

Monolagen-Spezifische Struktur und Dynamik von Oberflächen- und Polymer-Gestützten Lipiddoppelschichten

Narain Karedla, Falk Schneider, Jörg Enderlein,* und Tao Chen*

Kurzzusammenfassung: Polymergestützte oder polymergekoppelte (polymer tethered) Lipid-Doppelschichten dienen als vielseitige Modellsysteme für die Struktur und Dynamik von Plasmamembranen, doch der Einfluss der Polymerkopplung auf die Eigenschaften der Lipid-Doppelschichten blieb bisher weitgehend unberücksichtigt. In dieser Studie stellen wir eine neuartige Methodik vor, nämlich eine Kombination aus Graphen-induziertem Energietransfer (GIET) mit Line-Scan-Fluoreszenz-Lebensdauer-Korrelationspektroskopie (lsFLCS), um die strukturellen und dynamischen Eigenschaften von Lipid-Doppelschichten zu untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Polymerkopplung sowohl die strukturellen Parameter, wie die Membranhöhe über dem Substrat und die Membrandicke, als auch die dynamischen Eigenschaften, einschließlich monolagen-spezifischer Diffusionskoeffizienten und der Kopplung zwischen den Monolagen, erheblich beeinflussen. Diese Erkenntnisse verdeutlichen das komplexe Zusammenspiel zwischen Polymerunterlage und Lipid-Doppelschicht. Mit der Messung der monolagen-spezifischen Diffusion und des Abstandes der beiden Monolagen vom Substrat demonstriert diese Studie das Potenzial von GIET-lsFLCS für die Untersuchung von Membrandynamik und -struktur. Diese Erkenntnisse sind wichtig für ein besseres Verständnis und die Anwendung polymergekoppelter Membrane in verschiedenen Forschungsbereichen.

Einleitung

Biomembranen sind zusammengesetzt aus einer Vielzahl essenzieller Proteine und Lipide, die für zelluläre Funktionen von entscheidender Bedeutung sind. Die komplexe Zusammensetzung sowie die intrinsisch aktive, nicht im Gleichgewicht befindliche Natur nativer Plasmamembranen – angetrieben durch energieabhängige Prozesse wie Lipidrekrutierung, aktiven Transport und Restrukturierung des Zytoskeletts – stellen jedoch erhebliche Herausforderungen bei der Isolierung und Untersuchung ihrer einzelnen Komponenten dar. Gestützte Lipiddoppelschichten (Supported Lipid Bilayers, SLBs) bieten eine wertvolle Bottom-up-Alternative, da sie die Herstellung vereinfachter Membranmodelle ermöglichen, die mittels einer Vielzahl oberflächensensitiver Techniken untersucht werden können.^[1] Zu diesen Techniken

zählen Neutronenreflektometrie (NR),^[2,3] Rasterkraftmikroskopie (AFM),^[4–6] Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR),^[4,7,8] elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)^[9–11] und Fluoreszenzmikroskopie.^[12–18] Aufgrund ihrer Vielseitigkeit haben sich SLBs als biomimetische Modellsysteme in einem breiten Spektrum biophysikalischer und biologischer Studien etabliert. Sie sind unverzichtbare Werkzeuge zur Erforschung der Selbstorganisation und Dynamik von Lipiden und Proteinen und liefern entscheidende Einblicke in die damit verbundenen komplexen biologischen Prozesse.

SLBs bestehen aus zwei eng gekoppelten Monolagen (Leaflets): die proximale Monolage, welche der festen Unterlage zugewandt ist, und die distale Monolage auf der gegenüberliegenden Seite. Die proximale Monolage ist durch eine 1–2 nm dicke Hydratationsschicht von der Substratoberfläche getrennt. Diese Schicht wirkt als eine Art

[*] N. Karedla, J. Enderlein, T. Chen
Third Institute of Physics – Biophysics, Georg August University,
Friedrich-Hund-Platz 1, 37077 Göttingen, Germany
E-mail: jenderl@gwdg.de
tao.chen@phys.uni-goettingen.de

N. Karedla
The Rosalind Franklin Institute, Harwell Campus, Didcot OX11 0FA,
United Kingdom

N. Karedla
Kennedy Institute of Rheumatology, University of Oxford, Roosevelt
Drive, Oxford OX3 7LF, United Kingdom

F. Schneider
Translational Imaging Center, University of Southern California, Los
Angeles, California 90089, United States of America

F. Schneider
Biomedical Sciences, Warwick Medical School, University of
Warwick, Coventry CV4 7AL, United Kingdom

J. Enderlein
Cluster of Excellence “Multiscale Bioimaging: from Molecular
Machines to Networks of Excitable Cells” (MBExC),
Universitätsmedizin Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075
Göttingen, Germany

Additional supporting information can be found online in the
Supporting Information section

© 2025 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von
Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den
Bedingungen der [Creative Commons Attribution License](#), die jede
Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der
ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

Gleitmittel und garantiert, dass die Lipide in einer fluiden Phase verbleiben.^[19] Neuere experimentelle Untersuchungen mit fluoreszent markierten Lipiden deuten jedoch darauf hin, dass ein kleiner Lipid-Anteil im SLB transient an das Substrat adsorbiert,^[20] was für eine korrekte Beschreibung der Lipid-Dynamik in einem SLB berücksichtigt werden muss.^[1,20,21]

Andererseits wird die distale Monolage durch die Wechselwirkung mit der proximalen Monolage beeinflusst – ein wichtiger Faktor, der die Gesamtstruktur und Dynamik einer Lipiddoppelschicht bestimmt.^[15,22–24] Die unmittelbare Nähe einer Lipiddoppelschicht zum festen Substrat erschwert darüber hinaus die Untersuchung von in SLBs integrierten Membranproteinen. Unerwünschte Wechselwirkungen mit dem Substrat können die Funktion von Proteinen beeinträchtigen und in einigen Fällen sogar zu deren Denaturierung führen.^[1,25,26]

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, nutzen viele Studien ein weiches Polymer-“Kissen” zwischen der Membran und dem festen Substrat, wodurch polymer-gestützte Lipiddoppelschichten (p-SLBs) entstehen. Die Polymerschicht vergrößert den Abstand zwischen der proximalen Monolage und dem Substrat, reduziert unerwünschte Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen und Substrat und schafft damit annähernd physiologische Umgebungsbedingungen. Durch die Herstellung einer flexiblen, hydratisierten Umgebung verbessert das Polymerkissen die Mobilität von Membranproteinen und Lipiden, bewahrt deren strukturelle Integrität und Funktionalität und ermöglicht die Untersuchung von membranintegrierten und membranassoziierten Proteinen unter Bedingungen, die ihrer natürlichen biologischen Umgebung nahekommen.^[1,2,25,27]

Während Polymerkissen die Funktionalität von SLBs verbessern, indem sie direkte Wechselwirkungen mit dem Substrat minimieren, können sie auch unerwartete Veränderungen der Dicke und der strukturellen Integrität einer Lipiddoppelschicht zur Folge haben, da Polymerketten in die Doppelschicht eingebettet werden.^[28–30] Solche durch Polymerkissen induzierte Änderungen der Doppelschichtdicke sind von besonderem Interesse, da die optimale Funktion und Positionierung vieler Membranproteine von der korrekten Anordnung ihres hydrophoben Kerns in der hydrophoben Region der Lipiddoppelschicht abhängt.^[31–33] Daher ist eine genaue Bestimmung der strukturellen und monolagen-spezifischen dynamischen Eigenschaften von SLBs, insbesondere in Gegenwart einer Polymerschicht, entscheidend für die Untersuchung von Membranproteinen und biomimetischer Modellmembranen. Dabei ist eine simultane Erfassung dieser Eigenschaften in einer einzigen Messung wichtig für ein umfassendes Verständnis des Verhaltens von SLBs und dessen Auswirkungen auf die Funktionalität von Membranproteinen.

