e.g. cleaning, rinsing etc. of the chip. Furthermore, SLBs seem to degrade when a strong SAW has been applied for a longer time [Hennig2009].

We explain the difference in diffusion constant values measured by pattern decay and FRAP as follows: The deflection and SAW driven reorganization of the membrane structure leads to a highly non-equilibrium situation. Physical values such as membrane density, viscosity, membrane composition, diffusion coefficient and DNA concentration are not homogeneous over the chip. When this system relaxes back into its equilibrium state, this happens not only by normal diffusion processes. As the DNA is locally accumulated by the influence of the SAW, the redistribution is clearly visibly overdifusive, as the anionic DNA molecules repel each other and don't behave purely diffusive as the DNA in the FRAP measurements shown (**Figure 4**).

These findings further support our explanation of this phenomenon, namely that mechanical coupling of the SAW to the SLB causes density modulations within the membrane that cause demixing [Hennig2009, Neumann2010]. The diffusion constants found are typical for membrane diffusion which indicates that the process is “membrane dominated”. For our thermodynamical description of the pattern found (**Figure 2b**) we assume linear coupling of the sinoidal SAW's intensity to the SLB

$$\Delta G(x) \propto \sin^2 kx \quad \text{equ. 2}$$

Using the assumption that the fluorescence intensity I is proportional to the observed dye concentration c , we insert eq. 2 into the common Boltzmann distribution

$$c_F(x) = c_0 \exp(-\Delta G(x)/k_B T) \quad \text{equ. 3}$$

Which gives a formula

$$I_F(x) = I_B + I_0 \exp\left(-\frac{\alpha \sin^2 kx}{k_B T}\right) \quad \text{equ. 4}$$

That perfectly fits the dye distributions measured – independent of the fact, if lipids [Hennig2009], proteins [Neumann2010] or DNA (**Figure 2**) is accumulated. These findings indicate, that the dominating mechanism is indeed the redistribution of the lipids within the membrane, in the case of the DNA the cationic lipid DOTAP it is electrostatically bound to [Kahl2009].

Figure 4b shows a nearly linear salt dependence of the DNA diffusion constant indicating that a strong binding to the membrane causes slower movement.

14.03.2011

In summary, we have shown that standing surface acoustic shear waves applied to decorated supported lipid membranes are able to accumulate, transport and align DNA in two dimensional corrals. The standing SAW pattern is imprinted on the membrane by linear coupling causing shear within the membrane, locally dissipating energy and therefore modulating its density. This causes lipid demixing within the membrane, whereas membrane bound DNA follows the cationic lipids it is electrostatically bound to. These processes can be explained by fundamental thermodynamics which is supported by comparison with FRAP measurements of double stranded DNA oligos bound to SLBs.

The technique presented here can be directly used to accumulate membrane-bound macromolecules like anchored proteins [Neumann2010], and likely be generalized to receptors, transmembrane proteins like ion channels or even whole bound cells by changing the wavelengths of the SAWs used (technically reachable are wavelengths about between 100nm and 100 μ m).

Since the transport of the immobilized macromolecules in 2D is strongly size dependent, this approach allows the separation, sorting, extraction or purification of macromolecules (lateral electrophoresis). On the way to molecular bottom-up building, these switchable 2D-patterns and –transport could be useful tools. Combined with other methods like SAW-microfluidics [Thalhammer2007], AFM, optical tweezers, micromanipulators, micropipettes etc., these methods may be automated to a full lab-on-a-chip separation and sorting factory allowing blood screening, membrane protein purification, protein separation and DNA sorting – a “*Flatland Factory*”.

Financial support by the Excellence Cluster ‘Nanosystems Initiative Munich (NIM)’ and the Center for NanoScience (CeNS) is gratefully acknowledged. We thank S. Manus and S. Bössinger for technical support.

