

- [7] a) M. A. Brook, *Silicon in Organic, Organometallic, and Polymer Chemistry*, Wiley, New York, **2000**, S. 27–38; b) J. C. Giordan, J. H. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6541; c) J. C. Giordan, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6544.
- [8] Durch die Reaktion von Dimethylphenylsilyllithium mit 3-Brom-1-octyl-1-cyclobuten wurde eine 58:42-Mischung von **3** und **6** erhalten. **3** und **6** waren durch chromatographische Methoden schwer zu trennen und wurden daher als Mischung verwendet.
- [9] Die Bildung des anderen Stereoisomers wurde nicht beobachtet.
- [10] Bei 110°C fand kein nachweisbarer Umsatz von **1** statt. Die Reaktion von **3** war bei dieser Temperatur langsamer als die von **6** und benötigte 3 Tage bis zum vollständigen Ablauf. **4** und **5** entstanden im Verhältnis 89:11.
- [11] a) E. Gil-Av, J. Shabtai, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 257; b) H. M. Frey, *Trans. Faraday Soc.* **1964**, *60*, 83.
- [12] Die DFT-Rechnungen wurden mit GAUSSIAN 98 Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, **1998** mit einem CRAY-Origin-2000-Computer im Supercomputer Laboratory, Institute for Chemical Research, Kyoto University, durchgeführt. Geometrieoptimierung und Energieberechnungen erfolgten auf B3LYP/6–31G(d)-Niveau.
- [13] S. Niwayama, E. A. Kallel, D. C. Spellmeyer, C. Chimin, K. N. Houk, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2813.
- [14] Inagaki et al. haben ähnliche Resultate für **13** mit DFT-Rechnungen erhalten: H. Ikeda, T. Kato, S. Inagaki, *Org. Lett.*, eingereicht.
- [15] E. W. Colvin, *Silicon Reagents in Organic Synthesis*, Academic Press, London, **1989**.

## Strukturierung festkörpergestützter Lipiddoppelschichten durch lithographische Polymerisation eines Diacetylen-Lipids\*\*

Kenichi Morigaki,\* Tobias Baumgart,  
Andreas Offenhäuser und Wolfgang Knoll

Festkörpergestützte Lipiddoppelschichten sind Membransysteme, bei denen eine Lipiddoppelschicht mit einer Festkörperoberfläche entweder durch physikalische oder durch chemische Wechselwirkung verbunden ist. Diese Systeme wurden intensiv untersucht, da sie unter anderem einfache Modelle biologischer Membranen sind.<sup>[1]</sup> In die Lipiddoppelschicht können auch Proteine eingebaut sein, und sie bietet somit die Möglichkeit, elektrisch oder optisch arbeitende Biosensoren aufzubauen.<sup>[2]</sup> Um die hoch entwickelten Funktionen natürlicher Biomembranen nachzubilden, muss die Komplexität der künstlichen Systeme jedoch noch erhöht werden. Dafür ist die laterale Strukturierung ein gangbarer Weg, da dabei mehrere Komponenten in definierter räum-

licher Anordnung in das Membransystem integriert werden können. Diese Strukturierung wurde bisher entweder durch eine Modifizierung des Trägers<sup>[3]</sup> oder durch die Mikrostempeltechnik<sup>[4]</sup> erzielt.

Wir berichten nun über einen neuen Ansatz zur Erzeugung von strukturierten, festkörpergestützten Doppelschichten. Die Grundidee ist dabei, die Struktur in die Lipiddoppelschicht durch photochemische Polymerisation des Lipids einzuschreiben. Die zweidimensionale Polymerisation von Lipiden wurde intensiv an Liposomen (Lipidvesikeln) untersucht, wobei das Ziel meist die Stabilisierung der Liposome für Anwendungen in der Medikamentenverabreichung war.<sup>[5]</sup> Daneben gab es mehrere Ansätze, polymerisierbare Thiolmonoschichten oder Fettsäure-Multischichten als mögliche Materialien in der Photolithographie einzusetzen.<sup>[6]</sup> Man kann dabei von der lithographischen Polymerisation einer Lipiddoppelschicht zwei Effekte erwarten – eine mechanische Stabilisierung der fluiden Doppelschicht und deren Beschränkung auf den vorgegebenen nichtpolymerisierten Bereich.