Obwohl in der Vergangenheit eine Vielzahl von Techniken für die Untersuchung der strukturellen Eigenschaften von SLBs zur Anwendung kamen, wie zum Beispiel röntgenbasierte Methoden,^[34] Reflektometrie oder Neutronenreflexion (NR),^[35,36] oder kontaktbasierte Verfahren wie die Rasterkraftmikroskopie (AFM),^[37] gibt es bisher nur wenige Methoden für die monolagen-spezifische Untersu-

chung der SLB-Dynamik. Die für die Untersuchung dynamischer Eigenschaften von SLBs routinemäßig verwendete Methoden wie Einzelpartikel-Tracking,^[15,38] Fluoreszenz-korrelationspektroskopie (FCS),^[16,39] oder zweidimensionale Fluoreszenz-Lebenszeit-Korrelationspektroskopie (2D FLCS)^[40] weisen verschiedene methodenspezifische Einschränkungen auf. So ist beispielsweise das Einzelpartikel-Tracking für die Messung schneller Diffusion in Doppel- oder Monoschichten nur bedingt geeignet, da dieses Verfahren nur schwer schnell diffundierenden Lipiden folgen kann.^[17] FCS und 2D FLCS können, zusammen mit selektiver Fluoreszenz-Löschung in der distalen Monolage durch Zugabe dynamischer Quencher in der darüber befindlichen Lösung, monolagen-spezifische Dynamiken erfassen.^[40] Allerdings erfordert diese Methode millimolare Konzentrationen von Quenchern, die die chemische Umgebung der Lipide verändern und potenziell das Membranverhalten beeinflussen. Darüber hinaus liefern diese dynamischen Messungen in der Regel keine strukturellen Informationen, wodurch ein ganzheitliches Verständnis von SLB-Systemen eingeschränkt ist.

In der hier vorliegenden Arbeit stellen wir eine neue Untersuchungsmethode, die Kombination aus Graphen-induziertem Energietransfer (GIET) mit Line-Scan-Fluoreszenz-Lebenszeit-Korrelationspektroskopie (lsFLCS), vor. Diese Kombination ermöglicht die simultane Messung struktureller und dynamischer Eigenschaften in polymer-gestützten Lipiddoppelschichten (p-SLBs) und überwindet damit bisherige Einschränkungen existierender Methoden.

In früheren Arbeiten konnten wir zeigen, dass GIET die Dicke eines SLB sowie die der Hydratationsschicht in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung mit Ängström-Genauigkeit messen kann.^[19,41,42] In einer weiteren aktuellen Studie hatten wir GIET mit FCS kombiniert, um Fluktuationen von Modell- und Organellmembranen mit einer räumlichen Auflösung von Nanometern und einer zeitlichen Auflösung von Millisekunden quantitativ zu messen.^[43] In einer anderen Arbeit wurde die Fluoreszenz-Lebenszeit-Korrelationspektroskopie (FLCS) genutzt, um schnelle Konformationsänderungen in einem fluoreszenten Protein zu messen, nämlich die Rotationsisomerisierung einer Aminosäure in direkter Nähe zum Chromophor des Proteins.^[44,45]

In der vorliegenden Arbeit erweitern wir diese Methoden durch die Kombination mit lsFLCS, was – im Gegensatz zur Punktanregung in FCS und 2D FLCS – eine präzise und kalibrationsfreie Bestimmung der monolagen-spezifischen Lipiddiffusion in statistisch relevanter Weise ermöglicht. Dies wird durch wiederholtes lineares Scannen des Anregungsfokus erreicht, wodurch lsFLCS Diffusionsprozesse über eine größere Fläche messen kann und damit die Datenstatistik verbessert wird. Darüber hinaus erlaubt das genaue und kontrollierte Linien-Scannen eine exakte Bestimmung der Größe des Anregungsfokus, ohne dass zusätzliche Kalibrierungsmessungen wie bei herkömmlichem Punkt-FCS erforderlich sind.

Zuerst validierten wir unser GIET-lsFLCS-Verfahren mit Messungen an Lipiddoppelschichten auf einem festen Substrat (s-SLBs) ohne Polymerunterstützung. Die kombinierte