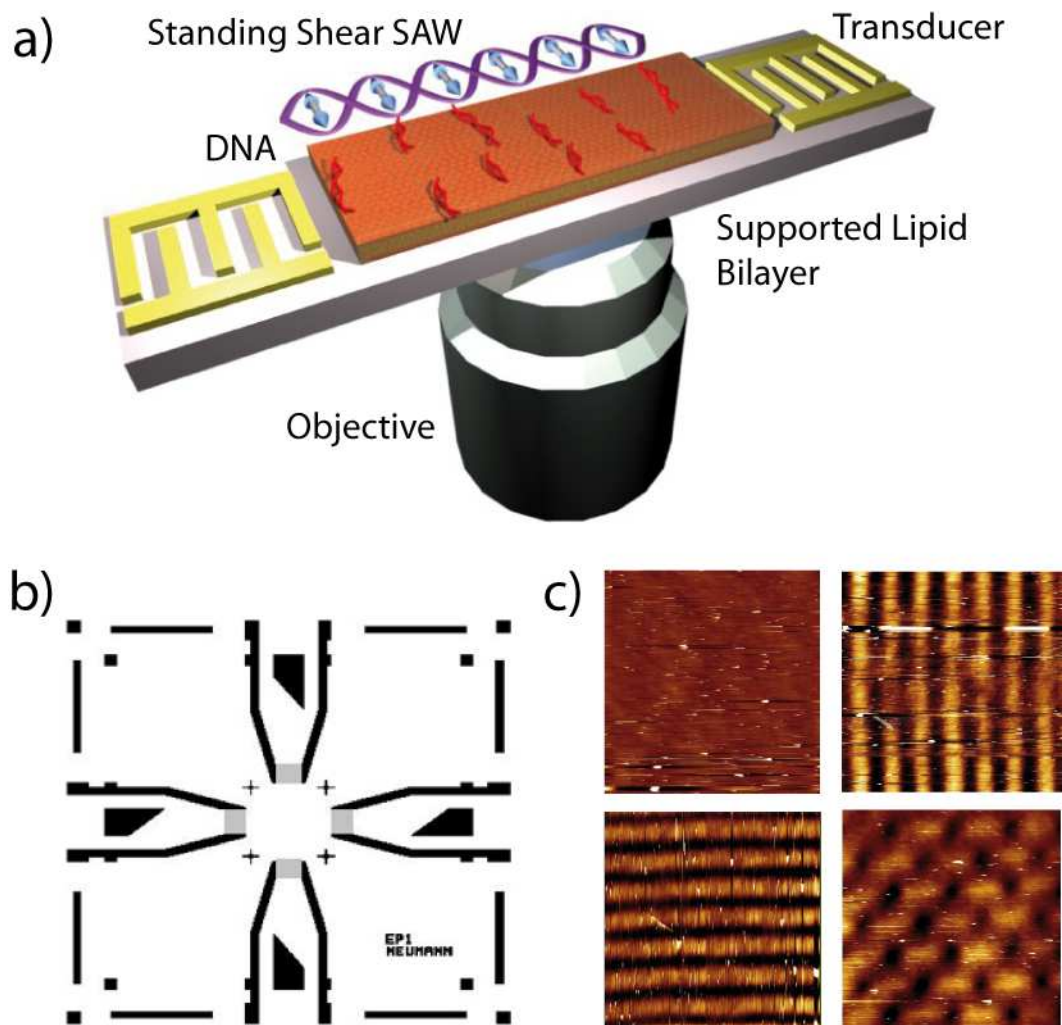


Figure 1: a) Diagrammatic representation of the setup used. A LiTaO₃ chip has two interdigital transducers (IDTs) on opposite sides to generate a standing SAW. The supported membrane and partially-accumulated macromolecules on top, which are between the IDTs, can be observed by fluorescence microscopy through the chip.

b) Chipdesign with two crossed transducers c) AFM images in deflection mode of crossed SAWs in the overlapping region of both SAW paths

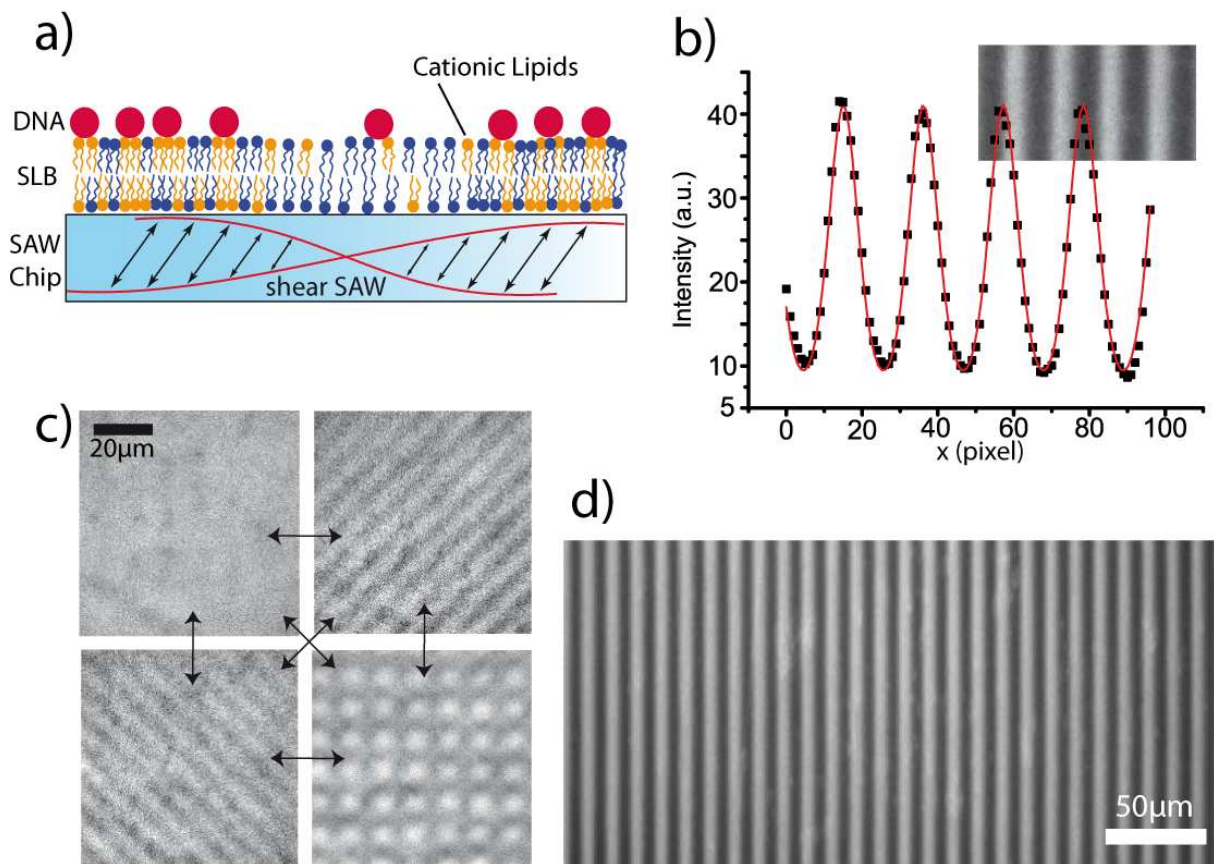


Figure 2a) DNA oligo accumulation (red) is shown at the antinode position where the cationic lipid DOTAP (orange) accumulates. **b)** SAW-induced membrane density pattern following $\exp(\sin^2)$ **c)** DNA accumulation driven by two orthogonal IDTs. The effect is much weaker than in the case of only two transducers, as shear waves can only ideally be excited in one direction depending on the crystal cut. **d)** Large scale very distinct DNA stripe pattern. Note the sharp discrimination of DNA depleted and accumulated regions that are about 10fold. (bright value 299, dark value 91, background 68)