Das prinzipielle Vorgehen ist in Abbildung 1 dargestellt. Als Erstes wird eine Doppelschicht aus einem polymerisierbaren Lipid auf den Träger aufgebracht (Abbildung 1A). Diese Doppelschicht wird dann durch UV-Licht polymerisiert, wobei die gewünschte Struktur durch Verwendung einer Maske eingeschrieben werden kann (Abbildung 1B). Bis zu diesem Schritt muss die Doppelschicht unter Wasser gehalten werden, um die Unversehrtheit der Membran zu gewährleisten. Sobald die Doppelschicht polymerisiert ist, wird sie unlöslich in organischen Lösungsmitteln und Detergentien. Durch Waschen mit organischen Lösungsmitteln können die Lipidmonomere gezielt aus der Doppelschicht herausgelöst

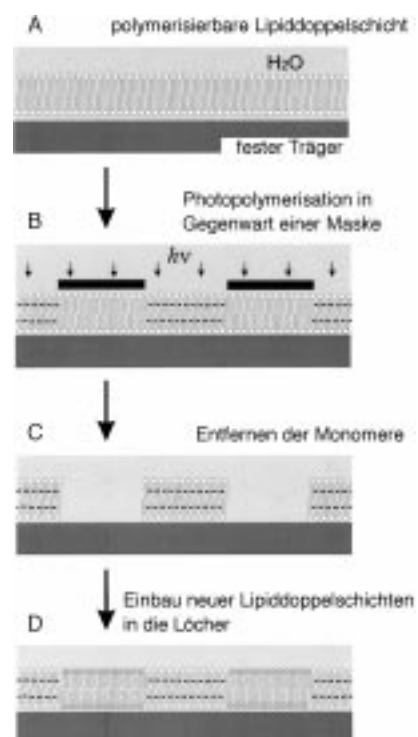


Abbildung 1. Schematische Darstellung zur Strukturierung einer Doppelschicht und zum Einbau einer neuen Lipiddoppelschicht. Für Einzelheiten siehe Text.

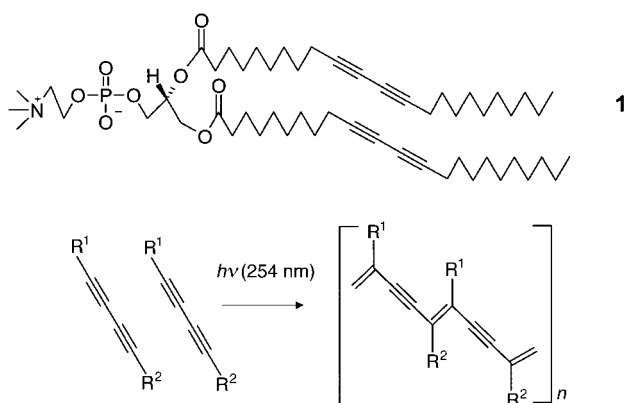
[\*] Dr. K. Morigaki,<sup>[+]</sup> T. Baumgart, Dr. A. Offenhäuser,  
Prof. Dr. W. Knoll  
Max-Planck-Institut für Polymerforschung  
Ackermannweg 10, 55128 Mainz (Deutschland)  
E-mail: morigaki@ifp.mat.ethz.ch, offenhae@mpip-mainz.mpg.de

[+] Neue Anschrift:  
Institut für Polymere  
ETH-Zentrum, 8092 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41)1-632-1073

