

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

Vorgelegt von
Dipl.-Chem. Nicole Plath
aus Remagen

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Januar 2011

Nano- und Mikronanostrukturen zur
Untersuchung und nanotechnologischen
Anwendung von Motorproteinen

Gutachter: Prof. Dr. Joachim P. Spatz

apl. Prof. Dr. Reiner Dahint

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1. MOTIVATION UND STRATEGIE	5
1.1 MOTIVATION	5
1.2. STRATEGIE	7
2. STRUKTURIERTE MATERIALIEN	9
2.1 KONVENTIONELLE METHODEN	10
2.1.1 ELEKTRONENSTRAHLLITHOGRAFIE	11
2.1.2 OPTISCHE LITHOGRAFIE	14
2.2 UNKONVENTIONELLE METHODEN	16
2.2.1 STEMPELTECHNIKEN	16
2.2.1.1 Mikrokontaktstempel	16
2.2.1.2 Nanoprägelithografie	18
2.2.2 RASTERKRAFTMIKROSKOP-BASIERTE TECHNIKEN	21
2.2.2.1 Nanoshaving/Nanografting	21
2.2.2.2 Dip-Pen Nanolithografie	22
2.2.3 SELBSTORGANISATION	24
3. METHODEN ZUR OBERFLÄCHENCHARAKTERISIERUNG	27
3.1 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE	27
3.2 RÖNTGENPHOTOELEKTRONENSPEKTROSKOPIE	29
3.3 FLUORESZENZMIKROSKOPIE	32
3.4 QUARZKRISTALLMIKROWAAGE MIT BESTIMMUNG DES DISSIPATIONSAKTORS	33
4. NANOSTRUKTURIERTE GOLDPARTIKELOBERFLÄCHEN	37

4.1 BLOCKCOPOLYMER MIZELLARE LITHOGRAFIE	37
4.2 PLASMABEHANDLUNG	42
4.3 ABSTAND DER PARTIKEL UND QUALITÄT DER ORDNUNG	46
4.4 MATERIAL UND METHODEN	49
<u>5. PASSIVIERUNG UND FUNKTIONALISIERUNG</u>	<u>53</u>
5.1 PROTEINRESISTENTE BESCHICHTUNGEN	53
5.1.1 PASSIVIERUNG GOLDPARTIKEL BESCHICHTETER OBERFLÄCHEN	55
5.2 GERICHTETE PROTEINANBINDUNG	57
5.2.1 NITRILOTRIACETAT UND NICKEL(II)	60
5.2.2 BIOTIN UND STREPTAVIDIN	69
5.2.3 COENZYM A UND PHOSPHOPANTETHEINYLTRANSFERASE	72
5.3 MATERIAL UND METHODEN	77
<u>6. MOTILITÄT UND FUNKTIONALITÄT MOLEKULARER MOTOREN</u>	<u>85</u>
6.1 MOTORPROTEINE UND FILAMENTE	85
6.1.1 MIKROTUBULI	86
6.1.2 KINESIN-1	87
6.2 MOTILITÄTSUNTERSUCHUNGEN IN GLEITEXPERIMENTEN	89
6.2.1 KONTROLLE DER DICHTEN	90
6.2.2 GERICHTETE ANBINDUNG HISTIDIN-FUNKTIONALISIERTER MOTORPROTEINE	91
6.2.3 DURCHFÜHRTE ANBINDUNGS- UND GLEITEXPERIMENTE	92
6.3 NACHWEIS DER FUNKTIONALITÄT ANGEBUNDENER MOTORPROTEINE	98
6.3.1 HERSTELLUNG KOLLOIDALER GOLDPARTIKEL	99
6.3.2 BIOTINYLIERUNG DER GOLDPARTIKEL	100
6.3.3 ANBINDUNG DES BIOTINYLIERTEN TUBULINS ÜBER IMMOBILISIERTES KINESIN	102
6.3.4 FUNKTIONALITÄTSNACHWEIS	104
6.4 MATERIAL UND METHODEN	106
<u>7. MIKRONANOSTRUKTUREN ALS TEMPLATE MOLEKULARER FLIEßBÄNDER</u>	<u>111</u>
7.1 MOLEKULARE TRANSPORTSYSTEME UND IHRE IN VITRO-ANWENDUNG	111
7.2 TEMPLATE MOLEKULARER FLIEßBÄNDER	114
7.3 MIKRONANOSTRUKTURIERUNG	115
7.3.1 LACKSYSTEM	117

7.3.2 LEITFÄHIGE, NICHT-TRANSPARENTE OBERFLÄCHEN	118
7.3.3 AUFLADUNGSEFFEKTE AUF NICHT-LEITENDEN OBERFLÄCHEN	120
7.3.4 LEITFÄHIGE, TRANSPARENTE OBERFLÄCHEN	120
7.3.5 NICHT-LEITFÄHIGE, TRANSPARENTE OBERFLÄCHEN	123
7.3.6 HOMOGENE GOLDSTRUKTUREN	130
7.4 MATERIAL UND METHODEN	133
8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	139
8.1 NANOSTRUKTURIERTE GOLDPARTIKELOBERFLÄCHEN	139
8.2 PASSIVIERUNG UND FUNKTIONALISIERUNG	140
8.3 MOTILITÄT UND FUNKTIONALITÄT MOLEKULARER MOTOREN	142
8.4 MIKRONANOSTRUKTUREN ALS TEMPLATE MOLEKULARER FLIEßBÄNDER	143
9. LITERATURVERZEICHNIS	145
10. ANHANG	163
10.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	163
10.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	165
11. DANKSAGUNG	169

Zusammenfassung

Motorproteine sind komplexe Nanomaschinen, die chemische Energie aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) in mechanische Energie umwandeln und so gerichtete Bewegung mit extrem hoher Spezifität und Effizienz ausführen. Sie sind essentiell für die Funktion lebender Organismen, da sie maßgeblich an überlebenswichtigen Prozessen wie der Zellteilung beteiligt sind. Das Verständnis ihrer Funktion ist die Basis um das Potential dieser Enzyme in der Nanotechnologie zu nutzen sowie Krankheiten zu verstehen, die auf defekten Motorproteinen beruhen, und Therapien zu ihrer Heilung zu entwickeln. Trotz reger Aktivität auf dem Gebiet liegen für viele Motorproteine nur wenige Informationen bezüglich der Wechselwirkung mit anderen Proteinen und des Verhaltens bei Einwirkung chemischer Substanzen vor.

Eine der Standardmethoden zur Untersuchung molekularer Motoren *in vitro* sind so genannte Gleitexperimente, in denen Motorproteine auf Oberflächen angebunden werden und fluoreszenzmarkierte Filamente über die Oberfläche transportieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Durchführung dieser Gleitexperimente auf Oberflächen, die mit hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln dekoriert sind, entwickelt. Die molekularen Motoren werden hierzu über Chelatisierung einer rekombinant eingeführten Histidinfunktionalisierung durch Übergangsmetallchelatoren gerichtet auf den Goldnanostrukturen immobilisiert. Die Nanopartikel dienen somit als Ankerpunkte. Das System weist den Vorteil auf, dass ein Motorprotein pro Partikel immobilisiert werden kann. Zusätzlich kann ihre Dichte über den Abstand der Partikel kontrolliert werden. Das entwickelte Substrat erlaubt die Untersuchung aller mit einer Histidinsequenz funktionalisierten Motorproteine. Seine Eignung zur Untersuchung von Motorproteinen in Gleitexperimenten wurde mittels der Untersuchung eines gut erforschten Kinesin-1 Konstrukts demonstriert. Dieses zeigte literaturbekanntes Verhalten.

Zusätzlich zum Gleitexperiment wurde ein Funktionalitätsnachweis entwickelt, der die Aktivität der orientiert auf den Goldnanopartikeln angebundenen Motorproteine unter den im Gleitexperiment gewählten Bedingungen überprüft. Dieser Nachweis stellt eine wichtige Ergänzung des Gleitexperiments zur Überprüfung der Aktivität der Motorproteine auf molekularer Ebene dar. Die Kombination der beiden Methoden ermöglicht die zuverlässige *in vitro* Untersuchung des Verhaltens von Motorproteinen unter Sicherstellung des Erhalts ihrer Aktivität und erlaubt es so Informationen zum Verständnis molekularer Motoren zu erlangen. Molekulare Motoren zählen *in vivo* zu den Hauptbestandteilen gerichteter molekularer Transportsysteme. Dies prädestiniert sie für eine Verwendung zum Aufbau effizienter *in vitro*-Nanotransportsysteme. Das Ziel dieser Arbeit war daher neben der Entwicklung der oben

genannten Methoden die Entwicklung von Templaten zur Erzeugung so genannter molekularer Fließbänder. Als molekulare Fließbänder werden unter Kontrolle der Polarität auf strukturierten Oberflächen angebundene Mikrotubuli bezeichnet, auf denen sich Motorproteine gerichtet bewegen.

Im Rahmen der Arbeit wurden mikronanostrukturierte Oberflächen hergestellt, die der polaritätsorientierten Anbindung und gerichteten Polymerisation von Mikrotubuli dienen. Hierbei handelt es sich um Oberflächen auf denen nanostrukturierte Bereiche in der Dimension einiger Mikrometer bis einiger hundert Nanometer von unstrukturierten Bereichen umgeben sind. Die erfolgreiche Funktionalisierung der Goldnanopartikel mit Übergangsmetallchelatoren oder Streptavidin, die eine Anbindung von Mikrotubuli ermöglichen, wurde durchgeführt. Somit wurden erfolgreich Template zur Erzeugung molekularer Fließbänder hergestellt.

Summary

Motor proteins are complex nanomachines that convert chemical energy derived from the hydrolysis of ATP into mechanical work and use it to perform directed motion with extremely high efficiency and specificity. They play an essential role in living organisms because they are involved in vital processes like cell division. Therefore insight in their function provides the basis to use their great potential in nanotechnology, understand diseases that are based on damaged motor proteins and develop therapies against these diseases. Despite a lot of research activity in this field, for many motor proteins little is known about the interplay with other proteins or chemicals.

One of the standard methods to investigate molecular motors *in vitro* are so called gliding assays. These assays are based on motor proteins immobilized on surfaces to transport fluorescently labeled filaments across the surface. Within the scope of this study a technique to perform these gliding assays on surfaces that are decorated with hexagonally ordered gold nanoparticles was developed. To couple motor proteins in a site-directed manner, gold nanoparticles were functionalized with transition metal chelators and proteins were immobilized via their recombinantly introduced histidine tags. The particles serve as anchor points for site-specific immobilization of motor proteins. Due to the size of these particles immobilization of exactly one protein per particle is possible. Additionally it is possible to control the motor protein density by varying the interparticle spacing. This method presents a universal tool for the investigation of histidine-tagged motor proteins. To prove the suitability of these substrates for the investigation of motor proteins the well-studied kinesin-1 was used. The observed behavior is in line with its behavior reported in literature.

Furthermore an assay to control the activity of motor proteins site-specifically coupled to gold nanoparticles was performed under the conditions used in the gliding assay. This assay is an important supplement to the gliding assay because it enables to control the activity of the motor proteins on the molecular scale. Combining these two methods reliably allows investigating the performance of motor proteins *in vitro* while ensuring the preservation of their activity.

Molecular motors are one of the main constituents of molecular transport *in vivo*. This makes them an ideal material for building up efficient *in vitro* nanotransport systems. Keeping this in mind, one of the objectives of this work was the development of so called molecular tracks. Molecular tracks are polarity orientated microtubules that are immobilized on surfaces and serve as tracks for the movement of motor proteins.

Within the scope of this work micronanostructured surfaces that serve for the polarity orientated immobilization and polymerization of microtubules were produced. These

surfaces are hierarchically structured with micrometer-sized patches of gold nanopatterns surrounded by non-structured areas with feature sizes ranging from some micrometers to several hundred nanometers. By functionalizing these hierarchically structured gold nanoparticles with transition metal chelators or streptavidin templates for the production of molecular tracks were successfully produced.

1. Motivation und Strategie

1.1 Motivation

Die Nanowissenschaften und die Nanotechnologie haben in den letzten Jahren und Jahrzehnten maßgeblich zum technologischen Fortschritt und folglich zum Erscheinungsbild der Welt wie wir sie heute kennen beigetragen. Als Geburtsstunde wird häufig der 1959 von Richard Feynman gehaltene, legendäre Vortrag "There's Plenty of Room at the Bottom", [1] in dem Feynman über das immense Potential der Miniaturisierung referierte, genannt. Seitdem hat die Miniaturisierung vor allem im Bereich der Informationstechnologie zu immensen Fortschritten geführt.

Ein Ziel der Nanotechnologie ist die Nutzung größenabhängiger Eigenschaften. Die Eigenschaften vieler Materialien unterscheiden sich im Nanometerbereich von denen im makroskopischen Bereich. Beispiele hierfür sind die hohe elektrische Leitfähigkeit und mechanische Stabilität von Kohlenstoffnanoröhren [2,3] oder das Phänomen, dass Glasübergangstemperaturen von sehr dünnen Polymerschichten sich von denen dickerer Schichten unterscheiden [4,5]. Heute schon genutzte Beispiele sind der Lotuseffekt zur Erzeugung selbstreinigender Oberflächen und der Mottenaugeneffekt zur Entspiegelung von Oberflächen [6,7].

Ursprung der Nanostrukturierung ist ohne Frage die Natur. Sie hat schon lange bevor der Mensch anfang sich mit der Welt im Nanometermaßstab zu befassen hochkomplexe Strukturen wie die DNS verwendet, um Informationen auf kleinstem Raum zu speichern. Die Tatsache, dass jede Zelle in Form ihrer DNS die gesamte Information zum Aufbau und zur Funktion eines kompletten Organismus enthält, macht deutlich, dass das Potential der Nanotechnologie heute bei weitem noch nicht ausgeschöpft ist. Das Zusammenspiel aus den Nanowissenschaften zur Erforschung der Welt im Nanometermaßstab und der Nanotechnologie, die diese Erkenntnisse umsetzt, hat vor allem im Bereich der Biotechnologie und Medizin großes Potential [8]. Ein wichtiger Bereich ist hier die Untersuchung komplexer

Proteine und deren Nutzung zum Aufbau synthetischer Systeme. Hierzu kommen je nach gewünschter Funktion des synthetischen Systems verschiedene Proteine in Frage.