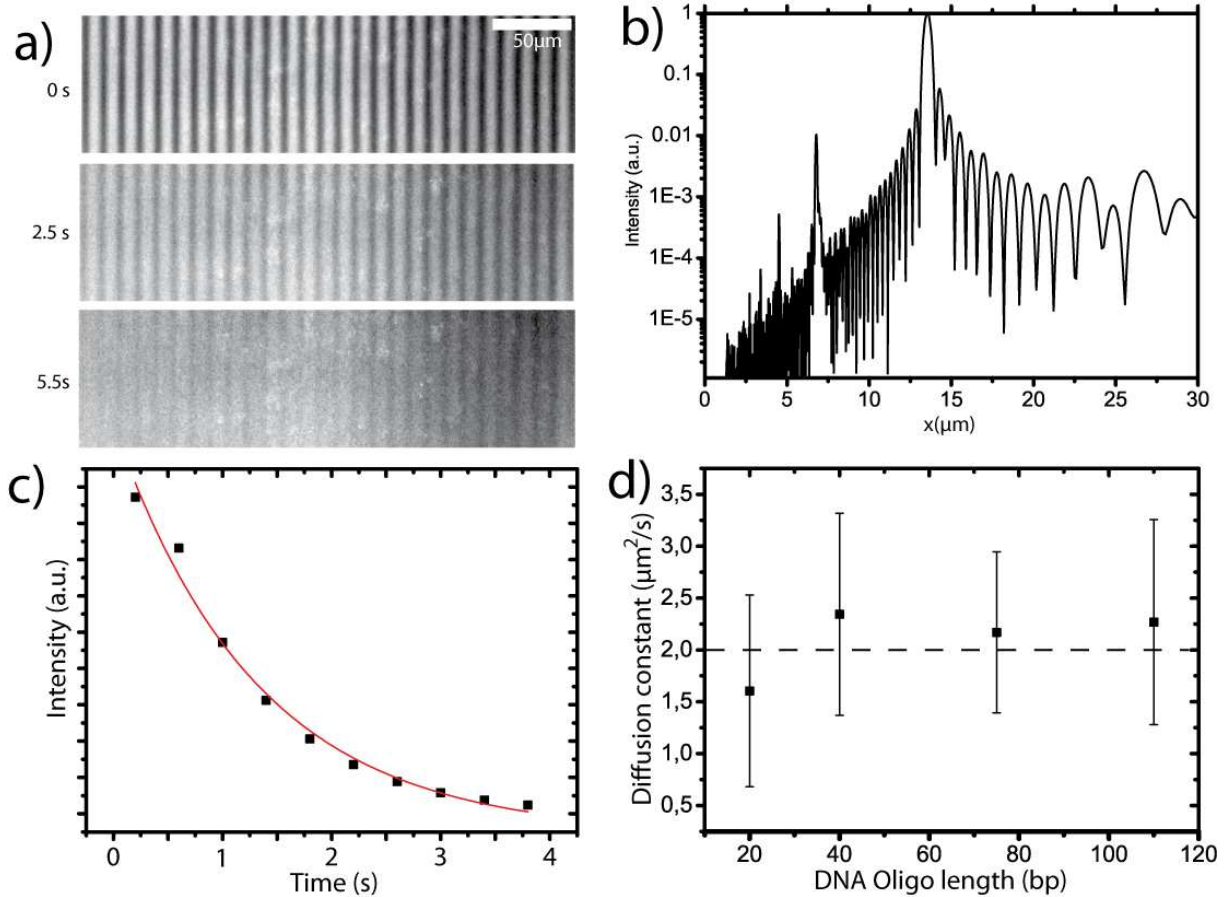


Figure 3: **a)** Image series of a DNA pattern decay after the SAW has been switched off. **b)** Fast Fourier transformation of vertically summed up image a) plotted logarithmically. Its main feature is the dominant peak at the transducer distance $13.3\mu\text{m}$ (half the SAW wavelength). Higher modes are also visible e.g. at $6.6\mu\text{m}$. **c)** Plot and fit of the decay of the main peak of b) yields the diffusion constant D as a fit parameter. **d)** measured diffusion constants of DNA oligos with lengths 20, 40, 75 and 110 base pairs (10, 7, 7, 4 data points respectively). Error bars depict the standard deviation of the data points. No strong length dependence is observed as theoretically expected (explanation in the text).

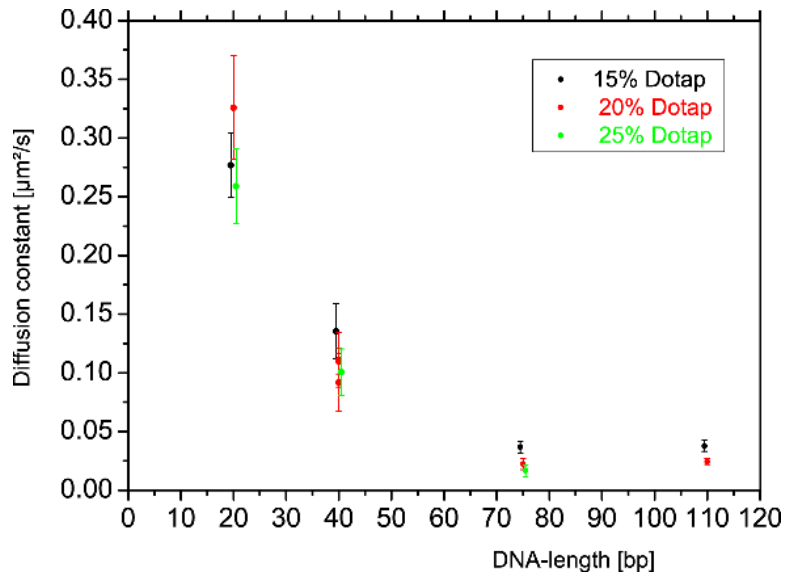


Figure 4: FRAP data of DNA oligos bound to a SLB. Diffusion constants follow a $1/N$ dependence, but show no strong density (DOTAP) dependence. The overall values are below the values measured by SAW pattern decay (Fig. 3d)

14.03.2011

[Sackmann1996] Sackmann, E., *Science*, **1996**, 271, 5245, 43-48

[Smith2008] Smith, A., Sengupta, K., Goennenwein, S., Seifert, U., Sackmann, E., *Proc Natl Acad Sci Usa*, **2008**, 105, 19, 6906-6911

[Horton2007] Horton, M. R., Reich, C., Gast, A. P., Rädler, J. O., Nickel, B., *Langmuir*, **2007**, 23, 11, 6263-6269

[Sanii2008] Sanii, B., Smith, A. M., Butti, R., Brozell, A. M., Parikh, A. N., *Nano Letters*, **2008**, 8, 3, 866-871

[Hochrein2006] Hochrein, M. B., Leierseder, J. A., Golubovic, L., Rädler, J. O., *Phys. Rev. Lett.*, **2006**, 96, 3, 038103

[Krishnan2007] Krishnan, M, Mönch, I, Schwille, P, *Nano Letters*, **2007**, Vol. 7, No. 5, 1270-1275

[Nabika2009] Nabika, H, Iijima, N, Takimoto, B, Ueno, K, Misawa, H, Murakoshi, K, *Analytical Chemistry*, **2009**, 81, 2

[Stögbauer2010] Stögbauer, T., Hennig, M., Rädler, J.O., *Biophysical Reviews and Letters*, **2010**

[Groves1998] Groves, J. T., Boxer, S. G., McConnell, H. M., *Proc Natl Acad Sci Usa*, **1998**, 95, 3, 935-938

[Stelzle1992] Stelzle, M., Miehlich, R., Sackmann, E., *Biophys. J.*, **1992**, 63, 1346-1354