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch das Ministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) (Projekt-Nr. 0310852), die Schlossmann-Stiftung (K.M.) und das Graduiertenkolleg der Universität Mainz (T.B.) unterstützt. Wir danken A. T. A. Jenkins und U. Jonas für viele hilfreiche Diskussionen sowie B. Menges und M. Kreiter für ihre Unterstützung bei der Photolithographie.

werden, während die polymerisierten Bereiche auf dem Träger verbleiben (Abbildung 1C). Auf diese Weise hergestellte lipidfreie Bereiche (Löcher) können dann mit biologisch relevanten Lipiden durch Vesikelfusion gefüllt werden (Abbildung 1D). Auf hydrophilen Oberflächen wie oxidiertem Silicium bildet sich spontan eine Lipiddoppelschicht aus, wenn Lipidvesikel an der Oberfläche fusionieren und sich dabei umorganisieren.<sup>[7]</sup> Eine solche Lipiddoppelschicht wird durch kolloidale Wechselwirkungen in einem Abstand von etwa 10 Å von der Oberfläche festgehalten<sup>[8]</sup> und kann auf dem dünnen Wasserfilm gleiten. Dies bedeutet, dass die neu eingebaute Doppelschicht in lateraler Richtung fluide ist und damit wichtige Eigenschaften von natürlichen Zellmembranen hat.<sup>[1]</sup>

Als polymerisierbares Lipid wurde das Diacetylen-Phosphatidylcholin **1** eingesetzt, dessen Polymerisationseigenschaften im Detail aus Untersuchungen an Liposomen bekannt sind (Schema 1).<sup>[9]</sup> **1** polymerisiert nur, wenn sich



Schema 1. Das Diacetylen-Phospholipid **1** sowie schematisch seine Polymerisation.

die Moleküle in einem hochgeordneten Zustand befinden (topochemische Polymerisation), wobei jede Alkylkette nur mit der entsprechenden Alkylkette des benachbarten Moleküls reagiert ( $\alpha$  mit  $\alpha$  und  $\beta$  mit  $\beta$ ).<sup>[10]</sup> Damit wird vermieden, dass eine Verknüpfung innerhalb eines Moleküls stattfindet. Da in **1** zwei polymerisierbare Ketten vorhanden sind, bildet es bei der Polymerisation ein Netzwerk und wird in organischen Lösungsmitteln unlöslich.<sup>[11]</sup> Solche vernetzten Polymere reduzieren die laterale Beweglichkeit der monomeren Lipide drastisch.<sup>[12]</sup> Die Bildung des hochkonjugierten Polymerrückgrats führt zu starken Absorptions/Fluoreszenzbanden im UV/Vis-Bereich (Abbildung 2); entsprechend konnten wir die strukturierten, polymeren Doppelschichten fluoreszenzmikroskopisch nachweisen (Abbildung 3).

Um zu zeigen, dass neue Lipiddoppelschichten in die Löcher eingebaut werden können, die durch Auswaschen der monomeren Bestandteile mit Ethanol erzeugt wurden, fusionierten wir kleine, unilamellare Vesikel aus Eigelb-Phosphatidylcholin (egg-PC) darin, die zuvor mit 1 Mol-% des mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Lipids NBD-PE dotiert worden waren. Nun war innerhalb der Pferche wegen der eingebauten Lipiddoppelschicht eine intensive Fluoreszenz zu beobachten (Abbildung 4). Mittels Fluoreszenzbleichtechnik (Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)

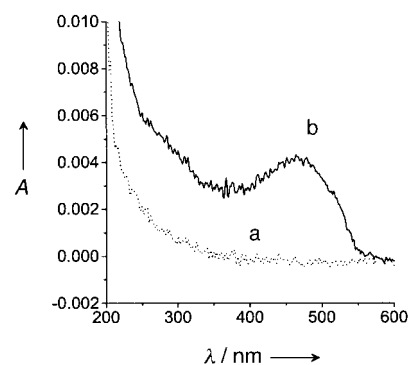


Abbildung 2. UV/Vis-Absorptionsspektren einer Doppelschicht aus **1** auf Quarzglas vor (a) und nach der Photopolymerisation (b).