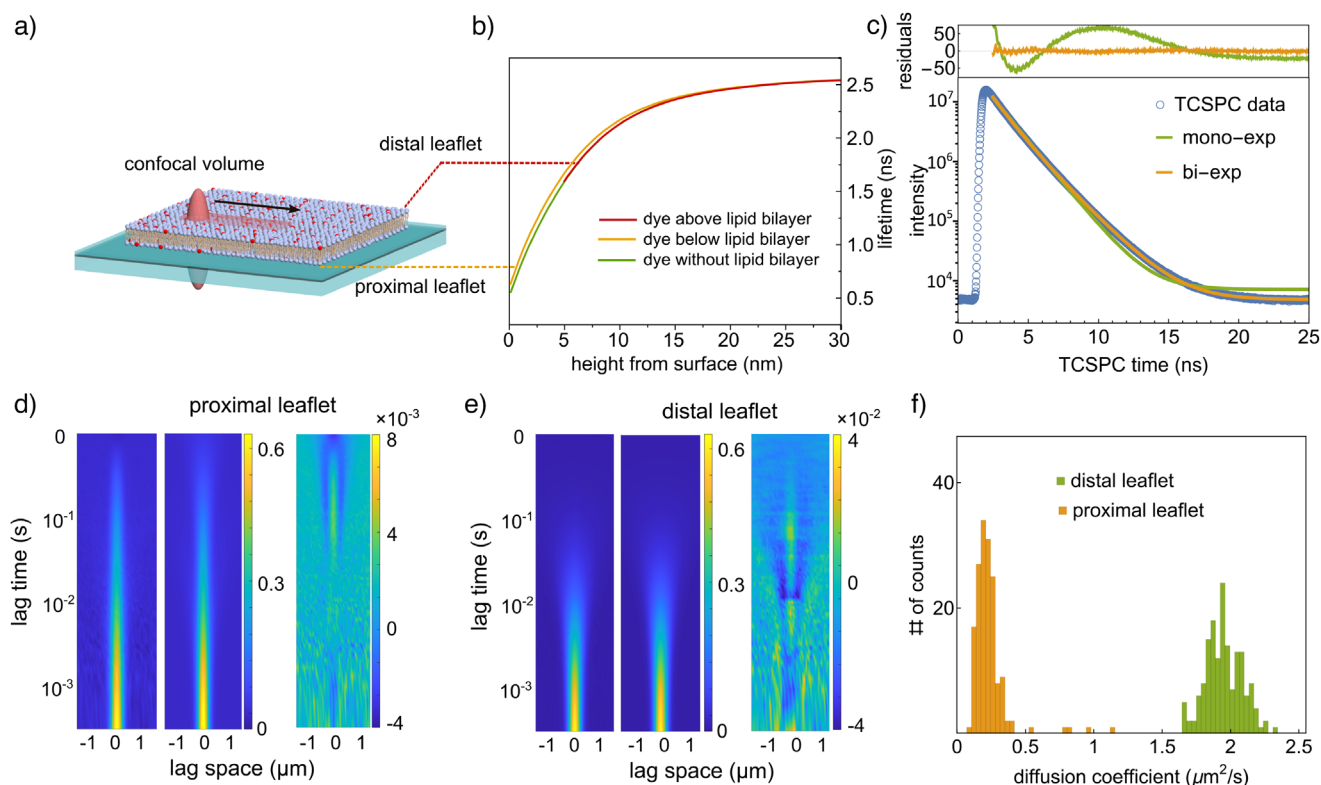


Abbildung 1. GIET-IsFLCS-Messung an einem SLB zur Bestimmung der Doppelschichtdicke und monolagen-spezifischen Diffusion. a) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus, die die Positionierung des s-SLB auf einem Graphen-Substrat mit einer 10 nm dicken Silica-Schicht veranschaulicht. Die Grafik zeigt das lineare und wiederholte Scannens des konfokalen Volumens mit konstanter Geschwindigkeit über die Membran. b) Fluoreszenzabklingkurve von Atto655-DPPE im SLB, aufgetragen in Abhängigkeit von der Entfernung von der Oberfläche. Die Berechnung gilt für einen einzelnen Emittor mit einer Emissionswellenlänge von 680 nm, einer Lebensdauer von 2.6 ns und einer Quantenausbeute von 0.36. c) Gemessene Fluoreszenzlebenszeitkurve für einen fluoreszenzmarkierten SLB auf einem Graphen-Substrat. Die Daten wurden mit monoexponentiellen (grün) und biexponentiellen (braun) Zerfallsmodellen gefittet, wobei das obere Bild die Fit-Residuen zeigt. d) Berechnete Autokorrelationsfunktion für die proximale Monolage (links) mit dem entsprechenden Fit (Mitte) und den Residuen (rechts). e) Analoges Ergebnis für die distale Monolage mit der gleichen Bedeutung wie in (d). f) Histogramme der Diffusionskoeffizienten für die proximale und distale Monolage des SLBs ($N = 161$ für jedes Histogramm). Alle Werte wurden durch abschnittsweise Berechnung der Autokorrelationsfunktionen bestimmt und zeigen die unterschiedlichen Diffusionsdynamiken in den beiden Monolagen.

GIET-IsFLCS-Technik ermöglichte dabei die simultane Bestimmung wichtiger Parameter wie den Abstand der Doppelschicht vom Substrat, die Dicke der Doppelschicht, sowie die monolagen-spezifischen Diffusionskoeffizienten. Diese erste Validierung bildete die Grundlage für unsere folgenden Untersuchungen von polymer-gestützten Lipiddoppelschichten (p-SLBs). Dabei konzentrierten wir uns auf drei häufig verwendete Polyethylenglykol-(PEG)-basierte SLBs, welche unterschiedliche Strategien nutzen, um die Lipiddoppelschichten entweder über die PEG-Ketten direkt an die Oberfläche zu verankern oder diese über einem Polymerkissen zu stabilisieren.

Wir verwendeten unsere Methode, um die Struktur und Dynamik solcher PEG-gestützten Lipiddoppelschichten umfassend zu untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigen den Einfluss der PEG-Ketten auf die strukturellen Eigenschaften der Doppelschicht sowie auf das Diffusionsverhalten der einzelnen Monolagen. Dadurch werden wertvolle Einblicke in das Zusammenspiel zwischen PEG-Ketten und Lipiddoppelschichten geliefert, was zu einem besseren Verständnis

der strukturellen und dynamischen Eigenschaften dieser komplexen Systeme beiträgt.

Ergebnisse und Diskussion

Der experimentelle Aufbau zur Durchführung von GIET- und IsFLCS-Messungen an SLBs ist in Abbildung 1a dargestellt. Zur Validierung der Methode haben wir sie zunächst auf eine Lipiddoppelschicht auf einem festen Substrat (s-SLB) ohne Polymerunterstützung angewendet. Dieser s-SLB bestand aus reinem Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC), gemischt mit einer geringen Konzentration von 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin (DPPE-Atto655) als Lipide, deren Kopfgruppen fluoreszenzmarkiert sind. Der SLB wurde mittels Vesikelfusion auf einem GIET-Substrat präpariert, welches seinerseits aus einer mit einer 10 nm dicken Silicaschicht überschichteten Graphenschicht auf einem Standard-Deckglas besteht.

Für unsere Experimente verwendeten wir ein konfokales Laserscanning-Mikroskop mit einer schnellen Galvo-Scan-Einheit, gepulsten Lasern und einer Elektronik zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (Time-Correlated Single Photon Counting bzw. TCSPC). Für Messungen wurde der Laser-Anregungsfokus wiederholt mit einer konstanten Geschwindigkeit von 0.02 m/s entlang einer Linie über den SLB auf dem GIET-Substrat gescannt (Pfadlänge: 5 μm). Die TCSPC-Einheit registrierte dabei die zeitliche Verzögerung der detektierten Fluoreszenzphotonen relativ zu den Laser-Anregungspulsen.

Die Graphenschicht ($\sim 0.5 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$, Abbildung S1 und Abbildung S2), die zwischen einem Standard-Deckgläschen und einer dünnen Silica-Schicht von 5 nm oder 10 nm eingebettet ist, löscht graduell die Fluoreszenz benachbarter Farbstoffmoleküle. Diese Fluoreszenzlöschung, sowohl in Intensität als auch in Lebensdauer, wird durch den Energietransfer vom angeregten Zustand des Fluorophors zu Elektron-Loch-Paaren im Graphen verursacht und ist stark abstandsabhängig.^[19,41,42] Die Nahfeldkoppelung zwischen einem fluoreszierenden Farbstoffmolekül und dem GIET-Substrat kann mit einem semi-klassischen elektrodynamischen Modell berechnet werden, welches bereits in früheren Studien beschrieben und validiert wurde.^[46–48] Innerhalb des SLBs ist die Fluoreszenzlebensdauer von Farbstoffen an Lipidkopfgruppen in der proximalen Monolage – die sich also näher am Graphen befinden – deutlich kürzer als die von Farbstoffen an Lipidkopfgruppen in der distalen Monolage, welche weiter vom Graphen entfernt sind.^[41,42]

Wir berechneten die distanzabhängigen Fluoreszenzlebensdauern der Farbstoffmoleküle in der unteren und oberen Monolage, indem wir den Brechungsindex aller Medien und der Lipiddoppelschicht, die Dicke und Brechungsindizes des geschichteten GIET-Substrats, sowie die Quantenausbeute und das Emissionsspektrum der Farbstoffmoleküle berücksichtigten. Dabei nahmen wir an, dass die Doppelschicht als ein 5 nm dickes dielektrisches Material mit einem Brechungsindex von 1.46^[49] behandelt werden kann. Die damit berechnete Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von Farbstoffmolekülen in der proximalen und distalen Monolage als Funktion der Entfernung von der Oberfläche wird als GIET-Kalibrationskurve bezeichnet.

Abbildung 1b zeigt die für DPPE-Atto655 berechnete GIET-Kalibrationskurve, welche in den SLB-Experimenten dieser Studie verwendet wurde. In einem s-SLB auf einem reinen Glas-Substrat hat der Farbstoff Atto655 eine monoexponentielle Fluoreszenzlebensdauer von 2.6 ns und eine Quantenausbeute von 0.36 (Abbildung S3).^[41] Die Orientierung des Emissions-Übergangsdipols des Farbstoffs wurde – basierend auf früheren Messungen – als parallel zum SLB angenommen.^[19,41]

Das modellierte GIET-Substrat besteht aus einer auf Glas aufgetragenen Graphenschicht mit einer Dicke von 0.34 nm und einem Brechungsindex von $2.77 + 1.41i$ (bei einer Emissionswellenlänge von 680 nm) und einer darüber befindlichen 5 nm dicken Silicaschicht (Brechungsindex = 1.46). Der darüberliegende Halbraum wurde als aus Wasser bestehend angenommen (Brechungsindex = 1.33). Zur Vereinfachung

der Berechnung der GIET-Kalibrationskurven nahmen wir an, dass ein SLB eine Dicke von 5 nm hat, was näherungsweise seiner tatsächlichen Dicke entspricht. Abweichungen von $\pm 1 \text{ nm}$ in der tatsächlichen Dicke führen zu Lebensdaueränderungen von weniger als 0.2 %, was im Vergleich zur experimentellen Messgenauigkeit vernachlässigbar ist und daher ignoriert werden kann.