So genannte Motorproteine sind beispielsweise geeignet um gerichteten Transport zu ermöglichen. Sie führen gerichtete Bewegung mit extrem hoher Spezifität und Effizienz aus, indem sie chemische in mechanische Energie umwandeln und die Polarität polymerer Proteinstrukturen, so genannter Filamente, erkennen [9]. Aufgrund dieser Fähigkeit können diese biochemischen Nanomaschinen Aufgaben wie den gerichteten Transport von Vesikeln erfüllen und leisten ihren Beitrag zu wichtigen Prozessen wie der Zellteilung [10,11]. Die Erforschung molekularer Motoren und das Verständnis ihrer Funktion ist die Basis um sie in der Nanotechnologie verwenden zu können. Hierzu existieren unter anderem auf mikroskopischen Techniken beruhende Verfahren [12]. Diese sind jedoch oft nur für spezielle molekulare Motoren anwendbar, so dass Untersuchung der Eigenschaften und Funktion verschiedener Motorproteine nicht ohne weiteres möglich ist. Somit soll eine Methode entwickelt werden, die für die Charakterisierung aller mit einer Histidinsequenz funktionalisierter Motorproteine verwendbar ist. Hierzu eignet sich die Weiterentwicklung des so genannten Gleitexperimentes, in dem molekulare Motoren auf einer Oberfläche immobilisiert werden und der Transport fluoreszenzmarkierter Filamente im Mikroskop beobachtet wird [13,14,15]. Die inverse Anordnung der Proteine weist den Vorteil auf, dass die Motilität durch die Fluoreszenzmarkierung der Filamente präzise beobachtet werden kann ohne die Aktivität des Motorproteins zu beeinflussen. Des Weiteren kann im Gegensatz zu Einzelmolekülexperimenten kooperatives Verhalten molekularer Motoren untersucht werden.

Als Substrate des universell anwendbaren Gleitexperimentes bieten sich mit hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln dekorierte Oberflächen an, die die Immobilisierung einzelner Motorproteine ermöglichen. Diese können mittels Blockcopolymerer Mizellare Lithografie, die auf der Selbstorganisation von Diblockcopolymeren zu Mizellen und deren Abscheidung auf Oberflächen beruht, hergestellt werden [16,17]. Mittels gerichteter Anbindung molekularer Motoren auf den Partikeln und Durchführung von Gleitexperimenten auf diesen Oberflächen können sowohl kinetische Daten ermittelt, als auch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen und Chemikalien untersucht werden.

Molekulare Motoren können des Weiteren zum Aufbau eines Transportsystems im Nanometermaßstab genutzt werden. Ein solches als molekulares Fließband bezeichnetes System beruht auf der gerichteten Anbindung der Filamente, mit denen die Motorproteine wechselwirken. Zu diesem Zweck sollen strukturierte Substrate, die als Template zur polaritätsorientierten Anbindung sowie im nächsten Schritt zur gerichteten Polymerisation der Filamente auf der Oberfläche dienen sollen, entwickelt werden. Hierzu eignen sich

hochdefinierte, mikronanostrukturierte Oberflächen, die aus hexagonal angeordneten Goldnanostrukturen bestehen. Zu ihrer Herstellung werden Blockcopolymer Mizellare Lithografie und Elektronenstrahlithografie kombiniert [18]. Die so erzeugten Mikronanostrukturen ermöglichen die polaritätsorientierte Ausrichtung der Filamente. Mögliche Anwendungen der molekularen Fließbänder sind Wirkstoffsuche, Proteinanalyse und medizinische Diagnostik [19,20].

1.2 Strategie

Im Rahmen dieser Arbeit ist zum einen die Entwicklung eines universellen Gleitexperiments zur Untersuchung der Funktion von Motorproteinen und ihrer Wechselwirkung mit anderen Proteinen und Chemikalien geplant. Zum anderen soll ein Templat zur polaritätsorientierten Anbindung sowie gerichteten Polymerisation von Filamenten auf der Oberfläche hergestellt werden. Dies dient der Erzeugung so genannter molekularer Fließbänder, die ein nanotechnologisches System zum gerichteten Transport auf Basis von Motorproteinen darstellen. Die beiden Ziele sollen, wie in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt, ausgehend von mit hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln dekorierten Oberflächen erreicht werden. Die Herstellung der Goldnanopartikel erfolgt mittels Blockcopolymer Mizellarer Lithografie.

Zur Erzeugung einer im Gleitexperiment anwendbaren Oberfläche müssen die Bereiche zwischen diesen Goldnanopartikeln zunächst mit einer Polyethylenglykolschicht gegen unspezifische Adsorption geschützt werden. Der nächste Schritt ist dann die Funktionalisierung der Partikel, die die orientierte Anbindung der Motorproteine über ihre Histidinsequenz ermöglicht. Hierzu ist die Ausarbeitung einer geeigneten Immobilisierungsstrategie erforderlich. Eine Möglichkeit ist die schematisch gezeigte Verwendung von Chelatoren, die die Anbindung von Übergangsmetallionen wie Ni^{2+} an die Oberfläche der Goldnanopartikel erlauben. Diese dienen der Immobilisierung der Motorproteine über ihre Histidinsequenz. Im Gleitexperiment werden dann fluoreszenzmarkierte Filamente transportiert und ihre Bewegung analysiert. Die zusätzliche Kontrolle der Funktionalität der angebundenen molekularen Motoren erlaubt es ihre Aktivität auf molekularer Ebene unter den im Gleitexperiment verwendeten Bedingungen zu überprüfen. Hierzu soll ein auf der Anbindung kolloidaler Goldnanopartikel beruhender Nachweis durchgeführt werden.

Auch die Herstellung des Templats zur Erzeugung molekularer Fließbänder geht, wie in Abbildung 1.1 schematisch gezeigt, von homogen mit Goldnanopartikeln strukturierten Oberflächen aus. Diese müssen hierzu jedoch zusätzlich im Bereich einiger Mikrometer bis einiger hundert Nanometer so strukturiert werden, dass die Partikel außerhalb der Strukturen entfernt werden. Diese als Mikronanostrukturen bezeichneten Strukturen sollen mittels kon-

ventioneller Elektronenstrahlolithographie, die die Herstellung von quadratzentimetergroßen mikronanostrukturierten Oberflächen erlaubt, hergestellt werden. Durch Funktionalisierung dieser hierarchischen Strukturen mit verschiedenen Molekülen zur orientierten Anbindung stellen sie dann Template zur Erzeugung molekularer Fließbänder dar.

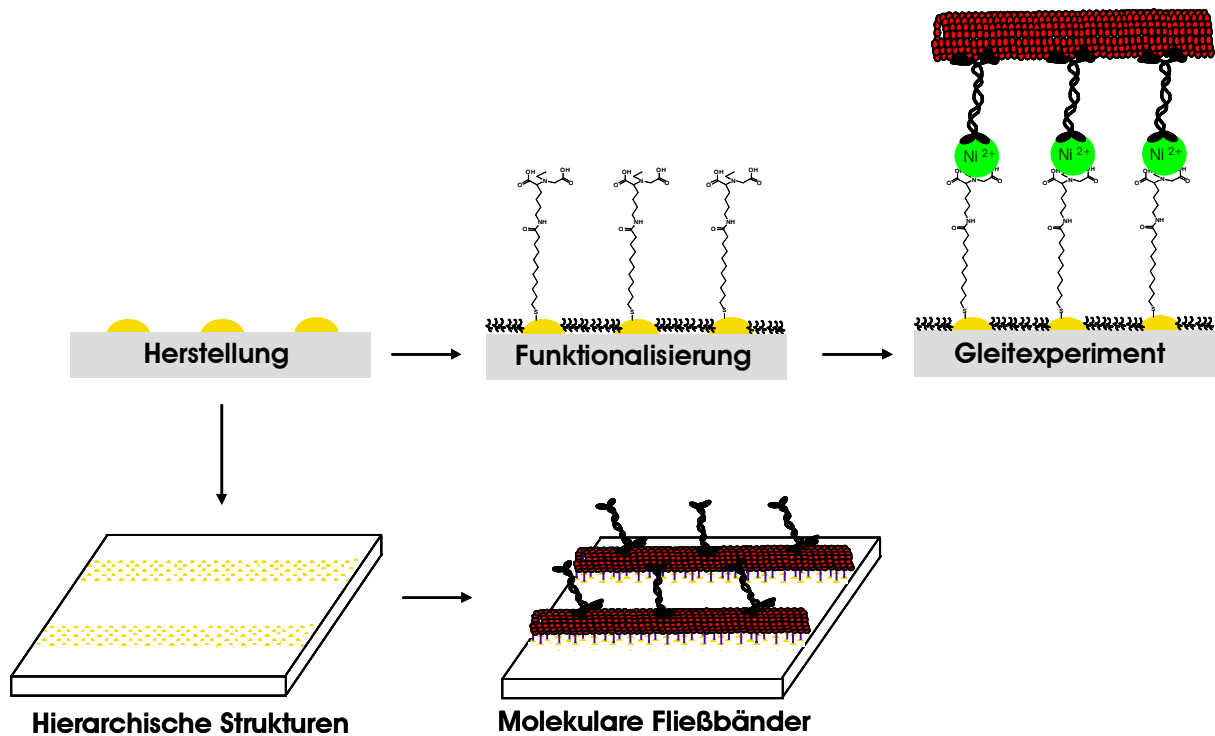


Abb. 1.1: **Schematische Darstellung der der Arbeit zugrunde liegenden Strategie.** Ausgehend von mit hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln dekorierten Oberflächen soll ein universelles Gleitexperiment sowie ein Template zur Herstellung molekularer Fließbänder entwickelt werden. Dies erfordert in beiden Fällen die Erzeugung der Struktur gefolgt von ihrer Funktionalisierung zum Zweck der gerichteten Proteinanbindung.

2. Strukturierte Materialien

Durch den hohen Bedarf an strukturierten Materialien haben Methoden zu ihrer Herstellung heute große Bedeutung erlangt. Strukturierte Materialien finden unter anderem als elektronische Bauteile, Genchips und Template zur Herstellung zwei- und dreidimensionaler funktioneller Strukturen Verwendung in Industrie und Wissenschaft. Aufgrund der fortschreitenden Miniaturisierung ist vor allem die zuverlässige Herstellung von Mikro- und Nanostrukturen von Interesse. Dieses Kapitel stellt standardmäßig verwendete sowie viel versprechende neue Techniken vor.

Es existiert eine Vielzahl an Methoden zur Herstellung von Strukturen im Mikro- und Nanometerbereich. Diese werden in so genannte "top-down" und "bottom-up" Ansätze unterteilt [21]. Erstere umfassen verschiedene Lithografiemethoden, die zur Strukturierung mittels serieller wie auch paralleler Prozesse verwendet werden können. Im Gegensatz dazu nutzen Zweitere Wechselwirkungen einzelner Komponenten zum Aufbau zwei- wie auch dreidimensionaler Strukturen. Während "top-down" Methoden, darauf beruhen ein vorhandenes Material zu strukturieren, wird beim "bottom-up" Ansatz das strukturierte Material aus Untereinheiten aufgebaut. Es existieren auch einige Techniken, die beide Ansätze miteinander verbinden. Hierzu zählen Selbstorganisationsprozesse, die per "top-down" Strategie hergestellte Template verwenden [22].

Auch eine Unterteilung der Methoden in konventionelle und nicht-konventionelle Techniken ist verbreitet. Zu den konventionellen Prozessen gehören Methoden, die für den Durchbruch in der Mikroelektronikindustrie entscheidend waren: die Foto-, die Elektronenstrahl- und die Ionenstrahl-Lithografie. Sie sind kommerziell erhältlich und in der Industrie weit verbreitet. Nicht-konventionelle Methoden hingegen werden auf industrieller Ebene noch wenig genutzt und oft nur in der Forschung verfolgt. Sie bieten zumeist günstige Alternativen, sind aber noch von der vollen Marktreife entfernt. Zu diesen nicht-konventionellen Prozessen gehören Stempeltechniken wie Mikrokontaktstempeln, Selbstorganisation oder rasterkraftmikroskopbasierte Lithografie. Sie bieten vor allem zur Strukturierung empfindlicher Materialien wie Proteine und Polymere viel versprechende Alternativen.

2.1 Konventionelle Methoden

Konventionelle Methoden basieren auf der Erzeugung einer Struktur in einem Lack und dem darauf folgenden Transfer dieser in oder auf das darunter liegende Substrat. Das diesem Prozess zu Grunde liegende Prinzip ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Zunächst wird das Substrat mit einem bestrahlungssensitiven Lack beschichtet. Dieser wird in der Regel durch Rotationsbeschichtung (engl. spin coating) auf die Oberfläche aufgebracht. Die im Anschluss durchgeführte partielle Belichtung mit energiereichen Teilchen wie Elektronen, Ionen oder Photonen kann entweder mittels abstrahieren des Substrates mit einem fokussierten Strahl oder Belichtung durch eine Maske erfolgen. Dies führt zu einer chemischen Veränderung des Lacks, der die Löslichkeit, in dem für die nachfolgende Entwicklung verwendeten Lösungsmittel im Vergleich zum unbestrahlten Bereich verändert. Die darauf folgende Übertragung der erhaltenen Struktur auf das Substrat kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Beispiele sind Metallabscheidung oder Ätzprozesse, gefolgt von der Entfernung des Lacks (engl. lift-off) [23].