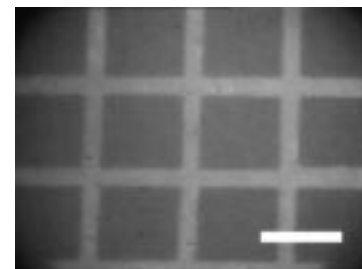


Abbildung 3. Fluoreszenzmikroskopisches Bild der durch UV-Licht in Gegenwart einer Maske polymerisierten Doppelschicht. Die hellen Bereiche (Gitter) entsprechen dem polymerisierten Teil, die dunklen, quadratischen Bereiche (Pferche) dem durch die Maske abgedeckten Teil, in dem die Lipidmoleküle als Monomere erhalten blieben. Die Balkenlänge entspricht 200 µm.

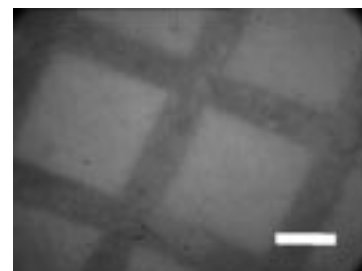


Abbildung 4. Fluoreszenzmikroskopisches Bild der polymerisierten Doppelschicht aus **1**, nachdem die Pferche mit einer egg-PC/NBD-PE-Doppelschicht gefüllt wurden. Der Kontrast ist im Vergleich zu Abbildung 3 invertiert, da die NBD-PE-Moleküle stärker fluoreszieren als die polymerisierte Doppelschicht. Die Balkenlänge entspricht 100 µm.

konnte gezeigt werden, dass diese Doppelschicht fluide ist (Bleichfleck-Durchmesser 4 µm). Weiterhin wurde beobachtet, dass der gesamte Pferch mit der Zeit dunkel wurde, wenn ein größerer Bereich (Durchmesser ca. 200 µm) darin durch kontinuierliche Bestrahlung gebleicht wurde (Abbildung 5). Die NBD-PE-Moleküle im Pferch diffundierten offensichtlich lateral und wurden gebleicht, sobald sie in den Belichtungsstrahl kamen. Die benachbarten Pferche, die durch die polymerisierten Doppelschichten getrennt waren, behielten dagegen ihre Fluoreszenz. Dieses Ergebnis zeigt, dass die polymerisierten Doppelschichten als effiziente Barrieren wirken, die die laterale Bewegung der Lipidmoleküle auf den Bereich des Pferchs beschränken. Wenn man die Probe mit Ethanol wusch, wurde die egg-PC-Doppelschicht wieder komplett entfernt, und die reine Gitterstruktur der poly-

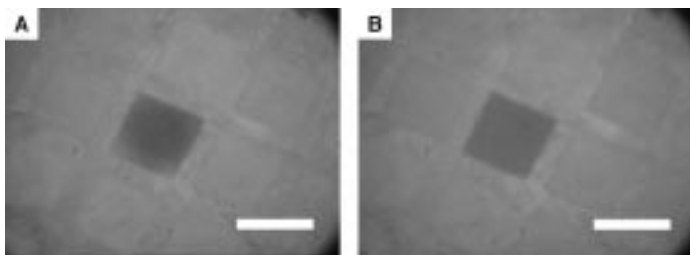


Abbildung 5. Fluoreszenzmikroskopische Bilder der egg-PC/NBD-PE-Doppelschicht in einem einzelnen Pferch, die durch UV-Licht 1 min gebleicht wurde, direkt nach der Belichtung (A) und 20 min nach der Belichtung (B). Der Belichtungsfleck war rund (Durchmesser ca. 200 µm); daher sind in (A) noch Spuren von Fluoreszenz in den Ecken des Pferchs zu beobachten, während sie in (B) aufgrund der lateralen Diffusion der Lipide verschwunden sind. Die Balkenlänge entspricht 200 µm.

merisierten Doppelschicht blieb zurück. Diese polymerisierte Doppelschicht-Struktur konnte wiederholt als zweidimensionales Templat zum Einbau neuer Lipiddoppelschichten genutzt werden. Dabei zeigten die Doppelschichten wieder fluide Eigenschaften und waren jeweils auf den Bereich eines Pferchs beschränkt.