Aus den Linescan-Messungen wurden TCSPC-Histogramme berechnet und mit einer biexponentiellen Zerfallskurve gefittet, wie in Abbildung 1c gezeigt. Für die statistische Analyse teilten wir die in jeder Messung registrierten Photonen (mit mehr als 10^9 Photonen pro Probe) in kleinere Datensätze von jeweils 10^7 Photonen auf. Aus diesen Datensätzen berechneten wir TCSPC-Kurven und fitteten sie mit einem biexponentiellen Zerfallsmodell, um separate Lebensdauerwerte für jede Monolage zu erhalten (siehe Abbildung S4 und Abbildung S5 in den Supporting Information).

Die gefitteten Werte für die Fluoreszenzlebensdauern betragen $\tau_p = 0.99 \pm 0.1 \text{ ns}$ und $\tau_d = 1.83 \pm 0.2 \text{ ns}$ und entsprechen den Fluoreszenzlebensdauern von Farbstoffen in der proximalen und distalen Monolage. Die kürzeren Lebensdauern der Farbstoffe in der proximalen Monolage resultieren aus deren größeren Nähe zur Graphenschicht. Mithilfe der GIET-Kalibrationskurve wurden diese Lebensdauerwerte in Höhenwerte umgewandelt. Basierend auf den Fluoreszenzlebensdauern schätzten wir die Dicke des s-SLB auf $5.0 \pm 0.08 \text{ nm}$ und die Dicke der darunterliegenden Hydratationsschicht auf $1.3 \pm 0.3 \text{ nm}$, was mit früheren Rasterkraftmikroskopie-Messungen übereinstimmt, welche einen Kopfgruppe-zu-Kopfgruppe-Abstand von $4.6 \pm 0.2 \text{ nm}$ ergaben.^[50] Es sei darauf hingewiesen, dass die hier bestimmte Doppelschichtdicke die Entfernung zwischen den Farbstoffpositionen in der proximalen und distalen Monolage darstellt. Diese Distanz ist größer als der Kopfgruppe-zu-Kopfgruppe-Abstand, da sowohl die endliche Linkerlänge als auch die Größe der Farbstoffmoleküle berücksichtigt werden müssen.

Anschließend wurden die beiden monoexponentiellen Komponenten der biexponentiellen Fluoreszenzabklingkurven genutzt, um Filterfunktionen zur Berechnung von lebensdauerspezifischen raum-zeitlichen Fluoreszenz-Korrelationskarten zu erhalten (siehe Abbildung S6 in der Supporting Information), wie in Abbildung 1d dargestellt und in der Supporting Information näher erläutert. Kurz gesagt bilden diese Filterfunktionen eine orthonormale Basis für Fluoreszenz-Zerfallsmuster: Werden sie Bin für Bin mit den Fluoreszenzabklingkurven multipliziert und dann aufsummiert, ist das Ergebnis entweder Eins oder Null – abhängig davon, ob die Filterfunktion zum gegebenen Fluoreszenzzerfall korrespondiert oder nicht.^[45] Werden diese Filterfunktionen vor der Berechnung der Korrelationsfunktionen auf die TCSPC-Bins der registrierten Photonen angewendet, resultieren daraus zwei unterschiedliche raum-zeitliche Autokorrelationsfunktionen $g_{ii}(x, t)$ – eine für jede Lebensdauersignatur $ii = 1, 2$ (siehe Experimental Methods, Gl. 3, Supporting Information).

In Abbildung 1d,e zeigt die x -Achse die räumliche Korrelationsvariable, während die y -Achse die diskrete

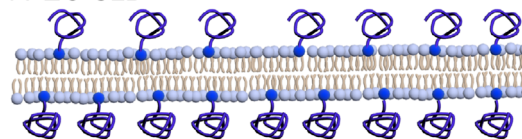
Korrelationszeit t angibt. Die raum-zeitlichen Autokorrelationsfunktionen beschreiben die Wahrscheinlichkeit, ein Photon von einem Molekül an der Position x zum Zeitpunkt t zu detektieren, wenn zuvor ein Photon desselben Moleküls an der Position $x = 0$ und zur Zeit $t = 0$ registriert wurde. Die Abhängigkeit dieser Autokorrelationsfunktionen (Abbildung 1d,e) von der räumlichen Korrelationsvariablen x wird durch die Größe und Form des Anregungsfokus bestimmt, während der Zerfall und die Verbreiterung der zeitlichen Korrelation mit der Zeit t durch die laterale Diffusion der Moleküle bestimmt wird. Wie aus Abbildung 1e ersichtlich, zerfällt die Autokorrelationsfunktion der längeren Fluoreszenzlebensdauer (bei räumlichem Versatz = 0) signifikant schneller als die Autokorrelationsfunktion der kürzeren Fluoreszenzlebensdauer. Dies deutet auf einen langsameren Diffusionskoeffizienten der Lipide in der proximalen Monolage hin.

Der Fit jeder Autokorrelationsfunktion mit einem zwei-dimensionalen Scan-und-Diffusionsmodell ermöglichte die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten für beide Monolagen (Abbildung 1d,e).^[51] Diese Analyse liefert wertvolle Einblicke in das unterschiedliche Diffusionsverhalten in der proximalen und distalen Monolage in einer gestützten Lipiddoppelschicht. Wir wandten die gleiche wie oben beschriebene statistische Methode an, um raum-zeitliche Korrelationskarten aus Photonensätzen mit jeweils 10^7 Photonen zu generieren. Der Diffusionskoeffizient der markierten Lipide in der distalen Monolage wurde zu $1.95 \pm 0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bestimmt, was mehr als achtmal schneller ist als der Wert in der proximalen Monolage, welcher zu $0.23 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ gemessen wurde (Abbildung 1f). Dieser signifikante Unterschied in den Diffusionskoeffizienten verdeutlicht die unterschiedlichen mobilen Eigenschaften der Lipidmoleküle in den einzelnen Monolagen und unterstreicht den erheblichen Einfluss der Substratwechselwirkung auf die proximale Monolage. Diese Wechselwirkungen behindern die Lipiddiffusion in der proximalen Monolage erheblich, im Unterschied zur distalen Monolage.

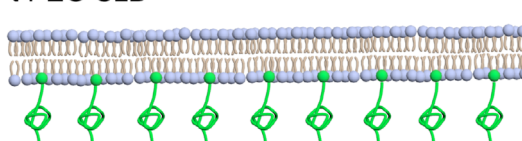
Nachdem wir erfolgreich zeigen konnten, dass GIET-IsFLCS zur simultanen Messung der Doppelschichtdicke und monolagen-spezifischen Diffusion in s-SLBs verwendet werden kann, nutzten wir unsere Methode als nächstes zur Untersuchung verschiedener p-SLB-Systeme. Unsere Untersuchungen konzentrierten sich dabei auf drei bereits in früheren Studien umfangreich verwendete Arten von PEG-modifizierten Lipiddoppelschichten:^[1,25,27]

1. Lipid-PEGylierte gestützte Lipiddoppelschicht (l-PEG-SLB) (Abbildung 2a):^[52–54] Dieses System wurde durch die Fusion von PEGylierten Liposomen auf einem GIET-Substrat erzeugt. Die Liposomen bestanden aus DOPC und einem Anteil von 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin-N-[methoxy(polyethylenglykol)-2000] (PEG2000-PE), wobei die linearen PEG-Ketten direkt an die Lipidkopfgruppen gebunden sind. Dadurch bildet sich eine PEG-Schicht unter der Membran, ohne dass die einzelnen PEG-Ketten kovalent an das Substrat gebunden sind. Wir analysierten l-PEG-SLBs mit unterschiedlichen Anteilen an PEG2000-PE, um zu untersuchen, wie die PEG-Dichte die Membraneigenschaften beeinflusst.

a) l-PEG-SLB



b) t-PEG-SLB



c) PEG-c-SLB

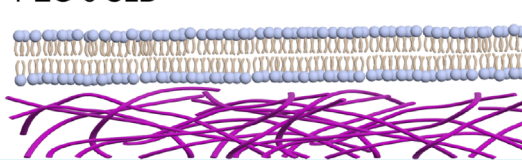


Abbildung 2. Schema der drei untersuchten Arten von p-SLBs. a) l-PEG-SLB. b) t-PEG-SLB. c) PEG-c-SLB.