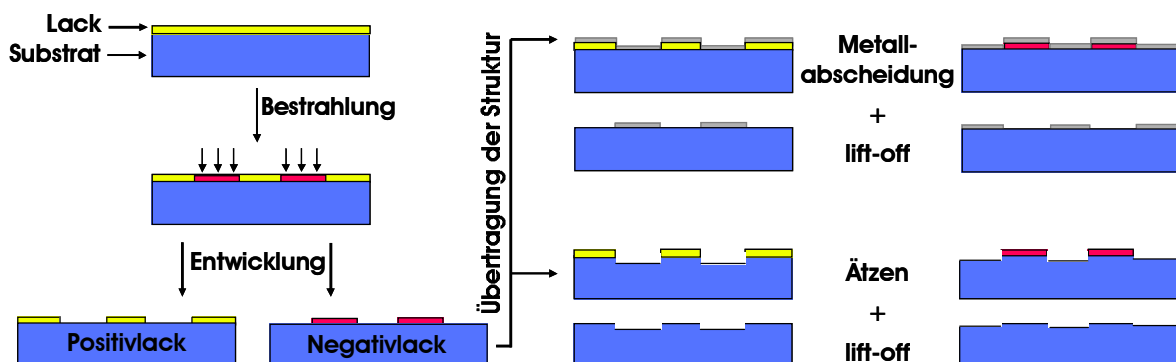


Abb. 2.1: **Konventioneller Lithografieprozess.** Schematische Darstellung der wesentlichen Schritte einschließlich Bestrahlung, Entwicklung, und Strukturübertragung durch Metallabscheidung oder Ätzen und nachfolgender Entfernung des Lacks [23].

Die erzielbare Auflösung ist ein entscheidendes Kriterium zur Auswahl der für eine vorhandene Fragestellung geeigneten Lithografiemethode. Sie ist durch die Wellenlänge des Primärstrahls, Streueffekte im Lack und der Oberfläche sowie die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Lacks begrenzt. Neben der Auflösung ist vor allem in der industriellen Anwendung der Durchsatz entscheidend. Ein hoher Durchsatz setzt die Strukturierung einer Fläche in möglichst kurzer Zeit voraus. Beide Anforderungen sind gegenläufig. Abbildung 2.2 zeigt, dass bei einer Auflösung im Nanometerbereich die Verwendung konventioneller Lithografiemethoden problematisch ist. Die gestrichelte Linie stellt den phänomenologischen Zusammenhang zwischen Auflösung und flächenbezogenem Durchsatz

dar. An einem Ende des Spektrums stehen Methoden die einen hohen Durchsatz, aber nur eine geringe Auflösung erzielen. Am anderen Ende stehen Methoden mit ausgezeichneter Auflösung bis hin zur Manipulation einzelner Atome, die jedoch einen geringen Durchsatz aufweisen [24]. Dieser Zusammenhang stellt einen wesentlichen Nachteil konventioneller Lithografiemethoden dar, die nicht dazu geeignet sind einen hohen Durchsatz bei hoher Auflösung zu erzielen. Dies ist jedoch mit nicht-konventionellen Methoden möglich, die beispielsweise auf Selbstorganisation oder Stempeltechniken beruhen (siehe Kapitel 2.2).

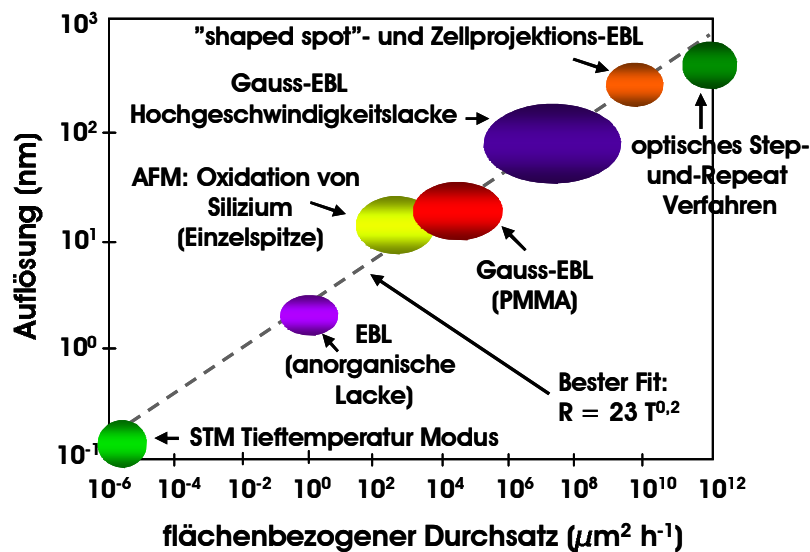


Abb. 2.2: **Auflösung und Durchsatz.** Abhängigkeit der Auflösung vom flächenbezogenem Durchsatz für verschiedene Lithografiemethoden [24].

2.1.1 Elektronenstrahlithografie

Die Elektronenstrahlithografie (engl. electron beam lithography, EBL) verwendet einen fokussierten Elektronenstrahl zur Modifikation eines elektronensensitiven Lackes [25]. Dieser Elektronenstrahl wird in der Regel von der Feldemissionskathode eines Rasterelektronenmikroskops erzeugt und durch eine Steuerungseinheit auf die gewünschte Position der Oberfläche gelenkt. Die EBL ist eine der Schlüsseltechnologien der Halbleitertechnologie und wird standardmäßig zur Herstellung elektronischer Bauteile verwendet [26].

Die Auflösung ist im Gegensatz zur optischen Lithografie nicht maßgeblich durch die Wellenlänge der eingesetzten Strahlung begrenzt. Sie hängt theoretisch von der Wellenlänge des Elektrons ab, welche wie folgt definiert ist:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2emU}} \quad (2.1)$$

- h = Plancksches Wirkungsquantum
- e = Elementarladung des Elektrons
- m = Masse des Elektrons

Die Wellenlänge des Elektrons hängt somit von der verwendeten Beschleunigungsspannung U ab. Tatsächlich wird diese theoretische Auflösung jedoch durch Linsenfehler und Streuung von primären und sekundären Elektronen im Lack und der Oberfläche nicht erreicht. Hierbei wird die Auflösung der Struktur hauptsächlich durch Vorwärtstreuung der Elektronen begrenzt, während rückgestreute Elektronen, die Auflösung der Bereiche zwischen den Strukturen begrenzen [27][28]. Dieser Effekt wird als Proximity-Effekt bezeichnet und führt neben der teilweisen Belichtung der Zwischenbereiche auch zu einer inhomogenen Belichtung der Struktur [29].

Wie aus Gleichung 2.1 ersichtlich, bewirkt eine hohe Beschleunigungsspannung eine hohe Auflösung. Sie führt aber gleichzeitig zu einer geringen Schreibgeschwindigkeit und einer hohen Anzahl gestreuter Elektronen. Diese Streueffekten können durch die Verwendung dünner Lackschichten minimiert werden [30]. Auch die verwendete Elektronendosis, das heißt die Anzahl an Elektronen pro Flächeneinheit, die benötigt wird um die gewünschte chemische Antwort im Lack zu erhalten, sollte zugunsten einer hohen Empfindlichkeit und eines hohen Durchsatzes möglichst gering sein.

Neben den genannten Faktoren kommt auch den Eigenschaften des Lacks große Bedeutung zu, wobei seine Empfindlichkeit und sein Kontrast die wichtigsten Faktoren sind. Der ideale Lack hat sowohl eine hohe Empfindlichkeit als auch einen hohen Kontrast. In der Realität bedingt eine hohe Empfindlichkeit aber einen niedrigen Kontrast und umgekehrt. Somit muss der Lack an die jeweilige Anwendung angepasst werden. Es existieren viele leistungsfähige Lacke zur Herstellung hoch aufgelöster Strukturen. Der organische Lack Polymethylmethacrylat (PMMA) wird standardmäßig für hochauflösende EBL verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Positivlack, dessen lange Polymerketten während der Bestrahlung fragmentieren. Cumming *et al.* konnten unter Verwendung von PMMA schon 1996 die in Abbildung 2.3 links gezeigten Nickelchromlinien mit einer Breite von 3 nm herstellen [31].

Auch selbstorganisierende Monolagen (engl. self assembled monolayers, SAMs) können als Lack verwendet werden. Sie sind aufgrund der hohen Ordnung und der geringen Dicke gut geeignet, um eine hohe Auflösung zu erzielen. Hochaufgelöste Punktstrukturen konnten mit

Octadecylsiloxan-SAMs auf Siliziumoberflächen erzielt werden. Das AFM-Bild in der Mitte von Abbildung 2.3 zeigt die durch den Elektronenstrahl vernetzten schwarzen Bereiche umgeben von unbestrahltem, grauen ODS [32].

Eine weitere wichtige Lackklasse sind so genannte chemisch verstärkte Lacke (engl. chemically amplified resists, CARs). Sie ermöglichen eine hohe Auflösung unter Verwendung niedriger Elektronendosen. Die Löslichkeit wird nicht direkt durch die Bestrahlung verändert, sondern eine gebildete Säure löst erst in einem auf die Bestrahlung folgenden Schritt durch Entschützung einer im Polymer enthaltenen funktionellen Gruppe eine Kaskadenreaktion aus, die die Löslichkeit beeinflusst. So kann eine Auflösung von unter 10 nm erzielt werden. Abbildung 2.3 zeigt dies am Beispiel einer 7,29 nm breiten Lacklinie nach der Entwicklung [33].

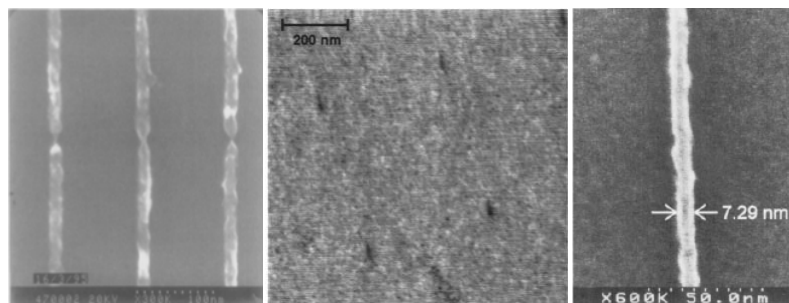


Abb. 2.3: **Auflösung verschiedener Lacke.** Links: REM-Bild von unter Verwendung von PMMA hergestellten 3 nm breiten NiCr-Linien [31], Mitte: AFM-Bild einer punktuell bestrahlten ODS Monolage [32], Rechts: REM-Bild einer Linienstruktur eines chemisch verstärkten Lacks nach der Entwicklung [33].

Seit Ende der Neunziger Jahre werden auch Wasserstoff-Silsesquioxane (engl. hydrogen silsesquioxanes, HSQs) als Negativlacke verwendet [34]. Die Käfigstruktur dieses Moleküls wird bei Bestrahlung aufgebrochen und ein lineares Netzwerk ausgebildet. Diese Lacke ermöglichen es Strukturen mit einer Auflösung von unter 20 nm unter Standardbedingungen zu erzeugen [35]. Durch Optimierung der Elektronenoptik kann diese Auflösung wie in Abbildung 2.4 erkennbar, bis auf 5 nm erhöht werden [36].

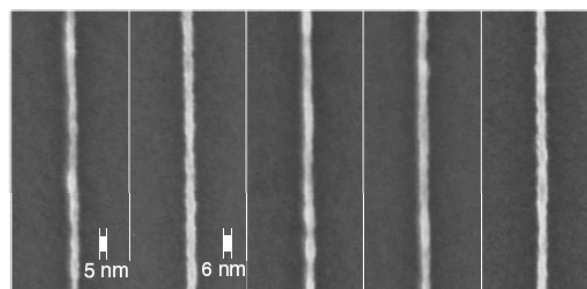


Abb. 2.4: **Wasserstoff-Silsesquioxanlack.** Auflösung von 5 bis 6 nm unter Verwendung von HSQ und optimierter Elektronenoptik [36].

Neben den diskutierten Faktoren leisten auch die auf die Belichtung folgenden Schritte der Entwicklung und Strukturübertragung einen entscheidenden Beitrag zur erfolgreichen Strukturierung einer Oberfläche mit hoher Auflösung.

Die großen Vorteile der Elektronenstrahlithografie sind ihre hohe Auflösung, Präzision und Flexibilität bezüglich der Form und Anordnung der Strukturen. Diesen Vorteilen stehen als Nachteile die hohen Kosten und die aufgrund des seriellen Prozesses im Gegensatz zur optischen Lithografie geringe Geschwindigkeit gegenüber. Somit wird sie vorwiegend für die Herstellung von Masken für die Optische, Ionenstrahl- und Röntgenlithografie oder geringer Stückzahlen spezieller Elektronikbauteile eingesetzt [37]. Eine Möglichkeit die Geschwindigkeit des Prozesses und die erzeugbaren Stückzahlen entscheidend zu erhöhen, besteht darin die Technik der Projektionsbelichtung zu nutzen. Im Gegensatz zum direkten Schreiben wird die Oberfläche dann nicht mittels eines punktuellen Elektronenstrahls belichtet, sondern dieser wird parallel durch eine Maske auf das Substrat projiziert [38][39]. Die Notwendigkeit eines aufwendigen, hochpräzisen Systems ist jedoch ein zusätzlicher Kostenfaktor.

2.1.2 Optische Lithografie

Die Optische Lithografie ist wie die Elektronenstrahlithografie ein Reproduktionsverfahren, um Strukturen auf Oberflächen aufzubringen. Hierzu wird ein sich auf der Oberfläche befindlicher Lack mit Photonen durch eine Maske bestrahlt, wodurch sich die Löslichkeit des Lacks in bestimmten Lösungsmitteln verändert. Es existieren verschiedene Verfahren, die sich in Parametern wie dem Abstand der Maske vom Photolack sowie der verwendeten Wellenlänge unterscheiden.