[Tögl2003] Tögl, A., Kirchner, R., Gauer, C., Wixforth, A., *Journal of Biomolecular Techniques*, **2003**, 14, 3, 197-204

[Wixforth2004] Wixforth, A., Strobl, C., Gauer, C., Tögl, A., Scriba, J., Guttenberg, Z., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 379, 982-991

[Sritharan2006] Sritharan, K., Strobl, C. J., Schneider, M. F., Wixforth, A., von Guttenberg, Z., *Applied Physics Letters*, **2006**, 88, 054102

[Frommelt2008] Frommelt, T., Kostur, M., Wenzel-Schafer, M., Talkner, P., Hänggi, P., Wixforth, A., *Physical Review Letters*, **2008**, 100, 3

[Shi2009] Shi, J., Huang, H., Stratton, Z., Huang, Y., Huang, T. J., *Lab Chip*, **2009**, 9, 3354 - 3359

[Hennig2009] Hennig, M., Neumann, J., Wixforth, A., Rädler, J. O., Schneider, M. F., *Lab Chip*, **2009**, 9, 3050-3053

[White1965] White, R. M., Voltmer, F. W., *Applied Physics Letters*, **1965**, 7, 12, 314-316

[Shiokawa1988] Shiokawa, S., Moriizumi, T., *Japanese Journal Of Applied Physics* (Supplemental; Proc. 8Th Symp. Ultrason. Electron.), **1988**, 27, 1, 142-144

14.03.2011

[Rohrbeck1991] Rohrbeck, W., Chilla, E., Fröhlich, H.-J., Riedel, J., *Applied Physics A – Solids and Surfaces*, **1991**, 52, 344-347

[Jönsson2009] Jönsson, P., Beech, J.P., Tegenfeldt, J.O., Höök, F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 5294-5297

[Nagle2000] Nagle, J. F. and Tristram-Nagle, S., *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1469, 159-195

[Merkel1989] Merkel, R., Sackmann, E., Evans, E., *Journal De Physique*, **1989**, 50, 1535-1555

[Nissen2001] Nissen, J., Jacobs, K., Rädler, J. O., *Phys Rev Lett*, **2001** Feb 26, 86, 9, 1904-1907

[Tanaka2001] Tanaka, M., Kaufmann, S., Nissen, J., Hochrein, M., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2001**, 3, 4091-4095

[Kahl2009] Kahl, V., Hennig, M., Maier, B., Rädler, J.O., *Electrophoresis*, **2009**, Vol. 8, 30, 1276-1281

[Neumann2010] Neumann, J., Hennig, M., Wixforth, A., Manus, S., Rädler, J.O., Schneider, M.F., *Nanoletters*, **2010**, Vol. 10, 8, 2903-2908

[Fillafer2009] Fillafer, C., Ratzinger, G., Neumann, J., Guttenberg, Z., Dissauer, S., Lichtscheidl, I. K., Wirth, M., Gabor, F., Schneider, M. F., *Lab Chip*, **2009**, 9, 2782 - 2788

[Franke2010] T. Franke, S. Braunmuller, L. Schmid, A. Wixforth, and D. A. Weitz, *Lab on a Chip*, **2010**, 10, 6, 789-794

[Maier1999] B. Maier and J. O. Radler, *Physical Review Letters*, **1999**, 82(9), 1911-1914

[Olson2001] D. J. Olson, J. M. Johnson, P. D. Patel, E. S. G. Shaqfeh, S. G. Boxer, and G. G. Fuller, *Langmuir*, **2001**, 17(23):7396-7401

[Athmakuri2010] K. Athmakuri, M. Rohovie, C. Padala, R. Cole, and R.S. Kane, *Langmuir*, **2010**, 26(16), 13393–13398

[Stelzle1992] M. Stelzle, R. Miehl, and E. Sackmann, *Biophysical Journal*, **1992** 63(5) 1346-1354

[Morigaki2002] K. Morigaki, T. Baumgart, U. Jonas, A. Offenhausser, and W. Knoll, *Langmuir*, **2002**, 18(10) 4082-4089

[Benda2003] Benda, A; Benes, M; Marecek, V, Lhotsky, A., Hermens, W, and Hof, M., *Langmuir*, **2003**, Vol. 19 (10), 4120-4126

7.6 Vesikelfusionsmethode zur Präparation von substratgestützten Membranen

Die Lipide werden in Pulverform oder in Chloroform gelöst geliefert, normalerweise 25mg/ml . Die gewünschten Lipide mischt man unter dem Abzug unter Verwendung von lösungsmittelresistenten Glasphiolen und Glasspritzen zusammen und trocknet sie unter Stickstofffluss aus. Benutzte Gerätschaften werden vor und nach Verwendung sorgfältig mit Chloroform gespült. Über Nacht trocknen die Lipide im Vakuumschrank oder Exsiccator komplett aus - dieser Schritt ist essentiell wichtig und sollte keinesfalls abgekürzt werden. Lösungsmittelreste verhindern häufig die Bildung homogener Lipidbilayer.

Zu den ausgetrockneten Lipiden wird Milliporewasser hinzugegeben, um typischerweise eine Konzentration von 1mg/ml zu erhalten. Die Fläschchen werden sorgfältig geschüttelt und gevortext, so dass eine homogene (häufig trübe) Emulsion entsteht. Diese stellt man bei 50° für 3h in den Wärmeschrank, schüttelt erneut und beschallt sie schließlich im Rüsselbeschaller (tip sonicator) für 10min, um grössere Lipidstrukturen aufzubrechen und erhält eine klare Lösung mit kleinen Vesikeln (SUVs).

Diese SUVs werden in die zu beschichtende Kammer gefüllt und 45min stehengelassen. In dieser Zeit binden die Vesikel an die hydrophile Oberfläche, platzen dort auf und bilden eine durchgehende substratgestützte Membran. Die hohe Krümmung der kleinen SUVs unterstützt diesen Prozess. Danach spült man die Kammern stark durch, um alle Vesikel und eventuelle Multilagen zu entfernen und gibt den gewünschten Puffer hinzu (z.B. PBS bei der Verwendung von Proteinen oder HEPES bei DNA).

Die DNA oder Proteine, die man an die Membran binden will, werden nun einfach hinzupipettiert, und nach einer halben Stunde wieder gespült.