2. Tethered-PEGylierte gestützte Lipiddoppelschicht (t-PEG-SLB) (Abbildung 2b): In diesem System wurden die PEG-Ketten über NH_2 -PEG2000-PE kovalent an die Silica-Oberfläche auf dem GIET-Substrat gebunden. Im Gegensatz zur l-PEG-SLB sind die terminalen Aminogruppen der PEG-Ketten in der t-PEG-SLB chemisch an die Oberfläche gebunden,^[55,56] was eine stabilere Verankerung garantiert aber potenziell das Membranverhalten verändert.

3. PEG-gepolsterte Lipiddoppelschicht (PEG-c-SLB) (Abbildung 2c):^[13] Diese Doppelschicht wurde durch Ablagerung von Lipidvesikeln auf einem GIET-Substrat erzeugt, welches vorher mit einer PEG-Bürste (PEG-Brush) modifiziert wurde. Diese Bürste wurde durch kovalente Anbindung eines Endes von aminfunktionalisierten PEG(2000)-Polymeren an das Substrat hergestellt, wobei das andere Ende mit Palmitinsäureresten verkoppelt wurde. Diese Anordnung schafft eine weiche, gepolsterte Zwischenschicht zwischen der Doppelschicht und dem Substrat, wodurch direkte Lipid-Substrat-Wechselwirkungen reduziert werden.

Es ist wichtig anzumerken, dass für alle drei SLB-Systeme PEG-Ketten mit identischen Molekulargewichten ($\text{MW} = 2000$) verwendet wurden. Unsere Untersuchung zielte darauf ab, drei wichtige Eigenschaften dieser p-SLBs und s-SLBs zu vergleichen: die Membranhöhe über dem Substrat (der Abstand zwischen der proximalen Monolage und der Silica-Oberfläche), die Membrandicke, und die monolagen-spezifischen Diffusionskoeffizienten.

Die strukturellen und dynamischen Eigenschaften von l-PEG-SLBs werden maßgeblich durch die PEG2000-PE-Konzentration innerhalb der Doppelschicht beeinflusst.^[53] Um das System zu optimieren, ermittelten wir zunächst die

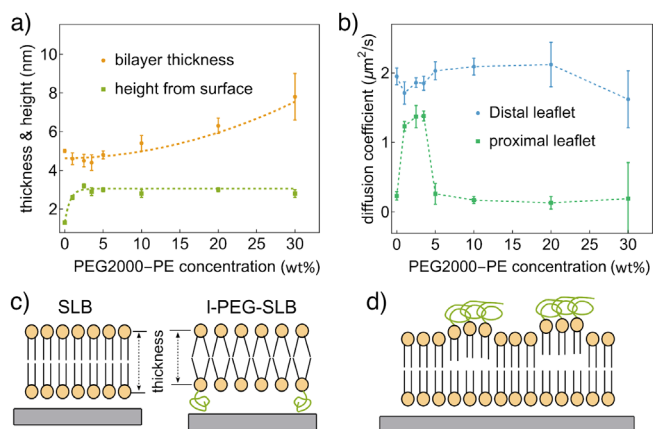


Abbildung 3. Struktur und Dynamik von I-PEG-SLBs in Abhängigkeit von der PEG2000-PE-Konzentration. a) Veränderungen der Dicke und Höhe von I-PEG-SLBs als Funktion der PEG2000-PE-Konzentration. Zur besseren Veranschaulichung sind auch Least-Squares-Fits parabolischer Kurven an die Daten gezeigt. Diese Fits dienen dazu, den allgemeinen Trend der Abhängigkeit von Dicke/Höhe von der PEG-Konzentration zu veranschaulichen, implizieren jedoch keine tatsächliche physikalische quadratische PEG-Konzentrationsabhängigkeit. b) Diffusionskoeffizienten in der proximalen und distalen Monolage in Abhängigkeit von der PEG2000-PE-Konzentration. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. Die Zahlenwerte sind in Tabelle S1 aufgeführt. c) Schematische Darstellung der durch die freistehende Geometrie verursachten Dicken-Verkleinerung. d) Schematische Darstellung des potenziell durch Polymer-Clustering verursachten lokalen Entkopplungseffekts.

ideale PEG2000-PE-Konzentration, indem wir die Struktur und Diffusion von I-PEG-SLBs mit unterschiedlichen PEG2000-PE-Konzentrationen charakterisierten (Abbildung S7, Supporting Information). Abbildung 3a zeigt die Beziehung zwischen der Dicke eines I-PEG-SLB und der Höhe seiner proximalen Monolage in Abhängigkeit von der PEG2000-PE-Konzentration. Bemerkenswerterweise stellten wir fest, dass die Membranhöhe der I-PEG-SLBs nicht von der PEG2000-PE-Konzentration abhing und durchgängig etwa 3 nm betrug. Unsere Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein, die von einer ungefähren Höhe von 4 nm für I-PEG-SLBs mit ca. 15 Gew.-% PEG2000-PE berichteten.^[52] In unseren Experimenten untersuchten wir einen PEG2000-PE-Konzentrationsbereich von 0 Gew.-% bis 30 Gew.-%, da höhere Konzentrationen die Vesikelruptur auf der Oberfläche verhinderten (Abbildung S8, Supporting Information). Zum Vergleich sei angemerkt, dass ein s-SLB eine Hydratations-schicht von 1.3 ± 0.1 nm Dicke zwischen der proximalen Monolage und dem Substrat aufweist.

Die über verschiedene PEG2000-PE-Konzentrationen hinweg gleichbleibenden Membranhöhen von I-PEG-SLBs stellen eine bemerkenswerte Anomalie dar, die von herkömmlichen Erwartungen abweicht. Typischerweise ist der Abstand zwischen den PEG-Ankerpunkten deutlich größer als der PEG-Gyrationsradius wenn PEG-Ketten mit geringer Oberflächenkonzentration angebonden werden. Dadurch werden laterale Wechselwirkungen minimiert und die Ketten nehmen isolierte, globuläre Konformationen an, welche für

ein „Pilz-Regime“ (mushroom regime) charakteristisch sind. Sobald jedoch die Kettendichte einen kritischen Schwellenwert überschreitet, werden laterale Wechselwirkungen bedeutend, was die Polymerketten zwingt, sich senkrecht von der Membranoberfläche nach außen zu strecken und so in ein „Bürsten-Regime“ (brush regime) zu wechseln. Dieser Übergang sollte zu einer zunehmenden Membranhöhe mit steigender PEG-Dichte führen.^[57,58] Frühere Untersuchungen schätzten, dass für PEG2000-PE dieser Übergang bei einer Konzentration von etwa 1.4 mol% (ca. 5 Gew.-%) liegt.^[53,59] Die fehlende Höhenänderung in unserem System könnte darauf zurückzuführen sein, dass die PEG-Ketten nicht kovalent an das Substrat gebunden sind.

In I-PEG-SLBs, in denen PEG-Ketten an Lipidmoleküle gebunden sind, könnte die laterale Mobilität sowohl von PEG2000-PE als auch der Lipide innerhalb der flexiblen Membran denjenigen Kräften entgegenwirken, die für eine vertikale Kettenausrichtung erforderlich wären. Bemerkenswerterweise zeigten frühere Studien, dass selbst bei PEG2000-PE-Konzentrationen von bis zu 5 mol% (etwa 20 Gew.-%) die Diffusion der PEG2000-PE-Moleküle nur um die Hälfte reduziert war.^[53] Dieses Verhalten widerspricht herkömmlichen Modellen der PEG-Kettenwechselwirkungen und deutet darauf hin, dass zusätzliche Einflussfaktoren eine Rolle spielen könnten, wie etwa spezifische Wechselwirkungen zwischen PEG-Ketten, Lipiden und dem Substrat.