Das Kontaktbelichtungsverfahren bringt die Maske in direkten Kontakt mit dem Lack während bei der so genannten Proximitybelichtung ein Abstand von ungefähr 10 bis 50 μm verwendet wird, um die Maske wie auch den Lack vor Beschädigung zu schützen. Die Auflösung ist ohne diesen Abstand höher, da der Auflösungsverlust durch Beugung geringer ist. Sie wird jedoch im Wesentlichen von der verwendeten Wellenlänge bestimmt [40]. Des Weiteren kann die technisch aufwendigere Projektionsbelichtung verwendet werden, die die Strukturen der Maske durch ein Linsensystem auf die Oberfläche projiziert und diese so verkleinert. Dieses Verfahren führt in der Regel zu einer Verkleinerung im Maßstab 5:1 oder 4:1.

Die Auflösungsgrenze, das heißt die erzeugbare minimale Strukturgröße R , eines optischen Projektionssystems ist durch die Rayleigh Gleichung bestimmt:

$$R = \frac{k_1 \lambda}{NA} \quad (2.2)$$

Hierbei ist λ die verwendete Wellenlänge, NA die numerische Apertur des Linsensystems und k_1 eine prozessabhängige Konstante. Diese Gleichung zeigt, dass eine Verbesserung der Auflösung sowohl durch Verwendung einer kleineren Wellenlänge als auch durch Erhöhung der numerischen Apertur möglich ist [41].

Der Einsatz von KrF- sowie ArF-Excimerlasern mit Wellenlängen von 248 nm beziehungsweise 193 nm ermöglicht es Strukturbreiten von unter 50 nm herzustellen. Durch weitere Verringerung der Wellenlänge kann die Auflösung weiter verbessert werden. Sowohl mittels F_2 Lasern erzeugte 157 nm Strahlung als auch als EUV (Extremes Ultraviolett) bezeichnete weiche Röntgenstrahlen mit einer Wellenlänge von 13 nm können hierzu verwendet werden. Der Einsatz dieser Wellenlängen erfordert allerdings unter anderem die Entwicklung neuer Photolacke und Optiken [42,43]. Im Fall der Verwendung weicher Röntgenstrahlen muss der Prozess zusätzlich im Hochvakuum ablaufen und eine geeignete Strahlungsquellen zur Verfügung stehen. Trotz der mittels der 157 nm Technik erzielbaren hohen Auflösung hat die Industrie deren Kommerzialisierung 2004 gestoppt [44]. Die EUV Technik hingegen hat in der industriellen Anwendung großes Potential [45].

Aktuell wird vorwiegend Immersionslithografie zur Erzeugung kleiner Strukturen verwendet. Diese verringert die effektive Wellenlänge der 193 nm Technik durch Erhöhung der numerischen Apertur. Sie entspricht der Projektionsbelichtung, weist jedoch den Unterschied auf, dass sich zwischen Projektionslinse und Lack ein Immersionsmedium, in der Regel Reinstwasser, befindet. Dieses erhöht durch seinen im Vergleich mit Luft größeren Brechungsindex die numerische Apertur und somit die Auflösung. Zurzeit werden mittels der 193 nm Immersionstechnik Strukturgrößen von 32 nm erreicht [46,47].

Als Vorteile der Optischen Lithografie sind der im Gegensatz zur Elektronenstrahlithografie hohe Durchsatz sowie die weite Verbreitung der Technologie zu nennen. Diese Faktoren machen sie in der Massenfertigung relativ kostengünstig. Die Auflösung ist jedoch im Vergleich zur Elektronenstrahlithografie sowie einiger nicht-konventioneller Methoden geringer. Nachteile bestehen auch in der Beschränkung auf planare, photoreaktive Oberflächen und den hohen Kosten.

2.2 Unkonventionelle Methoden

Der technische und finanzielle Aufwand konventioneller Methoden ist vergleichsweise hoch. Ein weiterer Nachteil ist die Beschränkung ihrer Anwendbarkeit auf ausgewählte Materialien, wie Halbleiter und planare Oberflächen (siehe oben). Zusätzlich setzen diese Techniken die zu strukturierenden Materialien korrosiven Ätzmitteln, hochenergetischer Strahlung, Vakuum oder hohen Temperaturen aus. Empfindlicher Materialien wie Proteine erfordern schonendere Prozesse. Unkonventionelle Methoden bieten hier leistungsstarke und effektive Alternativen.

2.2.1 Stempeltechniken

Die im Folgenden vorgestellten Methoden sind nicht-konventionelle Lithografiertechniken, die einen Stempel verwenden, um Oberflächen mit hoher Auflösung zu strukturieren. Die Verwendung des Stempels ermöglicht einen parallelen Prozess und somit hohen Durchsatz. Zusätzlich können auch nicht planare Oberflächen verwendet werden, der technische Aufwand ist gering und die Verwendung einfach. Die Kombination aus niedrigen Kosten und einfacher Anwendung macht sie zu aussichtsreichen Methoden für eine zukünftige Verwendung in verschiedensten Disziplinen. Die präsentierten Methoden des Mikrokontaktstempeln und der Nanoprägelithografie stellen die beiden wichtigsten und am häufigsten verwendeten Vertreter dar.

2.2.1.1 Mikrokontaktstempeln

Die Methode des Mikrokontaktstempeln (engl. micro contact printing, μ CP) wurde 1993 von Whitesides *et al.* als neue Methode zur Strukturierung von selbstorganisierenden Monolagen auf Metalloberflächen eingeführt [48]. Sie wird aufgrund der heutzutage erzielbaren Auflösung von bis zu 30 nm teilweise auch als Nanokontaktstempeln bezeichnet [22,49,50]. Es handelt sich um eine lithografische Methode zur schnellen und einfachen Vervielfältigung von Strukturen. Sie kann heute zur strukturierten Abscheidung organischer sowie anorganischer Moleküle, verschiedener Biomoleküle, Polymere, Kolloide und auch Zellen verwendet werden [22][51]. Proteinstrukturen mit einer Auflösung von bis zu 40 nm sowie das Stempeln verschiedener Proteine zur Erzeugung eines so genannten Proteinarrays sind möglich.

Das hinter der Technik stehende Konzept ist einfach. Ein meist aus Polydimethylsiloxan (PDMS) bestehender, strukturierter Stempel wird verwendet um Moleküle durch die Ausbildung kovalenter Bindungen auf eine Oberfläche zu übertragen. Der flexible Stempel wird hierzu mit der als "Tinte" bezeichneten Lösung des zu übertragenden Moleküls benetzt, getrocknet und in Kontakt mit der Oberfläche gebracht. Die Struktur des Stempels überträgt sich so auf das Substrat [52].

Die Auflösung der Strukturen wird neben der Qualität des Stempels maßgeblich von der Oberflächendiffusion der als "Tinte" verwendeten Moleküle begrenzt [53]. Diesem Problem wirkt ein als Autophobie bezeichneter Effekt entgegen. Er beruht auf der verändernden Grenzflächenenergie der ausgebildeten Monolage an den Grenzen der Struktur und verhindert die Oberflächendiffusion der Moleküle. Der Effekt muss möglichst schnell eintreten um scharfe Strukturen zu garantieren [54]. Larsen *et al.* konnten zeigen, dass gestempelte Dodecanthiol-Monolagen auf Gold schon nach 0,3 s nicht von bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes inkubierten, homogenen Monolagen unterscheidbar sind [55].

Die Oberflächendiffusion und ihre Begrenzung durch Autophobie hängen von den Eigenschaften der verwendeten "Tinte" sowie den Bedingungen während des Stempelprozesses ab. Eine Inkubation in Wasser und lange Stempelzeiten führen beispielsweise zu starker Oberflächendiffusion und somit zu einer Verkleinerung des Abstandes zwischen den Strukturen [49]. Die Verwendung von Tinten mit hohem Molekulargewicht führt zu einer deutlichen Minimierung der Diffusion aufgrund des kleineren Diffusionskoeffizienten [56].

Der Prozess kann auch durch die Verwendung tintenfreier Systeme optimiert werden [57][58]. Erst vor kurzem gelang es Shestopalov *et al.* durch Verwendung eines Polyurethanacrylat Stempels mit kovalent gebundenen Sulfonsäuren säurelabile Schutzgruppen wie Boc und TBS erfolgreich zu entschützen (Abb. 2.5). Die Auflösung dieses tintenfreien Systems, das eine katalytische Reaktion zwischen Stempel und Substrat verursacht, liegt heute unterhalb von 50 nm und ist theoretisch nur durch das verwendete Substrat begrenzt [59].

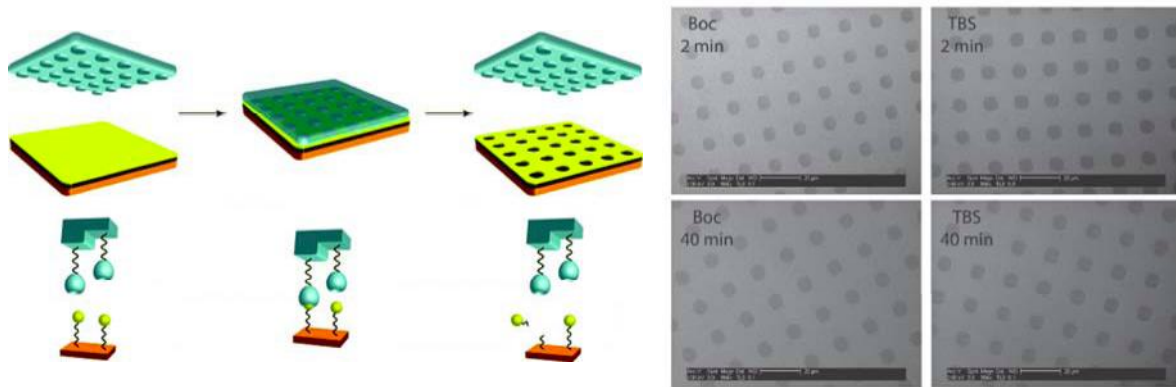


Abb. 2.5: **Tintenfreies Mikrokontaktstempeln.** Links: kovalent an den Stempel gebundene Sulfonsäuren entschützen säurelabile Schutzgruppen auf der Oberfläche, rechts: REM Bilder von strukturierten Boc- und TBS-Substraten ($6,5 \mu\text{m}$ Punktdurchmesser) [59].

Neben der Oberflächendiffusion ist die Qualität des Stempels limitierend für die Erzeugung hochaufgelöster Strukturen. Sie wird einerseits durch die Auflösung der mittels Optischer oder Elektronenstrahlolithografie (siehe 2.1.1 und 2.1.2) erzeugten Abgussform zu seiner Herstellung und andererseits vom verwendeten Material limitiert. Eine Verformung der Strukturen aufgrund eines zu weichen Stempels begrenzt die Auflösung [60]. Zur Anwendung der Technik im Nanometerbereich können jedoch stabilere PDMS Varianten und deren Mischungen verwendet werden [61].

Die Vorteile des standardmäßigen μCPs bestehen vor allem in der einfachen Handhabung, dem hohen Durchsatz, dem geringen apparativen Aufwand und den geringen Kosten. Einzig die Herstellung der Abgussformen erfordert Reinraumbedingungen. Diese parallele Methode ermöglicht die großflächige Herstellung strukturierter Oberflächen im Mikrometerbereich und kann auch auf gekrümmten Oberflächen verwendet werden [62,63].

2.2.1.2 Nanoprägelithografie

Die Nanoprägelithografie (engl. nano imprint lithography, NIL) stellt aufgrund ihrer Fähigkeit zur Herstellung hochaufgelöster Strukturen mit hohem Durchsatz bei geringen Kosten eine interessante Methode zur Oberflächenstrukturierung dar [64]. Die Technik verwendet wie das μCP einen Stempel, der jedoch nicht zur Übertragung von Material, sondern zur mechanischen Deformation des Substrates verwendet wird. Die erzielbare Strukturgröße und Auflösung liegt im Bereich von 30 nm und unter 10 nm und ist somit vergleichbar mit der der EBL [65][66]. Unter Verwendung von Kohlenstoffnanoröhren kann sogar molekulare Auflösung erzielt werden [67].

Es werden zwei prinzipielle Techniken unterschieden: 1) thermische Nanoprägelithografie und 2) Ultraviolett-Nanoprägelithografie (UV-NIL):

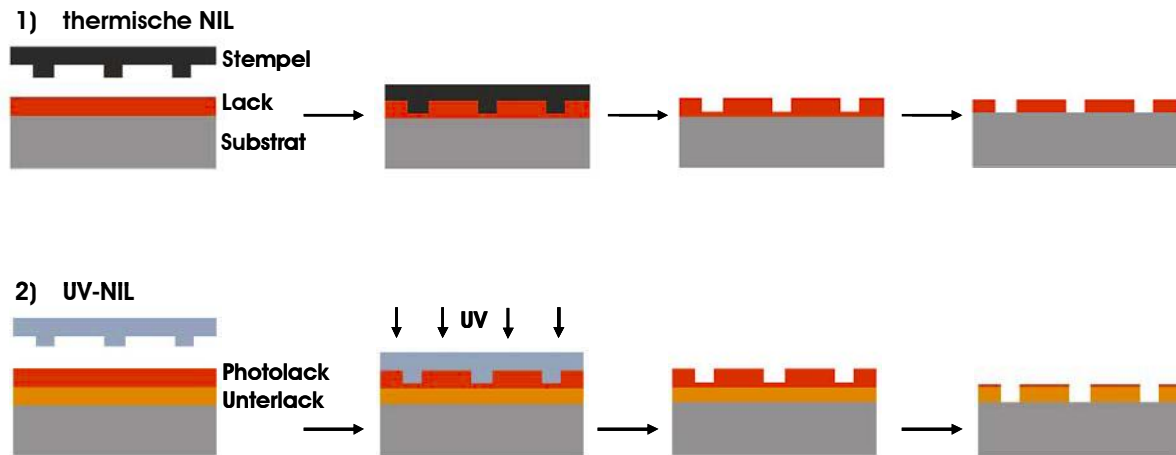


Abb. 2.6: **Nanoprägelithografie** 1) thermische Nanoprägelithografie: die Struktur des Stempels wird durch Kontakt mit dem erwärmten Lack in diesen eingepreßt und bis zur Oberfläche durchgeätzt; 2) UV-Nanoprägelithografie: die Struktur des Stempels wird durch Belichtung mit UV-Strahlung auf den Photolack übertragen und durch Ätzen des stabileren Unterlackes auf diesen übertragen [68].