Gegenüber anderen Methoden zur Herstellung von strukturierten, fluiden Lipiddoppelschichten zeichnet sich die vorgestellte Methode dadurch aus, dass die Struktur als polymerisierte Domäne in der Membran eingepägt ist. Diese Tatsache erlaubt eine zweidimensionale Strukturierung unabhängig vom Träger, und man kann sich leicht vorstellen, damit eine strukturierte Doppelschicht aufzubauen, die vom Träger durch eine weiche, quellfähige Polymerschicht separiert ist.<sup>[13]</sup> Solche Polymerschichten wurden als Abstandhalter eingesetzt, um membranständige Proteine in funktionsfähiger Form in die festkörpergestützten Lipiddoppelschichten einzubauen.<sup>[14]</sup> Zudem sollte es möglich sein, die polymerisierte Doppelschicht über eine chemisch reaktive Kopfgruppe kovalent an die darunterliegende Polymerschicht zu binden. Die polymerisierte Lipiddoppelschicht könnte dann zur mechanischen Stabilisierung des Membransystems beitragen, ganz ähnlich wie man es bei Cytoskelett-Transmembranprotein-Verknüpfungen vorfindet.<sup>[15]</sup>

Die hier beschriebene Strukturierung von Doppelschichten durch lithographische Polymerisation sollte neue Möglichkeiten sowohl für Grundlagenuntersuchungen als auch für biomedizinische Anwendungen auf tun. Zu den möglichen Anwendungen gehören der Einbau von funktionell aktiven Membranproteinen,<sup>[16]</sup> die Trennung von Membranproteinen durch zweidimensionale Elektrophorese,<sup>[17]</sup> die Herstellung adressierbarer Arrays modifizierter Lipiddoppelschicht-Membranen für die kombinatorische Chemie<sup>[18]</sup> und die kontrollierte Zellkultur auf maßgeschneiderten Membranoberflächen.<sup>[19]</sup>

## Experimentelles

Materialien: Das Diacetylen-Lipid **1** und egg-PC stammten von Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA. NBD-PE (*N*-(7-Nitrobenz-2-ox-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin) kam von Molecular Probes, Eugene, OR, USA.

Lithographische Polymerisation der Doppelschicht: Eine Doppelschicht aus **1** wurde mit Hilfe der Langmuir-Blodgett(LB)- und Langmuir-

Schäfer(LS)-Techniken von der Luft-Wasser-Grenzfläche auf einen Glas-träger übertragen (Oberflächendruck  $\pi = 35 \text{ mN m}^{-1}$ ). Vor der Polymerisation wurde Sauerstoff aus der wässrigen Lösung durch Spülen mit Argon entfernt. Nach der strukturierten Polymerisation wurde monomeres **1** entfernt, indem die Probe in Ethanol eingetaucht und danach ausgiebig mit MilliQ-Wasser gespült wurde. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder wurden bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm und einer Beobachtungswellenlänge von 530 nm aufgenommen.

Einbau einer neuen Lipiddoppelschicht: Lösungen aus egg-PC/NBD-PE-Vesikeln (1 mM in einem 0.05 M Phosphatpuffer und 0.1 M NaCl (pH 7.0)) wurden über Extrusion durch einen Filter mit Poren von ca. 50 nm Durchmesser hergestellt. 100 bis 200 µL einer solchen Lösung wurden auf die strukturierte Doppelschicht aus **1** aufgebracht und mit einem dünnen Deckglas abgedeckt, um das Verkratzen der Struktur zu vermeiden. Die Proben wurden nach 5 min mit der gleichen Pufferlösung gewaschen.