Während die Membranhöhen über weite PEG2000-PE-Konzentrationen hinweg konstant blieben, führte ein niedrigerer PEG-PE-Gehalt (im Bereich von 1 Gew.-% bis 3.5 Gew.-%) zu einer reduzierten Doppelschichtdicke (Abbildung 3a). Zum Beispiel ist bei 3.5 Gew.-% PEG2000-PE die Dicke der Doppelschicht (4.4 ± 0.4 nm) um etwa 0.6 nm geringer als die eines s-SLBs (5.0 ± 0.08 nm). Das könnte durch Veränderungen in der Lipid-Packungsdichte verursacht sein,^[54] welche zur Bildung von „freistehenden“ Lipiden führen könnte – ein charakteristisches Merkmal des „Pilz“-Regimes (Abbildung 3c). Darüber hinaus könnte bei hoher PEG-Kettendichte die gleichmäßige Verteilung der PEG-Ketten auf beiden Seiten der Doppelschicht zu einer Entkopplung beider Monolagen führen,^[60,61] was zu der beobachteten Zunahme der Doppelschichtdicke bei den 20 Gew.-% und 30 Gew.-% PEG2000-PE-Proben beiträgt (Abbildung 3d).

Im weiteren bestimmten wir die Diffusionskoeffizienten für die proximale ($D_{proximal}$) und distale (D_{distal}) Monolagen in allen I-PEG-SLBs (Abbildung 3b). Auffällig war, dass in allen Proben die distalen Monolagen nahezu identische Diffusionskoeffizienten aufwiesen, welche durchgehend größer waren als die der proximalen Monolagen. Allerdings zeigten die proximalen Monolagen ein unterschiedliches Verhalten in Abhängigkeit von der PEG2000-PE-Konzentration. Im Bereich von 1 Gew.-% bis 3.5 Gew.-% PEG2000-PE wiesen die proximalen Monolagen eine schnelle Diffusion mit Diffusionskoeffizienten ähnlich denen der distalen Monolagen auf ($D_{distal} \sim 1.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Im Gegensatz dazu waren die $D_{proximal}$ -Werte in I-PEG-SLBs mit höheren PEG2000-PE-Konzentrationen (5 Gew.-% bis 20 Gew.-%) deutlich niedriger und ähnelten denen von s-SLBs ($\sim 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$).

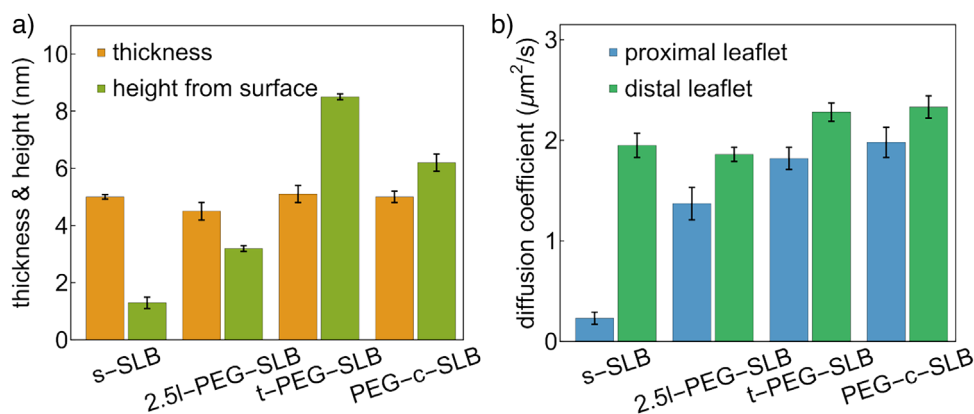


Abbildung 4. Struktur und Dynamik verschiedener SLBs. a) Dicke und Höhe von vier verschiedenen SLBs. b) Diffusionskoeffizienten in den proximalen und distalen Monolagen für die vier SLBs. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. Die Zahlenwerte sind in Tabelle S1 aufgeführt.

Interessanterweise zeigte die I-PEG-SLB-Membran mit 30 Gew.-% PEG2000-PE eine im Vergleich zu den anderen Proben verringerte Lipidmobilität in der distalen Monolage. Die beobachteten Unterschiede in der Diffusion innerhalb der proximalen Monolage korrespondieren zu den Änderungen der Membrandicke bei unterschiedlichen PEG2000-PE-Konzentrationen. Die langsamere Diffusion in I-PEG-SLBs mit höheren PEG2000-PE-Konzentrationen deutet auf starke Wechselwirkungen zwischen proximalen Lipiden und den PEG-Ketten hin. Im Gegensatz dazu wiesen I-PEG-SLBs mit niedrigeren PEG2000-PE-Konzentrationen (1 Gew.-% bis 3.5 Gew.-%) deutlich geringere Wechselwirkungen mit der Polymerlage auf. Unsere Ergebnisse einer reduzierten Mobilität in I-PEG-SLBs stimmen mit früheren FRAP-Messungen überein.^[53,62]

Basierend auf diesen Beobachtungen wählten wir I-PEG-SLBs mit 2.5 Gew.-% PEG-PE (bezeichnet als 2.5I-PEG-SLB) für den weiteren Vergleich mit anderen SLBs, bei denen PEG-Ketten an der Oberfläche verankert sind (Abbildung 2). Des Weiteren verwendeten wir GIET-IsFLCS, um die strukturellen Eigenschaften und die monolagen-spezifische Diffusion von t-PEG-SLB- und PEG-c-SLB-Membranen umfassend zu untersuchen und einen direkten Vergleich mit anderen SLBs vorzunehmen (Abbildung 4).

Wie in Abbildung 4a dargestellt, wiesen sowohl t-PEG-SLBs als auch PEG-c-SLBs ähnliche Membrandicken wie SLBs ohne Polymer auf. Allerdings waren ihre Membranhöhen deutlich größer als die von s-SLBs und 2.5I-PEG-SLBs: Die proximale Monolage der t-PEG-SLBs hatte eine Höhe von 8.5 ± 0.1 nm, während dieser Wert für PEG-c-SLBs 6.2 ± 0.3 nm betrug. Diese vergrößerte Höhe ist auf das Vorhandensein von PEG-Ketten zurückzuführen, die an die feste Oberfläche gebunden sind und ein „Bürsten“-Regime (brush regime) bilden.

Der beobachtete Höhenunterschied zwischen I-PEG-SLBs und t-PEG-SLBs stimmt mit früheren Ergebnissen aus Neutronen- und Röntgenreflexionsmessungen überein, die von Watkins et al. berichtet wurden.^[63] Ihre Studie zeigte, dass die Membranhöhe von I-PEG-SLBs der von s-SLBs ähnelt, während t-PEG-SLBs etwa 7 nm über der Oberfläche liegen, wenn die terminalen Enden der Lipopo-

lymere am Substrat verankert sind. Sie führte das Fehlen einer Höhenzunahme in I-PEG-SLBs darauf zurück, dass sich alle Lipopolymere in die obere Monolage umverteilen, sodass kein Polymerkissen unterhalb der Doppelschicht verbleibt. Im Gegensatz dazu zeigen unsere Messungen eine Erhöhung der Membranhöhe um 1 nm sowie eine erhöhte Diffusion in I-PEG-SLB bei niedriger Lipopolymer-Konzentration, was darauf hindeutet, dass sich doch einige Lipopolymere unterhalb der Doppelschicht befinden. Hinsichtlich der monolagen-spezifischen Diffusionskoeffizienten (Abbildung 4b) zeigten sowohl die t-PEG-SLBs als auch die PEG-c-SLBs eine deutlich schnellere Diffusion im Vergleich zu I-PEG-SLBs und s-SLBs – sowohl in der proximalen als auch der distalen Monolage.