Beim thermischen Verfahren werden Strukturen durch physikalische Deformation eines auf der Oberfläche immobilisierten, erwärmten Polymers oder Monomers übertragen. Abbildung 2.6 zeigt im oberen Teil den Prozess. Der auf das Substrat aufgebraute Lack wird über die Glasübergangstemperatur T_g erwärmt und der strukturierte Stempel in diese Schicht gedrückt. Nach Abkühlen unter T_g und Entfernung des Stempels bleibt das ausgehärtete Negativ zurück. Bei diesem Vorgehen bleibt ein dünner Polymerfilm zwischen dem Substrat und den Stempelstrukturen zurück, der für die meisten Anwendungen im letzten Schritt durch Trockenätzen entfernt werden muss.

Qualität und Auflösung der erzeugten Strukturen hängen hauptsächlich von der Qualität und Auflösung des Stempels ab [69]. Eine hohe Auflösung kann erzielt werden, wenn die Herstellung des Stempels mittels EBL oder unter Verwendung kleiner Template wie beispielsweise Kohlenstoffnanoröhren erfolgt [70]. Abbildung 2.7 zeigt Arbeiten von Chou *et al.* und Häffner *et al.* zur Anwendung des Prozesses zur Herstellung hochauflöser Loch- und Linienstrukturen [65][71].

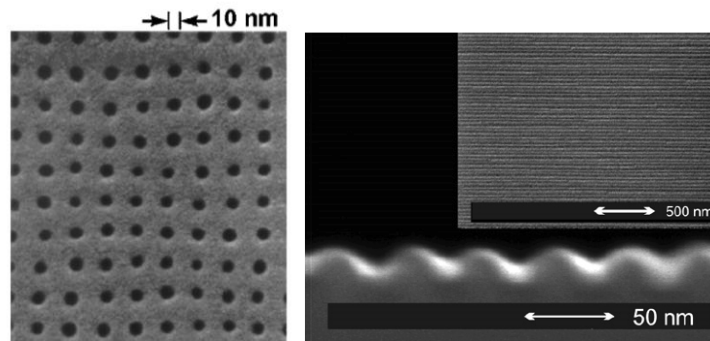


Abb. 2.7: **Hochaufgelöste Strukturen.** Links: REM-Bild von in PMMA eingepprägten Löchern mit einem Durchmesser von 10 nm, rechts: REM-Bilder der Drauf- und Seitenansicht von in PMMA eingepprägten Linien mit einem Abstand von 40 nm [65][71].

Die Anwendung des thermischen Verfahrens ist mittlerweile nicht mehr auf organische Beschichtungen beschränkt. Auch dünne Silizium- oder Metallschichten können strukturiert werden, indem der Puls eines Excimer-Lasers zum Schmelzen verwendet wird [72][73].

Die Ultraviolett-Nanoprägelithografie verwendet im Gegensatz zur thermischen Methode ein Zweischichtsystem, bestehend aus einem relativ instabilen Photolack und einem stabileren Unterlack (Abb. 2.6 unten). Die photoaktive Schicht dieser Substrate wird bei Raumtemperatur durch transparente Masken, z. B. Quarz Stempel, mit UV Licht quervernetzt. Nach Aushärtung und Entfernung des Stempels bleibt der strukturierte Photolack zurück und kann durch einen nachfolgenden Ätzschritt auf den darunter liegenden Unterlack übertragen werden. Diese Technik hat gegenüber dem thermischen Verfahren diverse Vorteile. Die Positionierung der Strukturen ist im Vergleich zum thermischen Verfahren deutlich präziser und die Überlagerungswahrscheinlichkeit geringer. Des Weiteren können sowohl harte als auch weiche Substrate bis hin zu Flüssigkeiten verwendet werden, der Prozess findet bei Raumtemperatur statt und ist bis zu fünfmal schneller als die thermische NIL [74].

Die Nanoprägelithografie findet Anwendung in den verschiedensten Bereichen. Die Herstellung von Dünnschichttransistoren [75] wie auch die Produktion superhydrophober, nicht-reflektierender Oberflächen [76] sind nur zwei Beispiele ihres Einsatzes zur Erzeugung innovativer Materialien. Auch auf dem Gebiet der biologischen Anwendungen wird diese Methode verwendet. Beispiele sind DNS-Streckung in Nanokanälen, [77][78] Proteinstrukturierung [79][80][81] und die Untersuchung des Effektes von Nanostrukturen auf Zellkulturen [82][83].

Die Vorteile der Nanoprägelithografie sind der im Vergleich mit konventionellen Lithografiemethoden deutlich geringere technische Aufwand, die resultierenden geringen

Kosten, der vergleichsweise hohe Durchsatz bei gleichzeitig hoher Auflösung sowie die Möglichkeit in einem Schritt dreidimensionale Strukturen zu erzeugen. Es bestehen aber auch einige sich aus dem Kontaktverfahren ergebende Nachteile. Verglichen mit Projektionsverfahren wie der Optischen Lithografie sind die Wahrscheinlichkeiten von Strukturüberlagerungen und Verunreinigungen höher und der Durchsatz geringer. Da die Auflösung aber deutlich höher und die Auflösungsgrenze der Optischen Lithografie so gut wie erreicht ist, stellt die Nanoprägelithografie eine zukunftssträchtige Technik dar [74].

2.2.2 Rasterkraftmikroskop-basierte Techniken

2.2.2.1 Nanoshaving/Nanografting

„Nanoshaving“ und „Nanografting“ sind zwei Bezeichnungen für Lithografiertechniken, die nahezu identisch sind. Beide Verfahren verwenden die Spitze eines Rasterkraftmikroskops (engl. atomic force microscope, AFM) um selektiv Moleküle aus einer selbstorganisierten Monolage zu entfernen. Wie in Abbildung 2.8 dargestellt umfasst die als „Nanoshaving“ bezeichnete Technik ausschließlich den Prozess des Schreibens einer Struktur unter Entfernung der Moleküle, während die freigelegten Bereiche beim „Nanografting“ sofort wieder aufgefüllt werden [84,85]. Somit findet der „Nanografting“ Prozess immer in einer Lösung von Molekülen statt, die sich von denen der Monolage unterscheiden. Diese adsorbieren an die Oberflächenbereiche, die durch die AFM Spitze freigelegt werden. Es können Strukturgrößen unterhalb von 10 nm realisiert werden [86].

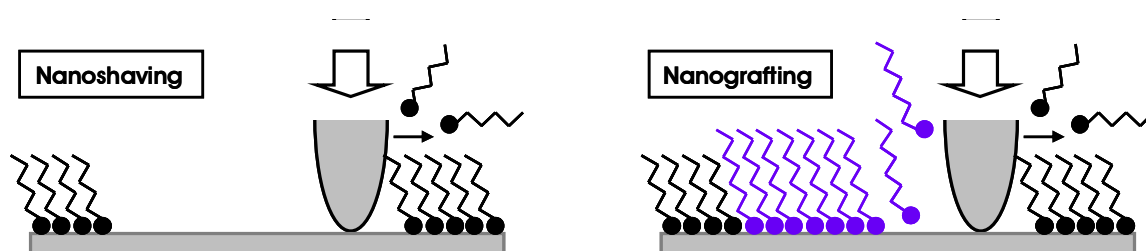


Abb. 2.8: **Prinzip des Nanoshaving und Nanografting.** Selektive Entfernung von Molekülen aus einer geordneten Monolage mittels einer AFM-Spitze und Auffüllen der Bereiche mit einem anderen Molekül [84].

Die Erzielung eines hohen Durchsatzes bei der Erzeugung komplexer Strukturen ist durch Automatisierung möglich. Das in Abbildung 2.9 dargestellte Emblem der University of California, Davis konnte in nur 10 min durch Nanografting eines Aldehyd-terminierten Thiols in einem Matrixthiol hergestellt werden. Die feinsten Elemente haben einen Durchmesser von nur 10 nm [87]. Auch die Anbindung von Proteinen in durch Nanoshaving freigelegte Be-

reiche ist möglich. Ein Beispiel hierfür ist die in Abbildung 2.9 gezeigte quadratische Struktur, die durch Nanografting von Maltosebindungsprotein entsteht [88].

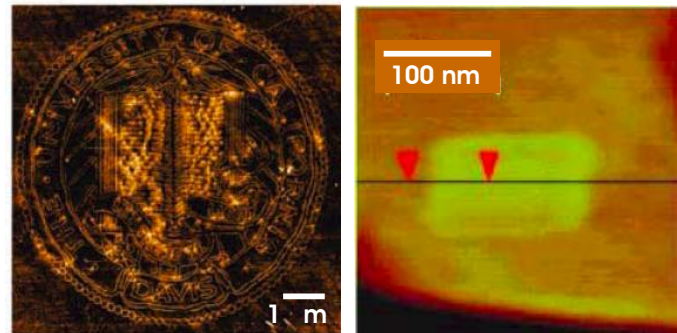


Abb. 2.9: **Durchsatz und Auflösung.** Links: AFM Bild des mittels Nanografting hergestellten Emblems der University of California, Davis [87], rechts: AFM Bild einer quadratischen Maltosebindungsproteinstruktur in einer Polyethylenglykol-Thiol Matrix [88].

Neben der Strukturierung von Thiolmonolagen kann Nanografting auch für DNA, Proteine und Metallnanopartikel verwendet werden [89]. Besonders das für viele Anwendungen interessante Gebiet der Proteinstrukturierung ist Gegenstand aktueller Forschung. Sowohl die direkte Anbindung über Thiolgruppen als auch die indirekte Anbindung, beispielsweise über aktivierte Carbonsäuren, sind möglich [88,90,91]. Ein neuer Ansatz von Bano *et al.* nutzt die Hybridisierung von DNS zur Proteinanbindung. Diese Strategie kann in Zukunft für die gleichzeitige Übertragung verschiedener Proteine verwendet werden [92].

2.2.2.2 Dip-Pen Nanolithografie

Die Dip-Pen Nanolithografie (DPN) ist eine weitere Methode zur Strukturierung von Oberflächen unter Verwendung eines Rasterkraftmikroskops. Moleküle wie beispielsweise Alkanthiole werden mittels dieser Technik von der AFM Spitze über Kapillarkräfte direkt auf die Oberfläche übertragen. Dieses Prinzip entspricht dem des Schreibens mit einem Stift auf Papier. Die DPN nutzt hierzu einen sich durch Kondensation bildenden Wassermeniskus zwischen Probe und Spitze für den Transport von Molekülen (Abb. 2.10). Diese werden aufgrund ihrer chemischen Affinität zum Substrat an die Oberfläche gebunden. Die Triebkraft des Prozesses ist der chemische Gradient zwischen Spitze und Oberfläche [93,94]. Die DPN erlaubt es eine Vielzahl verschiedener Moleküle zur Strukturierung zu nutzen. Neben kleinen organischen Molekülen können unter anderem Polymere, DNS, Peptide, Proteine, Kolloide sowie Metallionen als Tinte verwendet werden [95].

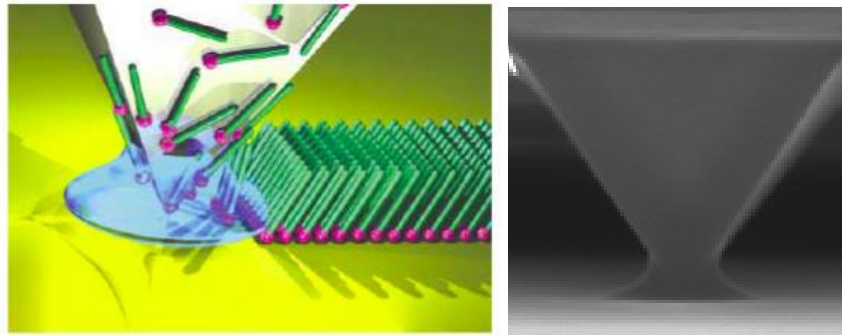


Abb. 2.10: **Prinzip der Dip-Pen Nanolithografie.** Ein Wassermeniskus bildet sich zwischen Spitze und Substrat, so dass Moleküle auf die Oberfläche übertragen werden können [95,96].

Die DPN kommt im Gegensatz zu anderen Lithografiertechniken ohne Maske, Lack und Stempel aus und aus der Verwendung des AFMs resultiert eine sehr hohe Auflösung. Strukturen mit einer Strukturbreite von 15 nm sind erzielbar [94]. Das Verfahren ist komplementär zum μ CP, da verschiedene Moleküle mit hoher Ortsauflösung auf eine Oberfläche aufgebracht werden können. Die Auflösung hängt unter anderem von den chemischen Eigenschaften der Oberfläche und der Spitze, der Luftfeuchtigkeit, der Temperatur, der Verweilzeit und der Rastergeschwindigkeit ab [97]. Neue Untersuchungen zeigen, dass selbst die Anzahl übertragener Moleküle kontrolliert werden kann [98].

Im Gegensatz zum μ CP, einem parallelen Stempelprozess, ist die Standard DPN jedoch eine serielle und somit langsame und auch teure Technik. Ansätze zur Parallelisierung unter Verwendung von Spitzenarrays mit bis zu 11 Millionen Spitzen erhöhen die Geschwindigkeit enorm. Diese Systeme können bis zu 7 Trillionen Strukturen pro Minute schreiben [99,100,101]. Des Weiteren werden Methoden zur gleichzeitigen Übertragung verschiedener Tinten entwickelt [102].