7.7 Herstellung phasenseparierter grosser Vesikel (GUVs)

Herstellung der Lipidlösungen in Chloroform: Unter Verwendung von Glasphiolen und Glasspritzen werden 20 mol% Cholesterol, 40 mol% Brain Sphingomyelin (bSM), 40 mol% DOPC, 0.1 mol% TR-DHPE gemischt, so dass man als Endkonzentration 2mg/mL erhält, praktischerweise etwa 1-3ml insgesamt.

Von dieser Lösung werden 2 Tropfen auf zwei gereinigten ITO-beschichteten Glasplatten verstrichen und im Vakuumsschrank über Nacht ausgetrocknet. Diese ITOplatten montiert man gegenüber in eine geeignete Probenkammer und befüllt sie mit 300 mOsm sterilisierter und gefilterter Sucroslösung. An die ITOplatten wird für 2h eine Wechselspannung von 1V bei 10 Hz angelegt.

Die so produzierten Riesenvesikel pipettiert man ab und kann sie etwa eine Woche aufbewahren. Im Experiment mischt man die GUVs in Sucroslösung mit ebenfalls 300mOsm Glucoselösung, so dass die Vesikel nicht osmotisch platzen, aber aufgrund ihres höheren spezifischen Gewichtes in der Kammer innerhalb von etwa 30min absinken.

7.8 Elektronenstrahlolithographie zur Herstellung optischer Masken

Als Lack wird Polymethylmethacrylat (PMMA 150k bzw. PMMA 500k) verwendet. Dieses wird zu 4 Gew.-% bzw. 2 Gew.-% in Isopropanol gelöst.

- Lackschleuder: 30 s bei 5000 U/min
- Prebake: 1 Stunde bei 160° im Ofen
- Entwickler: Isobutylmethylketon (MIBK; Merck KGaA, Darmstadt). MIBK wird im Verhältnis 1:3 mit Isopropanol verdünnt
- Entwickeln: 32 s
- Stoppbad: 15 s in Isopropanol
- Trocknen mit Stickstoff

Die belichtete Maske kann mit Chromätze (MicroChemicals GmbH, Ulm) geätzt werden.

7.9 Optische Lithographie zur Vorbereitung der IDT-Strukturen

- Lack: Microposit S1813 (Shipley GmbH, Stuttgart)
- Lackschleuder: 5 s 800 U/min, 30 s 5000 U/min
- Prebake: 30 min/90°C
- Belichten: 22 s
- Entwickeln: 30 s in Entwickler (Microposit E351, 1:5 mit Wasser verdünnt)
- Stoppbad: 15 s in Wasser
- Trocknen mit Stickstoff

Metallisierung zur Herstellung der IDT-Strukturen

- Vorbereitete Substrate in Sauerstoffplasma für 60 s bei 400W behandeln, $P=500\text{mTorr}$
- Elektronenstrahlverdampfen von 10nm Ti (Haftschicht), 50nm Au, 10nm Ti. Aufdampfzeiten $< 0,2\text{nm/s}$
- Zuleitungen mit Al-Folie oder Lack abdecken
- Sputtern der SiO_2 -Schutzschicht, $P = 170\text{W}$, 60 Minuten

7.10 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| AFM | Atomic force microscope, Rasterkraftmikroskop |
| BODIPY | 2-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphate, diammonium salt |
| bp | Base pair, Basenpaar |
| BLM | Black Lipid Membrane |
| BSA | Bovine serum albumine |
| CCD | Charge coupled device |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DHPE | 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt |
| DOTAP | Dioleoyltrimethyl-ammonium-propane |
| DOPC | Dioleoyl-1,2-sn-phosphatidylcholine |
| FCS | Fluorescence Correlation Spectroscopy |
| FRAP | Fluorescence recovery after photobleaching |
| GUV | Giant unilamellar vesicle, Riesenvesikel oder Liposom |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography) |
| IDT | Interdigital Transducer |
| ITO | Indiumzinnoxid |
| λ -DNA | Natürliche DNA extrahiert aus dem Lambdaphagen |
| LD | Long distance |
| L_O | Liquid ordered phase |
| L_D | Liquid disordered phase |
| LSM | Laser Scanning Microscope |
| NA | Numerische Apertur |
| NBD-DOTAP | 1-oleoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-3-trimethylammoniumpropane |
| OG, Oregon Green | 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| QCM | Quartz Crystal Microbalance |
| RIE | Reactive ion etching |
| RFID | Radio-frequency Identification |
| SAW | Surface acoustic wave |
| SLB | Supported Lipid Bilayer |
| SUV | Small unilamellar vesicle |
| TOTO | 1,1'-(4,4,8,8-tetramethyl-4,8-dizaudecamethylene-)bis[4-(3-methyl-2,3-dihydrobenzo-1,3-tiazolyl)-2methylidenequinolinium]tetraiodid |
| TR | Texas Red, Sulforhodamin 101 Sulfonylchlorid |

Literaturverzeichnis

- [1] Erich Sackmann and Rudolf Merkel. *Lehrbuch der Biophysik*. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KG, 2010.
- [2] J. C. Skou. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 23(2):394–401, 1957.
- [3] S. M. Albelda and C. A. Buck. Integrins and other cell-adhesion molecules. *Faseb Journal*, 4(11):2868–2880, 1990.
- [4] V. Gerke and S. E. Moss. Annexins: From structure to function. *Physiological Reviews*, 82(2):331–371, 2002.
- [5] B. Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell, Third Edition*. Garland Publishing, 1994.
- [6] L. J. Pike. The challenge of lipid rafts. *Journal of Lipid Research*, 50:S323–S328, 2009.
- [7] Z. Korade and A. K. Kenworthy. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology*, 55(8):1265–1273, 2008.
- [8] R. L. Auten, R. H. Notter, J. W. Kendig, J. M. Davis, and D. L. Shapiro. Surfactant treatment of full-term newborns with respiratory-failure. *Pediatrics*, 87(1):101–107, 1991.
- [9] E. P. Ingenito, L. Mark, J. Morris, F. F. Espinosa, R. D. Kamm, and M. Johnson. Biophysical characterization and modeling of lung surfactant components. *J Appl Physiol*, 86(5):1702–14, 1999.
- [10] J. Drews. Drug discovery: A historical perspective. *Science*, 287(5460):1960–1964, 2000.
- [11] Y. H. M. Chan and S. G. Boxer. Model membrane systems and their applications. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(6):581–587, 2007.
- [12] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov. Liposome electroformation. *Faraday Discussions*, 81:303–312, 1986.