Eingegangen am 15. Juni 2000 [Z15258]

- [1] E. Sackmann, *Science* **1996**, *271*, 43.
- [2] B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksyvytis, L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek, R. J. Pace, *Nature* **1997**, *387*, 580.
- [3] a) J. T. Groves, N. Ulman, S. G. Boxer, *Science* **1997**, *275*, 651; b) G. Wiegand, T. Jaworek, G. Wegner, E. Sackmann, *Langmuir* **1997**, *13*, 3563.
- [4] a) A. T. A. Jenkins, N. Boden, R. J. Bushby, S. D. Evans, P. F. Knowles, R. E. Miles, S. D. Ogier, H. Schönherr, G. J. Vancso, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5274; b) J. S. Hovis, S. G. Boxer, *Langmuir* **2000**, *16*, 894.
- [5] H. Ringsdorf, B. Schlarb, J. Venzmer, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 117; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 113.
- [6] a) K. C. Chan, T. Kim, J. K. Schoer, R. M. Crooks, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5875; b) A. Barraud, *Thin Solid Films* **1983**, *99*, 317.
- [7] a) A. A. Brian, H. M. McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6159; b) P. Nollert, H. Kiefer, F. Jähnig, *Biophys. J.* **1995**, *69*, 1447; c) J. Rädler, H. Strey, E. Sackmann, *Langmuir* **1995**, *11*, 4539; d) P. S. Cremer, S. G. Boxer, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2554; e) I. Reviakine, A. Brisson, *Langmuir* **2000**, *16*, 1806; f) C. A. Keller, B. Kasemo, *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1397.
- [8] B. W. Koenig, S. Krueger, W. J. Orts, C. F. Majkrzak, N. F. Berk, J. V. Silverton, K. Gawrisch, *Langmuir* **1996**, *12*, 1343.
- [9] a) F. J. Freeman, D. Chapman in *Liposomes as Drug Carriers* (Hrsg.: G. Gregoriadis), Wiley, New York, **1988**, S. 821; b) B. Armitage, D. E. Bennett, H. G. Lamparski, D. F. O'Brien, *Adv. Polym. Sci.* **1996**, *126*, 53.
- [10] E. Lopez, D. F. O'Brien, T. H. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 305.
- [11] J. Leaver, A. Alonso, A. A. Durrani, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *732*, 210.
- [12] E. Sackmann, P. Ettl, C. Fahn, H. Bader, H. Ringsdorf, M. Schollmeier, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 1198.
- [13] In ersten Experimenten konnten wir zeigen, dass Diacetylen-Lipide auch auf Polymerschichten wie Chitosan und Poly(ethylenimin) polymerisierbar sind.
- [14] J. Spinke, J. Yang, H. Wolf, M. Liley, H. Ringsdorf, W. Knoll, *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1667.
- [15] Die Auflösung der Struktur ist theoretisch durch die Lichtbeugung und die Domänenbildung der polymerisierten Doppelschicht begrenzt. Durch den Einsatz der Nahfeldoptik sollte es möglich sein, das Beugungslimit zu unterschreiten, so dass die Auflösung nur noch durch die Größe der Doppelschicht-Domänen begrenzt sein sollte, in denen sich die Polymerisation lateral ausbreitet.
- [16] S. Heyse, O. P. Ernst, Z. Dienes, K. P. Hofmann, H. Vogel, *Biochemistry* **1998**, *37*, 507.
- [17] M. Stelzle, R. Miehl, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1992**, *63*, 1346.
- [18] P. S. Cremer, T. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8130.
- [19] Y. Dori, H. Bianco-Peled, S. K. Satija, G. B. Fields, J. B. McCarthy, M. Tirrell, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50*, 75.