Proteine können mittels DPN direkt wie auch indirekt mit Strukturgrößen von unter 50 nm auf eine Oberfläche aufgebracht werden. Die indirekte Methode schreibt Strukturen kleiner organischer Moleküle und bindet die Proteine direkt als auch nach Einführung einer funktionellen Gruppe zur molekularen Erkennung über diese an [103,104,105,106]. Auf diesem Weg ist es jedoch schwierig verschiedene Proteine zu übertragen. Beim direkten Verfahren hingegen können relativ einfach Multikomponentenstrukturen unter Vermeidung von Kreuzkontamination erzeugt werden [107,108,109]. Beispiele sind die in Abbildung 2.11 gezeigten Zweikomponentensysteme. Lee *et al.* konnten die links gezeigten Strukturen zweier IgG-Antikörper erzeugen und mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisen [107]. Lim *et al.* stellten unter Verwendung von DPN IgG- und Lysozymstrukturen her und wiesen dies über die selektive Anbindung von anti-IgG an IgG im Rasterkraftmikroskop nach [108].

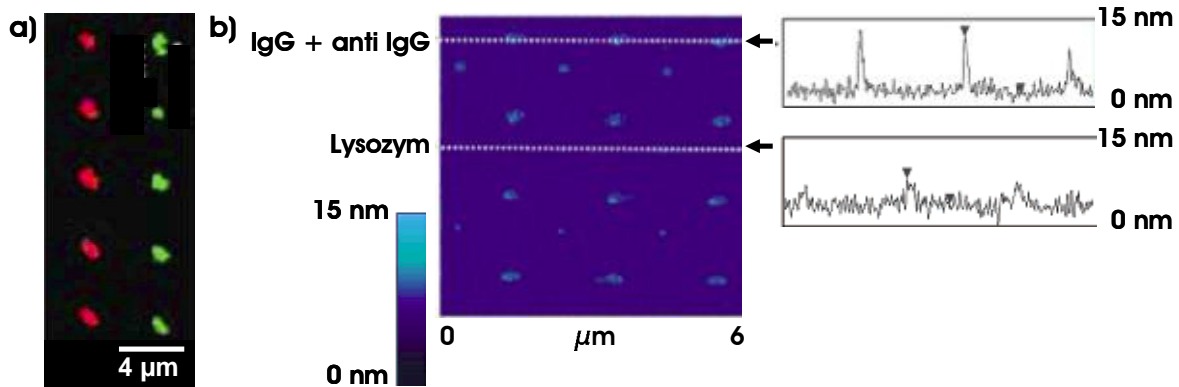


Abb. 2.11: **Zweikomponenten-Proteinstrukturen.** a) anti-rabbit IgG markiert mit Alexa594 (rot) und anti-human IgG markiert mit Alexa488 (grün), b) IgG- und Lysozymstrukturen nach Reaktion mit anti-IgG: Nach Anbindung von anti-IgG wird im AFM ausschließlich in IgG Bereichen ein Höhenunterschied von 5,5 nm beobachtet [107,108].

Senesi *et al.* haben vor kurzem eine viel versprechende Variante der DPN unter Verwendung einer wässrigen Agarosematrix als Stabilisator und Trägerstoff von Proteinen und DNS entwickelt. Sie erzeugen identische Strukturgrößen zweier Modellproteine bei gleichen Kontaktzeiten, obwohl sich die Diffusionseigenschaften der reinen Proteine unterscheiden. Diese Technik ermöglicht die einfache Strukturierung großer Makromoleküle und zusätzlich die gleichzeitige Strukturierung verschiedener Proteine. Zudem ist die Technik mit Geschwindigkeiten von bis zu $1,5 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ drei Größenordnungen schneller als Proteinabscheidung ohne Matrix [110].

2.2.3 Selbstorganisation

Das Konzept der Selbstorganisation zum Aufbau hochkomplexer Systeme ist in der Natur weit verbreitet. Die Faltung von Proteinen, [111] die Ausbildung der DNS-Doppelhelix [112] wie auch die Organisation von Phospholipiden zu Zellmembranen [113] sind nur einige Beispiele. Die Ausbildung dieser Strukturen beruht auf der spontanen Aggregation und Organisation ihrer Untereinheiten. Die diesen Prozess steuernden Informationen sind in den Untereinheiten in Form von Topologie, Ladung, Polarisierbarkeit, Funktionalitäten, etc. codiert. Sie bestimmen die Wechselwirkungen der Komponenten und führen durch Minimierung der Systemenergie zur selbstorganisierten Struktur. Da dieser Zustand sich im oder nah am thermodynamischen Gleichgewicht befindet, läuft der Prozess spontan ab und es entstehen wenige Defekte [114]. Molekulare Selbstorganisation beruht auf nicht-kovalenten oder schwach kovalenten Wechselwirkungen wie van-der-Waals, elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken und koordinativen Bindungen.

Da der Selbstorganisationsprozess die Mobilität der Komponenten voraussetzt, laufen die Prozesse in der Regel auf einer Oberfläche oder in Lösung ab.

Selbstorganisierende Monolagen (SAMs) sind eins der am intensivsten untersuchten Beispiele nicht-biologischer selbstorganisierender Systeme. Sie können auf einfachem Weg hergestellt werden, indem das Substrat in einer Lösung des reaktiven Liganden inkubiert oder der Gasphase einer reaktiven Spezies ausgesetzt wird. Die Selektivität der Ankergruppen gegenüber dem verwendeten Substratmaterial ermöglicht die orthogonale Anbindung verschiedener Spezies. Die am besten untersuchten Systeme sind Alkanthiole auf Gold und Silber sowie Alkylsilane auf Hydroxyl-terminierten Oberflächen wie Silizium, Siliziumdioxid und Glas [115,116]. Ein weiteres Beispiel der Verwendung selbstassemblierender Moleküle sind Block Copolymere und ihre Anwendung zur Herstellung strukturierter Oberflächen bis hin zu photonischen Kristallen [117][118][119].

Seit einigen Jahren wird verstärkt DNS verwendet um komplexe selbstorganisierende Strukturen aufzubauen. Sie kann als Templat komplexer Systeme dienen. Rothemund *et al.* gelang es 2006 als ersten das Genom eines Virus in zweidimensionalen Strukturen zu organisieren und im AFM zu untersuchen [120].

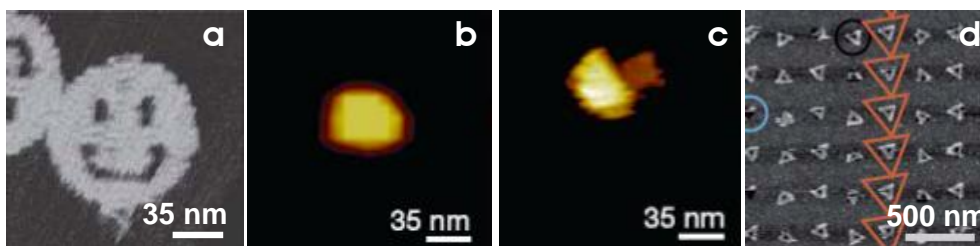


Abb. 2.12: **DNS-Origami.** a) AFM Bild einer zweidimensionalen DNS-Smileystruktur, b, c) AFM Bild der geschlossenen und geöffneten DNS Box, d) auf einer lithografisch strukturierten Oberfläche immobilisierte DNS-Dreieckstrukturen [120,122,123].

Abbildung 2.12 a zeigt eine der erzeugten Strukturen. Die in Lösung ablaufende, als DNS Origami bezeichnete Methode wurde seitdem weiterentwickelt und kann heute verwendet werden, um Strukturen mit praktischem Nutzen herzustellen. Ein "Lineal" zur Kalibrierung superhochauflösender Mikroskope sowie eine dreidimensionale Box, die bei Bedarf geöffnet und so als Wirkstofftransporter dienen kann, können hergestellt werden [121,122]. AFM Bilder der geschlossenen wie auch geöffneten Box sind in Abbildung 2.12 b und c zu sehen. Es ist des Weiteren möglich hergestellte Strukturen gezielt auf strukturierten

Oberflächen zu immobilisieren (Abb. 2.12 d) und mit DNS-funktionalisierten Kolloiden zu dekorieren [123,124].

Die entwickelten Techniken und deren Weiterentwicklung werden in Zukunft mit Sicherheit Zugang zu noch weitaus komplexeren Systemen ermöglichen. Denkbar sind die Herstellung eines künstlichen Blatts zur Umwandlung von Wasser zu Wasserstoff wie auch ein künstliches Ribosom mit der Fähigkeit maßgefertigte Enzyme zu synthetisieren [125].

Im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Methoden handelt es sich bei der Strukturierung von Materialien mittels Selbstorganisation um einen "bottom-up" Ansatz. Das Design beziehungsweise die Auswahl der Komponenten, die im Selbstorganisationsprozess zu den gewünschten Strukturen führen, ist ein wichtiger Aspekt bei der Anwendung dieses Konzepts. Neben Molekülen können diverse Objekte zum Aufbau komplexer Strukturen verwendet werden und die Kombination mit "top-down" Methoden bietet weitere Möglichkeiten. Erst vor kurzem gelang die Selbstorganisation zweidimensionaler, strukturierter Nickel-Zinn Netze zu den in Abbildung 2.13 gezeigten Würfelstrukturen durch eine Kombination von EBL und Plasma unterstützter Selbstorganisation. Diese sind sehr stabil und können nach der Herstellung von der Oberfläche abgelöst werden [126].

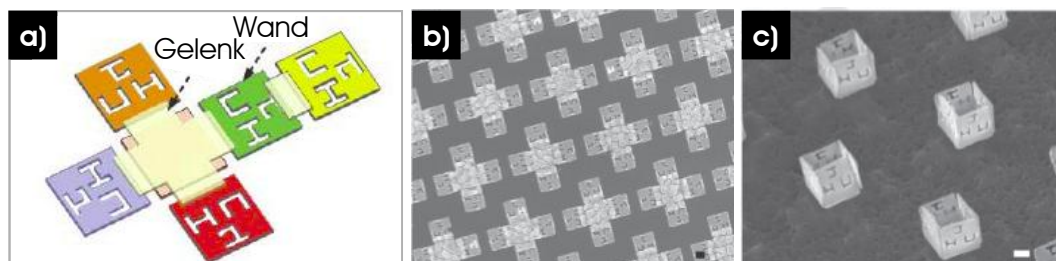


Abb. 2.13: **Kombination von EBL und Selbstorganisation.** a) Schematische Darstellung eines EBL-strukturierten, zweidimensionalen Nickel-Zinn-Netzes, b, c) REM Bilder der strukturierten Netze auf einer Siliziumoberfläche vor und nach Plasma-unterstützter Selbstorganisation [126].

3. Methoden zur Oberflächencharakterisierung

Zur Charakterisierung von Materialien im Nanometerbereich sind hochpräzise mikroskopische und spektroskopische Methoden unabdingbar. In dieser Arbeit wurden verschiedene Techniken verwendet um nanostrukturierte Oberflächen zu untersuchen. Diese werden in diesem Kapitel vorgestellt. Es handelt es sich um Rasterelektronenmikroskopie, Röntgenphotoelektronenspektroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und die Quarzkristallmikrowaage. Diese leistungsstarken Methoden liefern unterschiedliche Informationen und ergänzen sich gegenseitig. Sie ermöglichen neben der Abbildung von Partikeln und Lokalisierung von Proteinen, die Analyse der Elementzusammensetzung einer Oberfläche sowie die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen und Adsorptionsvorgänge.

3.1 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) ermöglicht die Abbildung einer Oberfläche mit einer Auflösung im Nanometerbereich sowie die simultane Analyse ihrer atomaren Zusammensetzung.

Hierzu wird, wie in Abbildung 3.1 links gezeigt, ein mittels einer Elektronenkanone erzeugter Elektronenstrahl im Vakuum von einem elektrischen Feld von bis zu 30 kV beschleunigt und mithilfe von Magnetlinsen oder elektrostatischen Linsen auf das Substrat fokussiert. Dieser rastert die Oberfläche ab, wobei die Wechselwirkung der Elektronen mit der Probe zur Erzeugung eines Bildes genutzt wird. Hierbei wird das Bild Zeile für Zeile rekonstruiert.

Wie in Abbildung 3.1 rechts dargestellt, kommt es durch die Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit dem Substrat in einem tropfenförmigen Bereich zu verschiedenen Wechselwirkungen. Sehr nah an der Oberfläche werden Auger-Elektronen erzeugt. Darunter entstehen Sekundärelektronen sowie rückgestreute Elektronen als auch charakteristische Röntgenstrahlen. Das gesamte Profil ist in einen Kegel aus Bremsstrahlung und Fluoreszenz durch Röntgenstrahlung eingebettet. Die Größe des gesamten Wechselwirkungsvolumens hängt sowohl von der Beschleunigungsspannung als auch der Ordnungszahl der Substratatome ab [127].

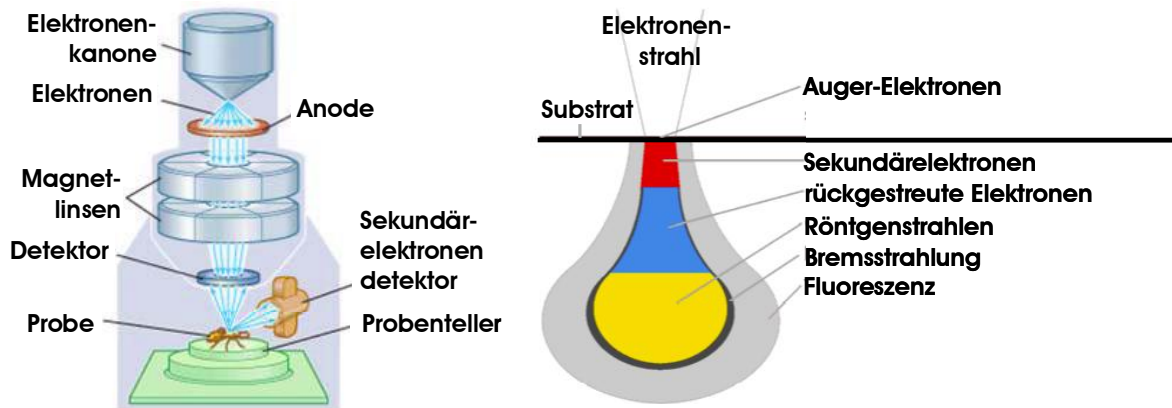


Abb. 3.1: **Rasterelektronenmikroskopie**. links: Schematische Darstellung eines Rasterelektronenmikroskops, rechts: Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit dem Substrat [128].