-
- [13] S. L. Veatch and S. L. Keller. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophysical Journal*, 85(5):3074–3083, 2003.
- [14] E. Sackmann. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science*, 271(5245):43–8, 1996.
- [15] T. Baumgart, S. T. Hess, and W. W. Webb. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*, 425(6960):821–824, 2003.
- [16] U. Seifert, K. Berndl, and R. Lipowsky. Shape transformations of vesicles - phase-diagram for spontaneous-curvature and bilayer-coupling models. *Physical Review A*, 44(2):1182–1202, 1991.
- [17] L. A. Bagatolli. To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1758(10):1541–1556, 2006.
- [18] W. Helfrich. Elastic properties of lipid bilayers - theory and possible experiments. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, C 28(11-1):693–703, 1973.
- [19] E. Evans and W. Rawicz. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Physical Review Letters*, 64(17):2094–2097, 1990.
- [20] R. Lipowsky. The conformation of membranes. *Nature*, 349(6309):475–481, 1991.
- [21] M. Tanaka and E. Sackmann. Polymer-supported membranes as models of the cell surface. *Nature*, 437(7059):656–663, 2005.
- [22] J. Salafsky, J. T. Groves, and S. G. Boxer. Architecture and function of membrane proteins in planar supported bilayers: A study with photosynthetic reaction centers. *Biochemistry*, 35(47):14773–14781, 1996.
- [23] M. B. Hochrein, J. A. Leierseder, L. Golubovic, and J. O. Radler. Dna localization and stretching on periodically microstructured lipid membranes. *Phys Rev Lett*, 96(3):038103, 2006.
- [24] B. Maier and J. O. Radler. Conformation and self-diffusion of single dna molecules confined to two dimensions. *Physical Review Letters*, 82(9):1911–1914, 1999.
- [25] B. Maier and J. O. Radler. Dna on fluid membranes: A model polymer in two dimensions. *Macromolecules*, 33(19):7185–7194, 2000.
- [26] K. Vonklitzing, G. Dorda, and M. Pepper. New method for high-accuracy determination of the fine-structure constant based on quantized hall resistance. *Physical Review Letters*, 45(6):494–497, 1980.

- [27] D. Loss and D. P. DiVincenzo. Quantum computation with quantum dots. *Physical Review A*, 57(1):120–126, 1998.
- [28] K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, and A. A. Firsov. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 306(5696):666–669, 2004.
- [29] M. Egger, F. Ohnesorge, A. L. Weisenhorn, S. P. Heyn, B. Drake, C. B. Prater, S. A. C. Gould, P. K. Hansma, and H. E. Gaub. Wet lipid protein membranes imaged at submolecular resolution by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology*, 103(1):89–94, 1990.
- [30] B. W. Koenig, S. Kruger, W. J. Orts, C. F. Majkrzak, N. F. Berk, J. V. Silverton, and K. Gawrisch. Neutron reflectivity and atomic force microscopy studies of a lipid bilayer in water adsorbed to the surface of a silicon single crystal. *Langmuir*, 12(5):1343–1350, 1996.
- [31] C. Reich, M. R. Horton, B. Krause, A. P. Gast, J. O. Radler, and B. Nickel. Asymmetric structural features in single supported lipid bilayers containing cholesterol and g(m1) resolved with synchrotron x-ray reflectivity. *Biophysical Journal*, 95(2):657–668, 2008.
- [32] E. Kalb, S. Frey, and L. K. Tamm. Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1103(2):307–316, 1992.
- [33] S. Chiantia, J. Ries, and P. Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy in membrane structure elucidation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1788(1):225–233, 2009.
- [34] K. Morigaki, T. Baumgart, U. Jonas, A. Offenhausser, and W. Knoll. Photopolymerization of diacetylene lipid bilayers and its application to the construction of micropatterned biomimetic membranes. *Langmuir*, 18(10):4082–4089, 2002.
- [35] J. T. Groves, N. Ulman, and S. G. Boxer. Micropatterning fluid lipid bilayers on solid supports. *Science*, 275(5300):651–3, 1997.
- [36] B. Sanii, A. M. Smith, R. Butti, A. M. Brozell, and A. N. Parikh. Bending membranes on demand: Fluid phospholipid bilayers on topographically deformable substrates. *Nano Letters*, 8(3):866–871, 2008.
- [37] J. T. Groves, S. G. Boxer, and H. M. McConnell. Electric field-induced critical demixing in lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(3):935–8, 1998.

- [38] P. Jonsson, J. P. Beech, J. O. Tegenfeldt, and F. Hook. Shear-driven motion of supported lipid bilayers in microfluidic channels. *Journal of the American Chemical Society*, 131(14):5294–5297, 2009.
- [39] S. J. Singer and G. L. Nicolson. Fluid mosaic model of structure of cell-membranes. *Science*, 175(4023):720–731, 1972.
- [40] K. Jacobson, O. G. Mouritsen, and R. G. W. Anderson. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nature Cell Biology*, 9(1):7–14, 2007.
- [41] M. O. Jensen and O. G. Mouritsen. Lipids do influence protein function - the hydrophobic matching hypothesis revisited. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1666(1-2):205–226, 2004.
- [42] K. Simons and G. Vanmeer. Lipid sorting in epithelial-cells. *Biochemistry*, 27(17):6197–6202, 1988.
- [43] G. Vereb, J. Szollosi, J. Matko, P. Nagy, T. Farkas, L. Vigh, L. Matyus, T. A. Waldmann, and S. Damjanovich. Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the singer-nicolson model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14):8053–8058, 2003.
- [44] K. Simons and E. Ikonen. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633):569–572, 1997.
- [45] T. Heimburg and A. D. Jackson. On soliton propagation in biomembranes and nerves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28):9790–9795, 2005.
- [46] J. Griesbauer, A. Wixforth, and M. F. Schneider. Wave propagation in lipid monolayers. *Biophysical Journal*, 97(10):2710–2716, 2009.
- [47] J. Gallaher, K. Wodzinska, T. Heimburg, and M. Bier. Ion-channel-like behavior in lipid bilayer membranes at the melting transition. *Physical Review E*, 81(6), 2010.
- [48] Wikipedia, die freie Enzyklopaedie, <http://www.wikipedia.org/>.
- [49] G. M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Y. Jiang, and D. E. Ingber. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3:335–373, 2001.
- [50] D. Lingwood and K. Simons. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961):46–50, 2010.
- [51] E. Gorter and F. Grendel. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *Journal of Experimental Medicine*, 41(4):439–443, 1925.