Die vergleichsweise langsame Diffusion in der distalen Monolage der I-PEG-SLBs könnte auf Wechselwirkungen zwischen den distalen Lipiden und den PEG(2000)-Ketten zurückzuführen sein. Obwohl alle untersuchten Membranen aus DOPC-Lipiden bestanden, zeigen die Unterschiede in den D_{distal} -Werten zwischen den verschiedenen SLBs, dass das Verhalten der distalen Monolagen nicht unbeeinträchtigt ist. Vielmehr kommt es zu einer signifikanten Durchmischung und Kopplung zwischen den Monolagen, bei der die Eigenschaften einer Monolage die der gegenüberliegenden Monolage erheblich beeinflussen.^[12,22,64,65]

Molekulardynamik-Simulationen bestätigen eine erhebliche Durchmischung zwischen den Monolagen und schätzen, dass in DOPC-Doppelschichten etwa 71 % der Lipide an einem solchen Austausch beteiligt sind.^[22] Diese Durchmischung zwischen den Monolagen beeinflusst erheblich die Mobilität in der distalen Monolage, da sie durch die Dynamik in der proximalen Monolage beeinflusst wird. Folglich ist die schnellere Diffusion in der distalen Monolage der t-PEG-SLBs und PEG-c-SLBs auf die erhöhte Diffusionsrate in der jeweiligen proximalen Monolage zurückzuführen. Im Gegensatz dazu wird in den 2.5I-PEG-SLBs die Lipiddiffusion in der distalen Monolage durch die Wechselwirkungen mit den PEG-Ketten verlangsamt.

Unsere Vergleiche (Abbildung 4, Tabelle S1) zeigen, dass t-PEG-SLB- und PEG-c-SLB-Membranen aufgrund ihres größeren Abstands zum Substrat und ihrer höheren

Diffusionsraten bessere Plattformen für biophysikalische Untersuchungen darstellen. Allerdings ist ihre Herstellung auch aufwendiger und zeitintensiver. Im Gegensatz dazu sind l-PEG-SLBs einfacher herzustellen, was sie zu einer beliebten Wahl für Studien macht, die die Plasmamembran nachbilden sollen.^[52,54,66–69] Aber es ist Vorsicht geboten, insbesondere bei PEG2000-PE-Konzentrationen im Bereich von 1.5 mol% bis 5 mol% (entsprechend 5 Gew.-% bis 20 Gew.-%), da diese Konzentrationen zu Diffusionsraten führen können, die mit denen von s-SLBs vergleichbar sind. Zudem ist die durch PEG2000-PE in l-PEG-SLBs erzeugte Membranhöhe auf 3 nm begrenzt, was für bestimmte Transmembranproteine oder Anwendungen, die eine größere Membranhöhe erfordern, möglicherweise unzureichend ist.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend demonstriert unsere Studie, dass GIET-lsFLCS eine leistungsfähige und vielseitige Methode zur Charakterisierung sowohl der strukturellen als auch der dynamischen Eigenschaften von SLBs ist, die es erlaubt, detaillierte und wichtige Einblicke in die Biophysik von Membranen und Membranproteinen zu erhalten. Durch die Untersuchung von drei häufig verwendeten p-SLBs mit unterschiedlichen PEG-Kettenkonformationen konnten wir zeigen, wie die Polymerarchitektur die Membranhöhe und die Lipiddiffusion maßgeblich beeinflusst. Dies liefert wichtige Informationen für das Design von SLB-Systemen für biotechnologische und medizinische Anwendungen.

Darüber hinaus gibt unsere Untersuchung der monolagen-spezifischen Lipiddiffusion wertvolle Einblicke in die Kopplungsmechanismen zwischen den Monolagen, die unser Verständnis der Physik von Lipiddoppelschichten und insbesondere von asymmetrischen Membranen erweitern. Diese Erkenntnisse vertiefen nicht nur grundlegend unser Wissen der Membranbiophysik, sondern eröffnen auch neue Möglichkeiten zur Untersuchung von Lipidwechselwirkungen in komplexen biologischen Systemen. Die Vielseitigkeit von GIET-lsFLCS macht diese Methode zudem zu einem vielversprechenden Werkzeug für die Membranforschung im weiteren Sinne. Sie ermöglicht die Untersuchung des Verhaltens von Lipiddoppelschichten unter unterschiedlichsten Bedingungen und ermöglicht die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Membranen und biologischen Molekülen.

Danksagungen

AG und JE danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projekts A06 des SFB 860. JE und TC sind der Europäischen Forschungsrat (ERC) für die finanzielle Förderung des Projekts „smMIET“ (Grant Agreement Nr. 884488) im Rahmen des Forschungs- und Innovationsprogramms Horizon 2020 der Europäischen Union dankbar. JE dankt außerdem der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle

Unterstützung im Rahmen der Exzellenzstrategie Deutschlands – EXC2067/1-390729940.

Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Es bestehen keine Interessenskonflikte.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Schlüsselwörter: Fluorescence correlation spectroscopy • Fluorescence lifetime microscopy • Graphene-induced energy transfer • Supported lipid bilayer • Tethered PEGylated SLB

- [1] A. P. Girard-Egrot, O. Maniti, *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 4876.
- [2] J. Andersson, J. J. Knobloch, M. V. Perkins, S. A. Holt, I. Köper, *Langmuir* **2017**, *33*, 4444–4451.
- [3] A. Junghans, I. Köper, *Langmuir* **2010**, *26*, 11035–11040.
- [4] R. Naumann, S. M. Schiller, F. Giess, B. Grohe, K. B. Hartman, I. Kärcher, I. Köper, J. Lübken, K. Vasilev, W. Knoll, *Langmuir* **2003**, *19*, 5435–5443.
- [5] J. Oreopoulos, C. M. Yip, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1970–1984.
- [6] A. Alessandrini, P. Facci, *Soft matter* **2014**, *10*, 7145–7164.
- [7] B. Wiltschi, W. Knoll, E.-K. Sinner, *Methods* **2006**, *39*, 134–146.
- [8] F. Giess, M. G. Friedrich, J. Heberle, R. L. Naumann, W. Knoll, *Biophys. J.* **2004**, *87*, 3213–3220.
- [9] S. M. Schiller, R. Naumann, K. Lovejoy, H. Kunz, W. Knoll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 208–211.
- [10] B. A. Cornell, V. Braach-Maksyvytis, L. King, P. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek, R. Pace, *Nature* **1997**, *387*, 580–583.
- [11] S. Wiebalck, J. Kozuch, E. Forbrig, C. C. Tzschucke, L. J. Jeuken, P. Hildebrandt, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 2249–2256.
- [12] T. Otosu, S. Yamaguchi, *Chem. Lett.* **2020**, *49*, 1473–1480.
- [13] F. Roder, S. Waichman, D. Paterok, R. Schubert, C. Richter, B. Liedberg, J. Piehler, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6792–6799.
- [14] Y. Oh, B. J. Sung, *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, *9*, 6529–6535.
- [15] R. L. Schoch, I. Barel, F. L. Brown, G. Haran, *J. Chem. Phys.* **2018**, *148*, 123333.
- [16] A. Gupta, T. Korte, A. Herrmann, T. Wohland, *J. Lipid Res.* **2020**, *61*, 252–266.
- [17] M. Rose, N. Hirmiz, J. M. Moran-Mirabal, C. Fradin, *Membranes* **2015**, *5*, 702–721.
- [18] J. M. Crane, V. Kiessling, L. K. Tamm, *Langmuir* **2005**, *21*, 1377–1388.
- [19] T. Chen, A. Ghosh, J. Enderlein, *Nano Lett.* **2023**, *23*, 2421–2426.
- [20] T. Dertinger, I. von der Hocht, A. Benda, M. Hof, J. Enderlein, *Langmuir* **2006**, *22*, 9339–9344.
- [21] S. J. Johnson, T. M. Bayerl, D. C. McDermott, G. W. Adam, A. R. Rennie, R. K. Thomas, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1991**, *59*, 289–294.
- [22] S. Capponi, J. A. Freites, D. J. Tobias, S. H. White, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2016**, *1858*, 354–362.
- [23] P. W. Fowler, J. J. Williamson, M. S. Sansom, P. D. Olmsted, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 11633–11642.
- [24] T. Fujimoto, I. Parmryd, *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *4*, 155.
- [25] J. Andersson, I. Köper, W. Knoll, *Front. Mater.* **2018**, *5*, 55.