In einem REM werden sowohl rückgestreute als auch sekundäre Elektronen für die Erzeugung topographischer Bilder genutzt.

Rückgestreute Elektronen entstehen durch Streuung der eingestrahlteten Elektronen an den Atomkernen der Substratatome. Ihre Energie liegt zwischen 50 eV und der Energie der Primärelektronen und sie werden durch einen über der Probe positionierten Detektor analysiert. Das Verhältnis von rückgestreuten zu eingestrahlteten Elektronen hängt stark von der Ordnungszahl des Substratmaterials ab. Je höher diese ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für Rückstreuung, so dass Elemente hoher Ordnungszahl in der Abbildung heller erscheinen. Somit lässt die Helligkeitsverteilung Rückschlüsse auf die chemische Natur der Oberfläche zu.

Sekundärelektronen sind niederenergetische Elektronen mit Energien im Bereich einiger Elektronenvolt, die durch inelastische Wechselwirkungen des Elektronenstrahls mit der Probe entstehen. Sie stammen aus den äußeren Schalen der Atome, die mit eingestrahlteten Primärelektronen oder rückgestreuten Elektronen kollidieren. Die Anzahl an Sekundärelektronen ist nahezu unabhängig von der Ordnungszahl des Materials. Somit ist der Materialkontrast schwächer als bei rückgestreuten Elektronen (siehe oben). Sekundärelektronen werden durch einen Sekundärelektronendetektor, der oft seitlich über der Probe positioniert ist, detektiert. Durch diese Anordnung werden vermehrt seitlich aus Strukturen austretende Elektronen detektiert, wodurch ein hoher räumlicher Kontrast und eine topographische Abbildung erzielt werden [129].

Die Emission eines Sekundärelektrons und das Auffüllen des entstehenden Lochs in der Atomhülle durch ein Elektron aus einer höher liegenden Schale, führen zur Emission charakteristischer Röntgenstrahlung. Diese kann unter Verwendung eines energiedispersiven Rönt-

genstrahldetektors (engl. energy dispersive x-ray detector, EDX) Aufschluss über die chemische Zusammensetzung der Oberfläche liefern.

Zur Erzeugung des Primärelektronenstrahls können verschiedene Techniken eingesetzt werden. Eine preisgünstige sowie einfache Möglichkeit stellt die Anwendung einer Glühkathode dar. Diese wird erhitzt bis die Energie der Elektronen größer ist als die Austrittsarbeit, so dass Elektronen emittiert werden. Im Anschluss werden sie in einem durch einen Wehnelt Zylinder erzeugten elektrischen Feld beschleunigt. Alternativ kann eine Feldemissionskathode eingesetzt werden, die deutlich größere Elektronendichten erzeugt. In diesem Fall tunneln die Elektronen durch Anlegen eines sehr hohen elektrischen Feldes an eine sehr feine Wolframspitze aus dieser heraus. Durch zusätzliches Heizen der Kathode (Schottky Feldemitter) kann die Strahlintensität erhöht werden. Die Bildqualität von Geräten mit Feldemissionskathode ist schon bei niedrigen Beschleunigungsspannungen sehr gut [130].

3.2 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) ist ein Verfahren zur Oberflächenanalyse, das den zerstörungsfreien Nachweis aller chemischen Elemente außer Wasserstoff und Helium erlaubt. Sie liefert sowohl qualitative als auch quantitative Informationen über die Elementzusammensetzung der Oberfläche sowie die chemische Umgebung, Bindung und Oxidationsstufe der untersuchten Elemente [131,132]. Hierzu wird die Probe wie in Abbildung 3.2 links zu sehen mit monochromatischer Röntgenstrahlung bestrahlt, so dass Rumpfelektronen freigesetzt werden. Diese Elektronen werden mithilfe eines Linsensystems gebündelt und nach ihrer kinetischen Energie im Analysator aufgetrennt. Nach ihrer Detektion wird das Signal verstärkt, aus der kinetischen Energie die Bindungsenergie errechnet und ein Spektrum ausgegeben, in welchem die Anzahl detektierter Elektronen gegen ihre Bindungsenergie aufgetragen ist.

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie beruht auf dem Photoeffekt, bei dem Elektronen, wie in Abbildung 3.2 rechts gezeigt, durch elektromagnetische Strahlung aus einem Festkörper gelöst werden. Dieser Prozess läuft in drei Schritten ab. Zunächst erfolgt die Anregung eines kernnahen Elektrons mit der Bindungsenergie E_b durch das einfallende Photon, gefolgt vom Transport des angeregten Elektrons zur Oberfläche, das dann im dritten Schritt aus der Oberfläche als so genanntes Photoelektron austritt. Die Anregung kann mittels diverser Photonenquellen erfolgen. Für die XPS werden standardmäßig Magnesium- oder Aluminiumanoden verwendet, die Photonen mit einer Energie von 1253,6 beziehungsweise 1486,6 eV erzeugen [133].

Zur Freisetzung des Elektrons muss die Summe der Bindungsenergie des Elektrons E_B und der Austrittsarbeit des Spektrometers ϕ_S kleiner sein als die eingestrahlte Energie der Röntgenstrahlung $h\nu$. Die Austrittsarbeit des Spektrometers ist eine gerätespezifische Konstante, die durch Messung einer Substanz mit bekannter Bindungsenergie bestimmt werden kann. Für die kinetische Energie E_{kin} der freigesetzten Elektronen ergibt sich unter Annahme des Koopmann'schen Theorems:

$$E_{kin} = h\nu - E_B - \phi_S \quad (3.1)$$

Mittels Gleichung 3.1 kann aus der detektierten kinetischen Energie der emittierten Elektronen die Bindungsenergie berechnet werden [134].

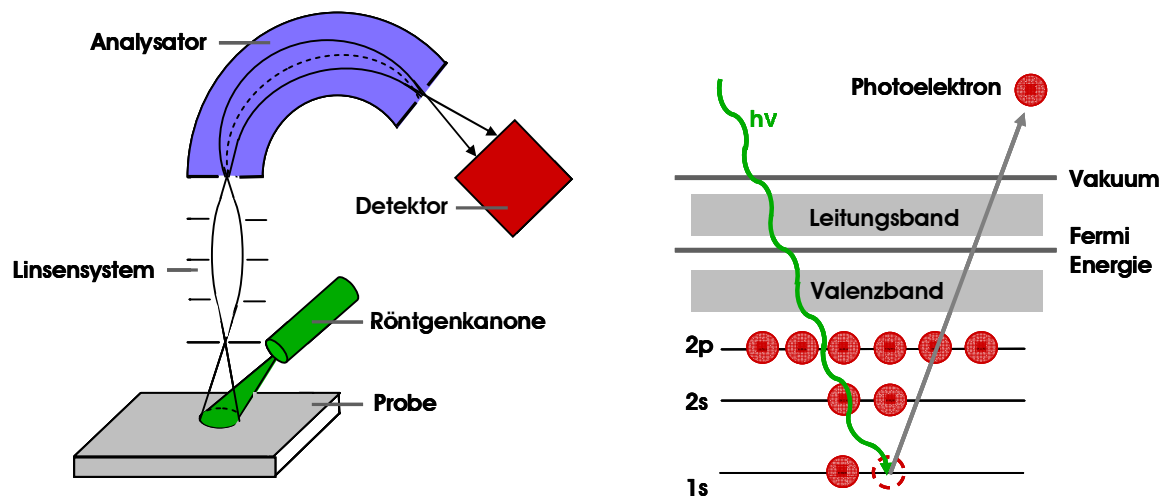


Abb. 3.2: **Röntgenphotoelektronenspektroskopie.** links: Prinzipieller Aufbau eines XP-Spektrometers, rechts: Erzeugung eines Photoelektrons durch das Einstrahlen elektromagnetischer Strahlung.

Da die Bindungsenergie eines Elektrons sowohl von der Art des Atoms als auch von seiner chemischen Umgebung abhängt, können diese beiden Informationen ermittelt werden [135]. Elektropositive Substituenten erhöhen die Elektronendichte eines Atoms und verringern somit seine effektive Kernladung. Es ergibt sich eine schwächere Anziehung der kernnahen Elektronen, die folglich eine geringere Bindungsenergie E_B haben. Werden die Elektronen freigesetzt haben sie eine im Vergleich zum unsubstituierten Atom höhere kinetische Energie. Den umgekehrten Effekt bewirken elektronegative Substituenten. Die beschriebene Abhängigkeit der Bindungsenergie der Elektronen eines Elements von seiner chemischen Umgebung wird als chemische Verschiebung bezeichnet. Abbildung 3.3 zeigt den Einfluss unterschiedlicher Liganden auf die Lage der Linien im Spektrum am Beispiel des Kohlen-

stoffsignals von Ethylenfluoroacetat. Die chemische Verschiebung der Methylgruppe (284,5 eV) ist um ca. 8 eV kleiner als die der mit drei stark elektronenziehenden Fluor-
atomen substituierten Trifluormethylgruppe.

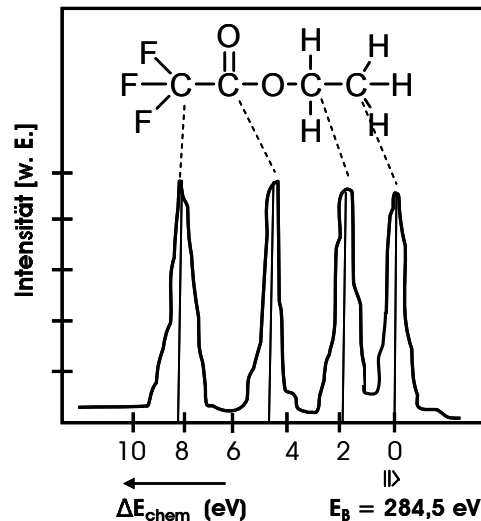


Abb. 3.3: **Kohlenstoffsignal von Ethylenfluoroacetat.** Die unterschiedliche chemische Umgebung der Kohlenstoffe des Moleküls führt zu einer deutlichen Aufspaltung des Signals.

Aufgrund von Spin-Bahn- und Spin-Spin-Kopplung wird bei einigen Signalen eine Feinstruktur des Hauptsignals durch Multiplettaufspaltung beobachtet [133,136]. Die Spin-Bahn-Kopplung bezeichnet die Wechselwirkung des Spin- und Bahndrehimpulses ungepaarter Elektronen. Grundlage ist die Bewegung eines Elektrons um den Atomkern, die mit einem durch die Quantenzahl l beschriebenen Bahndrehimpuls verbunden ist. Ferner hat das Elektron aufgrund von paralleler oder antiparalleler Ausrichtung zum Bahndrehimpuls einen Spin vom Wert $\pm 1/2$. Die Vektorsumme aus Bahndrehimpuls l und Spin s entspricht dem Gesamtbahndrehimpuls j und ist somit abhängig von der Orientierung von l und s . Voll besetzte Schalen tragen nicht zum Gesamtbahndrehimpuls eines Atoms bei. Nach der Emission eines Photoelektrons bleibt aber ein ungepaartes Rumpfelektron zurück. Abhängig von der Kopplung des zurückbleibenden Elektrons hat das emittierte Photoelektron eine andere kinetische Energie. Somit kommt es zu einer Aufspaltung des Signals. Ein Elektron in einer s -Schale hat einen Bahndrehimpuls von Null. Unabhängig vom Vorzeichen des Spins ist $j=1/2$. s -Signale sind deshalb nicht Spin-Bahn aufgespalten. Ein Elektron in einer p -Schale ($l=1$) kann entweder einen Gesamtbahndrehimpuls von $j=1+1/2=3/2$ oder $j=1-1/2=1/2$ annehmen. Daher ist das p -Signal in ein Dublett aufgespalten. Entsprechend verhalten sich auch die d - und f -Signale. Die Stärke der Spin-Bahn-Kopplung nimmt mit steigender Ordnungszahl für eine gegebene Schale zu (z. B. $\text{Au}3p > \text{Ag}3p$), und sie wird kleiner mit steigendem l (z. B. $\text{Au}3p > \text{Au}3d$).

Anhand des Gesamtbahndrehimpulses j kann die relative Intensität der Spin-Bahn-aufgespaltenen Linien berechnet werden. Das Intensitätsverhältnis der Signale hängt von der Besetzungswahrscheinlichkeit der Zustände ab und kann mit $2j+1$ berechnet werden. In Tabelle 3.1 sind die Aufspaltungsparameter zusammengefasst.

Tab. 3.1: **Aufspaltungsparameter verschiedener XPS Signale.**

Unterschale	l	s	$j = l \pm s$	Intensitätsverhältnis $2j+1$
s	0	1/2	1/2	-
p	1	1/2	1/2, 3/2	1:2
d	2	1/2	3/2, 5/2	2:3
f	3	1/2	5/2, 7/2	3:4

Im Gegensatz zur Spin-Bahn-Kopplung tritt die Spin-Spin-Kopplung nur bei paramagnetischen Molekülen auf, d. h. wenn ungepaarte Elektronen in den Valenzorbitalen vorliegen. Wird in diesem Fall ein Rumpfelektron entfernt, kann das zurückbleibende ungepaarte Elektron zwei unterschiedliche Spinorientierungen zum ungepaarten Valenzelektron einnehmen (paralleler oder antiparalleler Spin). Daraus resultiert eine Aufspaltung des Rumpfniveaus.

3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Im Gegensatz zur einfachen Lichtmikroskopie, bei der die Bildentstehung auf der Beugung von Licht an einem Objekt beruht, emittiert bei der Fluoreszenzmikroskopie das Objekt selbst Licht. Die Auflösung der Fluoreszenzmikroskopie ist daher deutlich höher, so dass die Methode zur Visualisierung von Strukturen, die im einfachen Lichtmikroskop nicht auflösbar sind, verwendet wird. Sie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, die auf dem Effekt der Fluoreszenz beruht. Hierbei wird die spontane Emission von Licht ausgenutzt, die beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie entsteht. Die meisten zu visualisierenden Strukturen müssen hierzu mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Viele dieser Moleküle enthalten aromatische Ringstrukturen, deren Elektronen in so genannten bindenden π -Orbitalen delokalisiert sind. Diese Elektronen können bei der Absorption von Anregungsphotonen in die energetisch höher liegenden π^* -Orbitale übergehen.