- [52] J. F. Danielli and H. Davson. A contribution to the theory of permeability of thin films. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 5(4):495–508, 1935.
- [53] M. Bloom Mouritsen, O. G. Møttrup. Mattress model of proteinlipid interactions in membranes. *Biophysical Journal*, 46:141–153, 1984.
- [54] D. M. Engelman. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438(7068):578–580, 2005.
- [55] M. Kuhner, R. Tampe, and E. Sackmann. Lipid monolayer and bilayer supported on polymer-films - composite polymer-lipid films on solid substrates. *Biophysical Journal*, 67(1):217–226, 1994.
- [56] Martin Huth, Samira Hertrich, Gabor Mezo, Emilia Madarasz, and Bert Nickel. Neural stem cell spreading on lipid based artificial cell surfaces, characterized by combined x-ray and neutron reflectometry, 2010.
- [57] J. F. Nagle and S. Tristram-Nagle. Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, 1469(3):159–95, 2000.
- [58] N. Kahya, D. A. Brown, and P. Schwille. Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry*, 44(20):7479–7489, 2005.
- [59] M. Hennig, J. Neumann, A. Wixforth, J. O. Radler, and M. F. Schneider. Dynamic patterns in a supported lipid bilayer driven by standing surface acoustic waves. *Lab Chip*, 9(21):3050–3, 2009.
- [60] R. P. Richter, R. Berat, and A. R. Brisson. Formation of solid-supported lipid bilayers: An integrated view. *Langmuir*, 22(8):3497–3505, 2006.
- [61] A. O. Hohner, M. P. C. David, and J. O. Radler. Controlled solvent-exchange deposition of phospholipid membranes onto solid surfaces. *Biointerphases*, 5(1):1–8, 2010.
- [62] J. O. Radler, I. Koltover, T. Salditt, and C. R. Safinya. Structure of dna-cationic liposome complexes: Dna intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science*, 275(5301):810–814, 1997.
- [63] M. Stelzle, R. Miehlich, and E. Sackmann. 2-dimensional microelectrophoresis in supported lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 63(5):1346–1354, 1992.
- [64] R. Parthasarathy, C. H. Yu, and J. T. Groves. Curvature-modulated phase separation in lipid bilayer membranes. *Langmuir*, 22(11):5095–5099, 2006.

- [65] A. S. Urban, M. Fedoruk, M. R. Horton, J. Radler, F. D. Stefani, and J. Feldmann. Controlled nanometric phase transitions of phospholipid membranes by plasmonic heating of single gold nanoparticles. *Nano Letters*, 9(8):2903–2908, 2009.
- [66] P. Jonsson, J. P. Beech, J. O. Tegenfeldt, and F. Hook. Mechanical behavior of a supported lipid bilayer under external shear forces. *Langmuir*, 25(11):6279–6286, 2009.
- [67] Anders Gunnarsson Peter Jonsson and Fredrik Hook. Accumulation and separation of membrane-bound proteins using hydrodynamic forces. *Analytical Chemistry*, 83(2):604–611, 2011.
- [68] D. J. Olson, J. M. Johnson, P. D. Patel, E. S. G. Shaqfeh, S. G. Boxer, and G. G. Fuller. Electrophoresis of dna adsorbed to a cationic supported bilayer. *Langmuir*, 17(23):7396–7401, 2001.
- [69] V. Kahl, M. Hennig, B. Maier, and J. O. Radler. Conformational dynamics of dna-electrophoresis on cationic membranes. *Electrophoresis*, 30(8):1276–81, 2009.
- [70] M. Krishnan, I. Monch, and P. Schuille. Spontaneous stretching of dna in a two-dimensional nanoslit. *Nano Letters*, 7(5):1270–1275, 2007.
- [71] J. W. Grate, S. J. Martin, and R. M. White. Acoustic-wave microsensors .1. *Analytical Chemistry*, 65(21):A940–A948, 1993.
- [72] R. M. White and F. W. Voltmer. Direct piezoelectric coupling to surface elastic waves. *Applied Physics Letters*, 7(12):314–322, 1965.
- [73] W. Sauer, M. Streibl, T. H. Metzger, A. G. C. Haubrich, S. Manus, A. Wixforth, J. Peisl, A. Mazuelas, J. Hartwig, and J. Baruchel. X-ray imaging and diffraction from surface phonons on gaas. *Applied Physics Letters*, 75(12):1709–1711, 1999.
- [74] Kerstin Laenge, Bastian E. Rapp, and Michael Rapp. Surface acoustic wave biosensors: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(5):1509–1519, 2008.
- [75] T. Frommelt, M. Kostur, M. Wenzel-Schafer, P. Talkner, P. Hanggi, and A. Wixforth. Microfluidic mixing via acoustically driven chaotic advection. *Physical Review Letters*, 100(3), 2008.
- [76] A. Wixforth, C. Strobl, C. Gauer, A. Toegl, J. Scriba, and Z. von Guttenberg. Acoustic manipulation of small droplets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379(7-8):982–991, 2004.
- [77] J. J. Shi, X. L. Mao, D. Ahmed, A. Colletti, and T. J. Huang. Focusing microparticles in a microfluidic channel with standing surface acoustic waves (ssaw). *Lab on a Chip*, 8(2):221–223, 2008.