- [26] L. Wang, J. S. Roth, X. Han, S. D. Evans, *Small* **2015**, *11*, 3306–3318.
- [27] J. Andersson, I. Köper, *Membranes* **2016**, *6*, 30.
- [28] R. J. Goodband, C. D. Bain, M. Staykova, *Langmuir* **2022**, *38*, 5674–5681.
- [29] S. Nirasay, A. Badia, G. Leclair, J. P. Claverie, I. Marcotte, *Materials* **2012**, *5*, 2621–2636.
- [30] J. Y. Wong, J. Majewski, M. Seitz, C. K. Park, J. N. Israelachvili, G. S. Smith, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1445–1457.
- [31] I. Levental, E. Lyman, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2023**, *24*, 107–122.
- [32] F. Cornelius, *Biochemistry* **2001**, *40*, 8842–8851.
- [33] A. G. Lee, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2004**, *1666*, 62–87.
- [34] E. Watkins, C. Miller, D. Mulder, T. Kuhl, J. Majewski, *Phys. Rev. Lett.* **2009**, *102*, 238101.
- [35] M. S. Jablin, M. Zhernenkov, B. P. Toperverg, M. Dubey, H. L. Smith, A. Vidyasagar, R. Toomey, A. J. Hurd, J. Majewski, *Phys. Rev. Lett.* **2011**, *106*, 138101.
- [36] V. Sharma, E. Mamontov, *Prog. Lipid Res.* **2022**, *87*, 101179.
- [37] Y. Kakimoto, Y. Tachihara, Y. Okamoto, K. Miyazawa, T. Fukuma, R. Tero, *Langmuir* **2018**, *34*, 7201–7209.
- [38] W. C. Wong, J.-Y. Juo, C.-H. Lin, Y.-H. Liao, C.-Y. Cheng, C.-L. Hsieh, *J. Phys. Chem. B* **2019**, *123*, 6492–6504.
- [39] L. Zhang, S. Granick, *Macromolecules* **2007**, *40*, 1366–1368.
- [40] T. Otosu, S. Yamaguchi, *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122*, 10315–10319.
- [41] A. Ghosh, A. Sharma, A. I. Chizhik, S. Isbaner, D. Ruhlandt, R. Tsukanov, I. Gregor, N. Karedla, J. Enderlein, *Nat. Photonics* **2019**, *13*, 860–865.
- [42] A. Ghosh, A. I. Chizhik, N. Karedla, J. Enderlein, *Nat. Protoc.* **2021**, *16*, 3695–3715.
- [43] T. Chen, N. Karedla, J. Enderlein, *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 1789.
- [44] A. Ghosh, S. Isbaner, M. Veiga-Gutiérrez, I. Gregor, J. Enderlein, N. Karedla, *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 6022–6028.
- [45] M. Böhmer, M. Wahl, H.-J. Rahn, R. Erdmann, J. Enderlein, *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *353*, 439–445.
- [46] A. I. Chizhik, I. Gregor, F. Schleifenbaum, C. B. Müller, C. Röling, A. J. Meixner, J. Enderlein, *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *108*, 163002.
- [47] R. Chance, A. Prock, R. Silbey, *Adv. Chem. Phys.* **1978**, *37*, 1–65.
- [48] J. Enderlein, *Chem. Phys.* **1999**, *247*, 1–9.
- [49] M. M. Elmer-Dixon, B. E. Bowler, *Anal. Biochem.* **2018**, *553*, 12–14.
- [50] S. J. Attwood, Y. Choi, Z. Leonenko, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 3514–3539.
- [51] J. Ries, S. Chiantia, P. Schwille, *Biophys. J.* **2009**, *96*, 1999–2008.
- [52] E. Karatekin, J. Di Giovanni, C. Iborra, J. Coleman, B. O’Shaughnessy, M. Seagar, J. E. Rothman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 3517–3521.
- [53] F. Albertorio, A. J. Diaz, T. Yang, V. A. Chapa, S. Kataoka, E. T. Castellana, P. S. Cremer, *Langmuir* **2005**, *21*, 7476–7482.
- [54] M. Merzlyakov, E. Li, I. Gitsov, K. Hristova, *Langmuir* **2006**, *22*, 10145–10151.
- [55] M. L. Wagner, L. K. Tamm, *Biophys. J.* **2000**, *79*, 1400–1414.
- [56] C. Daniel, K. E. Sohn, T. E. Mates, E. J. Kramer, J. O. Rädler, E. Sackmann, B. Nickel, L. Andruzzi, *Biointerphases* **2007**, *2*, 109–118.
- [57] S. T. Milner, *Science* **1991**, *251*, 905–914.
- [58] P. De Gennes, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1987**, *27*, 189–209.
- [59] D. Needham, D. H. Kim, *Colloids Surf., B* **2000**, *18*, 183–195.
- [60] A. F. Xie, S. Granick, *Nat. Mater.* **2002**, *1*, 129–133.
- [61] J. A. Hammons, H. I. Ingólfsson, J. R. Lee, T. S. Carpenter, J. Sanborn, R. Tunuguntla, Y.-C. Yao, T. M. Weiss, A. Noy, T. Van Buuren, *Nanoscale* **2020**, *12*, 6545–6555.
- [62] S. Kaufmann, O. Borisov, M. Textor, E. Reimhult, *Soft Matter* **2011**, *7*, 9267–9275.
- [63] E. B. Watkins, R. J. El-khoury, C. E. Miller, B. G. Seaby, J. Majewski, C. M. Marques, T. L. Kuhl, *Langmuir* **2011**, *27*, 13618–13628.
- [64] R. J. Hill, C.-Y. Wang, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2014**, *470*, 20130843.
- [65] T. Mandal, N. Brandt, C. Tempra, M. Javanainen, B. Fábíán, S. Chiantia, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2025**, *1867*, 184388.
- [66] C. Monzel, D. Schmidt, C. Kleusch, D. Kirchenbüchler, U. Seifert, A. Smith, K. Sengupta, R. Merkel, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–8.
- [67] C. Barnaba, E. Taylor, J. A. Brozik, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17923–17934.
- [68] S. F. Fenz, T. Bihl, D. Schmidt, R. Merkel, U. Seifert, K. Sengupta, A.-S. Smith, *Nat. Phys.* **2017**, *13*, 906–913.
- [69] A. J. Diaz, F. Albertorio, S. Daniel, P. S. Cremer, *Langmuir* **2008**, *24*, 6820–6826.

Manuskript erhalten: 05. Dezember 2024

Überarbeitetes Manuskript erhalten: 14. Februar 2025

Akzeptierte Fassung online: 26. Februar 2025

Endgültige Fassung online: ■■■■■

Forschungsartikel

Doppelschichten

N. Karedla, F. Schneider, J. Enderlein*,
T. Chen* [e202423784](#)

Monolagen-Spezifische Struktur
und Dynamik von Oberflächen- und
Polymer-Gestützten Lipiddoppelschichten

Das Manuskript untersucht die strukturellen und dynamischen Eigenschaften von Polyethylenglykol-gestützten Lipiddoppelschichten unter Verwendung einer Methode, die auf Graphen-induziertem Energietransfer und Line-Scan-Fluoreszenz-Lebenszeit-Korrelationspektroskopie basiert. Diese Technik ermöglicht eine subnanometer-genaue räumliche Auflösung und eine zeitliche Auflösung im Millisekundenbereich innerhalb eines einzigen Experiments.