- [78] T. Franke, S. Braunnmuller, L. Schmid, A. Wixforth, and D. A. Weitz. Surface acoustic wave actuated cell sorting (sawacs). *Lab on a Chip*, 10(6):789–794, 2010.
- [79] S. L. Veatch and S. L. Keller. Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Physical Review Letters*, 94(14), 2005.
- [80] P. W. K. Rothemund. Folding dna to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440(7082):297–302, 2006.
- [81] B. Q. Li, X. H. Fang, H. B. Luo, E. Petersen, Y. S. Seo, V. Samuilov, M. Rafailovich, J. Sokolov, D. Gersappe, and B. Chu. Influence of electric field intensity, ionic strength, and migration distance on the mobility and diffusion in dna surface electrophoresis. *Electrophoresis*, 27(7):1312–1321, 2006.
- [82] M. Doi and S. F. Edwards. *The Theory of Polymer Dynamics*. Clarendon Press, Oxford, 1986.
- [83] J. L. Viovy. Electrophoresis of dna and other polyelectrolytes: Physical mechanisms. *Reviews of Modern Physics*, 72(3):813–872, 2000.
- [84] T. Shinbrot and F. J. Muzzio. Reverse buoyancy in shaken granular beds. *Physical Review Letters*, 81(20):4365–4368, 1998.
- [85] J. Nissen, S. Gritsch, G. Wiegand, and J. O. Radler. Wetting of phospholipid membranes on hydrophilic surfaces - concepts towards self-healing membranes. *European Physical Journal B*, 10(2):335–344, 1999.
- [86] S. Manley, M. R. Horton, S. Lecszynski, and A. P. Gast. Sorting of streptavidin protein coats on phase-separating model membranes. *Biophysical Journal*, 95(5):2301–2307, 2008.
- [87] J. Neumann, M. Hennig, A. Wixforth, S. Manus, J. O. Radler, and M. F. Schneider. Transport, separation, and accumulation of proteins on supported lipid bilayers. *Nano Lett*, 10(8):2903–8, 2010.
- [88] C. Padala R. Cole K. Athmakuri, M. Rohovie and R.S. Kane. Influence of chain length on the diffusion and electrophoresis of dna adsorbed on heterogeneous supported lipid bilayers. *Langmuir*, 26:13393–13398, 2010.
- [89] J. Nissen, K. Jacobs, and J. O. Radler. Interface dynamics of lipid membrane spreading on solid surfaces. *Phys Rev Lett*, 86(9):1904–7, 2001.
- [90] M. Hennig and D. Braun. Convective polymerase chain reaction around micro immersion heater. *Applied Physics Letters*, 87(18), 2005.

- [91] O. I. Wilner, Y. Weizmann, R. Gill, O. Lioubashevski, R. Freeman, and I. Willner. Enzyme cascades activated on topologically programmed dna scaffolds. *Nature Nanotechnology*, 4(4):249–254, 2009.

Name: Josef Martin Paul Hennig
Geboren: 18.3.1981 in München
Nationalität: Deutsch
Familienstand: Verheiratet

2007-2011 **Doktorarbeit** bei Prof. Dr. Joachim O. Rädler (LMU) und Zweitbetreuer Prof. Dr. M.F. Schneider (Boston University) zum Thema „*Dynamische Strukturierung von festkörpergestützten Lipidmembranen und adsorbierten Makromolekülen*“, gefördert durch den Excellence cluster NIM (Nanosystems Initiative Munich)

2007 **Physik-Diplom**, zusätzlich Abschluß des **Schwerpunktstudiums Biophysik** an der LMU, München

2006-2007 **Diplomarbeit** am Lehrstuhl für weiche Materie, Prof. Joachim O. Rädler, Titel: „*Manipulation von DNA und Lipid Rafts auf mikrostrukturierten Lipidmembranen*“

2001-2007 **Physikstudium** an der LMU, München. Schwerpunkte: Biophysik, Astronomie

2000-01 **Wehrdienst** (Grundausbildung in Dillingen a.d. Donau, weitere Verwendung beim Luftwaffenmusikkorps I in Neubiberg als Musiker)

2000 Abitur am Gymnasium Ottobrunn

Wissenschaftliche Publikationen (peer-reviewed)

- Jürgen Neumann*, Martin Hennig*, Achim Wixforth, Stefan Manus, Joachim Rädler, Matthias Schneider
Transport, Separation and Accumulation of Proteins on Supported Lipid Bilayers
Nano Letters, 10, 2903-2908, 2010
- Tobias Stögbauer, Martin Hennig, Joachim O. Rädler
Substrate induced phase separation in giant unilamellar vesicles
Biophysical Reviews and Letters, Vol. 5, No. 3, 1-9, 2010
- Valentin Kahl*, Martin Hennig*, Berenike Maier and Joachim O. Rädler
Conformational Dynamics of DNA-Electrophoresis on Cationic Membranes
Electrophoresis, Vol. 8, 30, 1276-1281, 2009
- Martin Hennig*, Jürgen Neumann*, Achim Wixforth, Joachim Rädler, Matthias Schneider
Dynamic patterns in a supported lipid bilayer driven by surface acoustic waves
Lab on a Chip, 9, 3050-3053, 2009
- Martin Hennig and Dieter Braun
Convective polymerase chain reaction around micro immersion heater
Applied Physics Letters 87, 183901, 2005

* shared first authorship

Danke an alle, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben, besonders

Prof. Joachim Rädler für die gute Betreuung, die große Freiheit, eigene Ideen zu realisieren und das ursprüngliche Projekt wachsen zu lassen, die Unterstützung bei allen meinen Vorhaben wie z.B. dem Aufenthalt in Berkeley

Prof. Matthias Schneider für die erfolgreiche Zusammenarbeit, die mir regelmäßige Besuche in Augsburg und einmal sogar in Boston ermöglichte, sowie für das Mentoring als NIM-Coadvisor

Dr. Jürgen Neumann, ohne den viele Teile dieser Arbeit undenkbar gewesen wären und vor allem weit weniger Freude gemacht hätten

Dr. Babak Sanii who perfectly organized my fruitful visit at the Molecular Foundry, Berkeley National Lab, supporting me with good advice and significantly contributed making this time one of the best periods of my life - thanks Babak! And of course everyone else in Berkeley, especially **Paul Ashby** and my housemates **Deborah** and **Graeme**

Tobias Stögbauer für die gemeinsame Arbeit am Vesikelprojekt, die super anfang und dann doch einige Mühe kostete und die vielen Diskussionen und K-Gänge

Dr. Hanna Engelke für die Arbeit am gemeinsamen Projekt, das leider keine Publikation ergab, die gemeinsame Zeit beim Aufbau der Censband „unCeNSiert“

Manuel Wolff dafür, bei mir so motiviert eine vielversprechende Diplomarbeit angefangen zu haben und mein Projekt weiterzuführen

den lieben Kollegen am Lehrstuhl, besonders meinen Bürokameraden **Sonja, Tobias, Daniel, Judith** und **Simon**, sowie **Margarete** und den **Susis** die immer für uns da sind und den Durchblick behalten, sowie Stephan Manus für Elektroniksupport.

den Bandkollegen von „unCeNSiert“ **Beno, Hubert, Janek, Thomas, Andi, Lorenz, Maren** und **Rainer**

dem **NIM** Exzellenzcluster und dem **DAAD** für funding

dem **Center for Nanoscience**, insbesondere **Marie**, für die vielen Möglichkeiten, sich wissenschaftlich auszutauschen und funding

sowie natürlich meinen **Eltern, Freunden, Musikerkollegen** und ganz besonders meiner lieben Frau **Calliope** mit der ich bereits die letzte Dekade verbringen durfte für einfach alles.