Die der Fluoreszenz zugrunde liegenden Prozesse können anhand des in Abbildung 3.4 links dargestellten Jablonski-Diagramms veranschaulicht werden. Dieses Energiediagramm zeigt

die bei Absorption, strahlungsloser Relaxation und Emission von Photonen auftretenden Elektronenübergänge. Ein Elektron kann durch Absorption von Photonen der Energie $E = h\nu_A$ aus dem Grundzustand S_0 in einen der angeregten Singulettzustände S_1 oder S_2 übergehen. Dieses angeregte System hat verschiedene Möglichkeiten wieder in den Grundzustand zurückzukehren. Strahlungslose Relaxation durch Abgabe von Wärme ermöglicht Übergänge aus einem höheren angeregten Zustand nach S_1 , während der Übergang in den Grundzustand in Form von Lichtemission abläuft. Die Wellenlänge des emittierten Fluoreszenzlichts ist hierbei aufgrund der teilweisen Energieabgabe in Form von Wärme in der Regel länger als die des absorbierten Lichts. Diese Verschiebung wird als Stokes-Shift bezeichnet (Abb. 3.4 rechts).

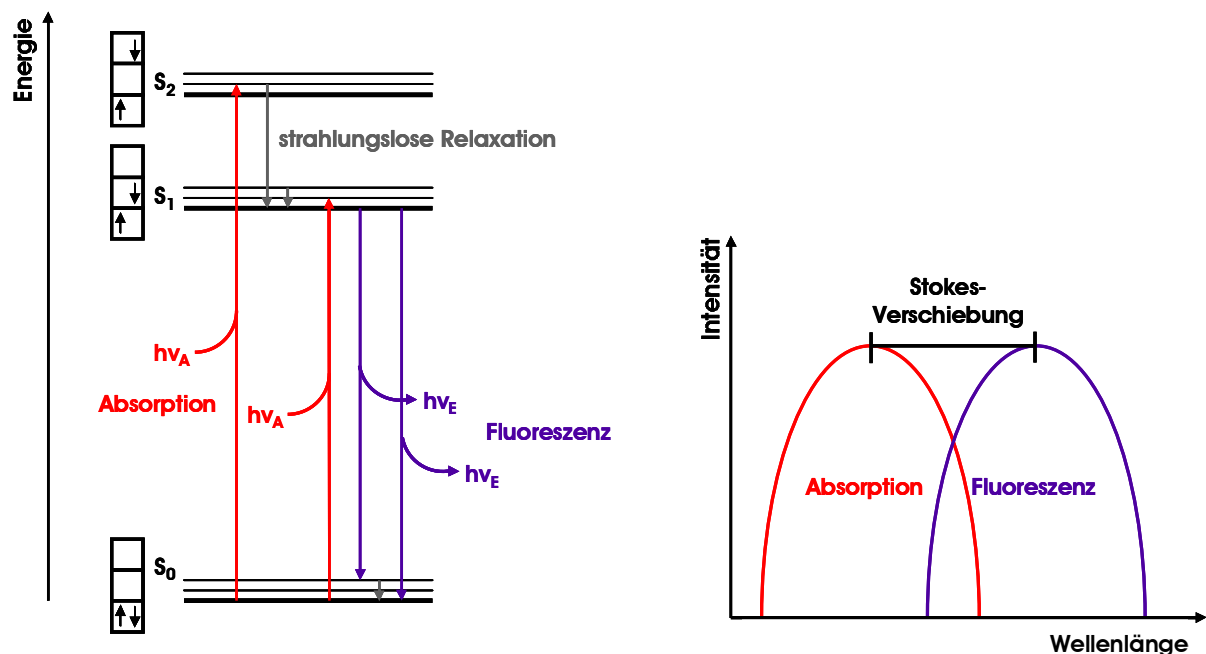


Abb. 3.4: **Fluoreszenz.** Links: Jablonski-Diagramm. Fluoreszenz wird beobachtet, wenn ein Elektron aus dem ersten angeregten Zustand S_1 unter Emission eines Photons in den Grundzustand S_0 übergeht. Rechts: Stokes-Verschiebung: Verschiebung zu höheren Wellenlängen aufgrund von strahlungsloser Energieabgabe.

3.4 Quarzkristallmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors

Die als Quarzkristallmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (engl. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, QCM-D) bezeichnete Technik wird eingesetzt um *in situ* und in Echtzeit Adsorptionsprozesse und molekulare Wechselwirkungen auf der Oberfläche eines Sensorkristalls zu untersuchen [137].

Die ursprünglich für Systeme im Vakuum und an Luft entwickelte Quarzkristallmikrowaage wurde von Rodahl *et al.* für die Verwendung in der flüssigen Phase weiterentwickelt [138, 139, 140]. Sie findet vor allem in der Untersuchung der Eigenschaften von Biomaterialien und funktionellen Oberflächen wie Proteinen und Polymeren Anwendung [141]. Im Gegensatz zu optischen Methoden wie beispielsweise der Ellipsometrie wird auch das in die Adsorbatschicht eingelagerte Wasser detektiert [142].

Ein dünner, piezoelektrischer Quarzkristall, der auf Ober- und Unterseite mit je einer Elektrode kontaktiert ist, bildet die zentrale Komponente der Quarzkristallmikrowaage (Abb. 3.5 a). Bei resonanter Anregung durch eine Wechselspannung oszilliert der Quarz lateral. Da es sich um einen Dickenscherschwinger handelt, ist die Energieauskopplung in das umgebende Medium minimal (Abb. 3.5 b). Wird seine Auslenkung betrachtet, steht die Ausbreitungsrichtung der Welle senkrecht zu den Quarzflächen, die Amplitude parallel. Dies minimiert die Dämpfung der Schwingung. Die Dicke des Quarzsensors bestimmt die Wellenlänge und somit auch die Frequenz der Grund- und Oberschwingungen. Die Grundfrequenz f_0 nimmt mit abnehmender Dicke zu. Nicht nur diese, sondern auch die ungeraden Obertöne $f_n = n f_0$ ($n = 3, 5, 7, \dots$) können gemessen werden.

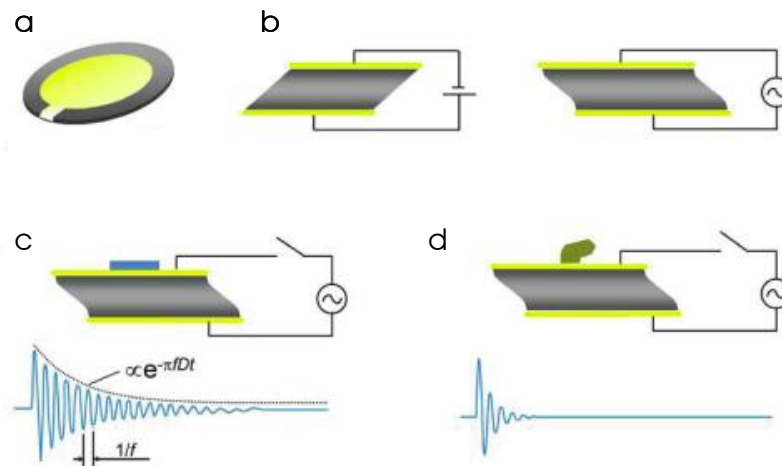


Abb. 3.5: **Prinzip der QCM-D.** a) Auf Ober- und Unterseite mit Goldelektroden kontaktierter Sensor-kristall, b) bei resonanter Anregung oszilliert der Quarz lateral, c, d) nach Unterbrechung des Stromkreises nimmt die Amplitude der Scherschwingung exponentiell ab: im Fall einer starren Adsorbatschicht verändert sich nur die Frequenz (c), während ein elastischer Film zusätzlich zu einer starken Dämpfung führt (d).

Bei Verwendung der QCM-D Technik wird der Stromkreis nach Anregung der Schwingung unterbrochen, so dass die Schwebbewegung des Kristalls ein oszillierendes elektrisches Feld erzeugt, dessen Amplitude mit der Zeit exponentiell abfällt. Dieser Abfall ist mit der Dämpfung der Scherschwingung korreliert. Aus der Auswertung des zeitlichen Verlaufs können sowohl der auf den Dämpfungseigenschaften resultierende Verlustfaktor D als auch die Resonanzfrequenz f erhalten werden. Die Änderung des Verlustfaktors hängt stark von den viskoelastischen Eigenschaften der Adsorbatschicht ab. Für einen starren Film verändert sich D kaum (Abb. 3.5 c), während ein elastischer Film zu starker Dämpfung der Scherbewegung und somit einer starken Änderung von D führt (Abb. 3.5 d) [139].

Die Resonanzfrequenz ist von der oszillierenden Masse abhängig. Erhöht sich die Masse durch Abscheiden einer Adsorbatschicht, sinkt die Resonanzfrequenz. Diese Abhängigkeit wird durch die die Massendifferenz Δm quantifizierende Sauerbrey-Gleichung (Gleichung 3.2) beschrieben [137]:

$$\Delta m = - \frac{C \cdot \Delta f_n}{n} \quad (3.2)$$

Hier ist C eine durch die Dicke und intrinsischen Eigenschaften des Quarzkristalls bedingte Konstante. Sie beträgt für die in dieser Arbeit verwendeten 5 MHz Kristalle $17,7 \text{ ng Hz}^{-1}$ und ist unabhängig von der Adsorbatschicht. Die Frequenzdifferenz Δf_n des zur Auswertung verwendeten Obertons n wird experimentell bestimmt.

Die Sauerbrey-Gleichung gilt, wenn die adsorbierte Masse klein im Verhältnis zur Masse des Sensors ist, gleichmäßig verteilt und der gebildete Film starr ist. Die Adsorption von Biomolekülen an Oberflächen erzeugt jedoch elastische Filme, die die Schwingung dämpfen. Zusätzlich führt auch das Lösungsmittel zu einer Dämpfung. Somit ist die Sauerbrey Gleichung (Gleichung 3.2) nicht für eine exakte quantitative Auswertung solcher Systeme geeignet. Es existieren jedoch genauere Modelle, die die viskoelastischen Eigenschaften des Lösungsmittels und der Adsorbatschicht berücksichtigen [143].

4. Nanostrukturierte Goldpartikeloberflächen

Es existieren verschiedenste Methoden zur Herstellung komplexer mikro-, nano- und mikro-nanostrukturierter Systeme (siehe Kapitel 2). In diesem Kapitel werden mit Goldpartikeln nanostrukturierte Oberflächen, deren Partikelabstände über einen weiten Bereich kontrollierbar sind, und ihre Herstellung mittels Blockcopolymer Mizellarer Lithografie (BCML) vorgestellt. Diese Partikel ermöglichen die spezifische Immobilisierung diverser Biomoleküle wie beispielsweise Proteine und Antikörper als auch anorganischer Partikel.

4.1 Blockcopolymer Mizellare Lithografie

Die Blockcopolymer Mizellare Lithografie (BCML) stellt eine Methode zur Oberflächenstrukturierung mit Metallpartikeln im Nanometerbereich dar. Die erzeugbaren quasi-hexagonalen Metallstrukturen entstehen durch den Selbstassemblierungsprozess von mit Metallsalzen beladenen Mizellen [17][16][144].

Die Grundlage dieser Technik sind Blockcopolymere. Diese bestehen aus mindestens zwei unterschiedlichen Monomeren, deren als Blöcke bezeichnete Polymereinheiten über eine kovalente Bindung miteinander verbunden sind [145]. Diblockcopolymere werden durch lebende anionische Polymerisation hergestellt und auf verschiedenste Weise zur Herstellung strukturierter Oberflächen verwendet [119][146][147].

Die Basis der Methode ist die auf der chemischen Verschiedenheit der Blöcke beruhende Phasenbildung auf molekularer Ebene, gefolgt von der Selbstorganisation verschiedener Strukturen. Zwei konkurrierende Effekte beeinflussen diese Phasenbildung. Während eine möglichst kleine Fläche zwischen den Phasen die Grenzflächenenergie minimiert, wird durch entropische Effekte eine möglichst ungeordnete Knäuelstruktur bevorzugt. Die entstehenden periodischen Strukturen stellen den energetisch günstigsten Zustand dar. Somit können durch Selbstorganisation in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie der Art der Monomere, dem Molekulargewicht und der Zusammensetzung des Polymers diverse Strukturen entstehen [148][149]. Abbildung 4.1 zeigt die häufigsten Morphologien

amorpher Diblockcopolymeren. Abhängig von der Zusammensetzung treten neben Kugeln, Zylindern, Doppelgyroid- und Doppeldiamantstrukturen Lamellen auf [117][118].

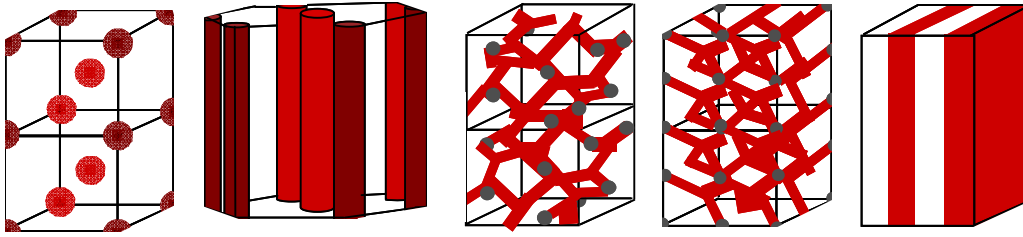


Abb. 4.1: **Diblockcopolymer Strukturen.** Bei steigendem Anteil der roten Komponente (rot) liegen Kugeln, Zylinder, Doppelgyroid-, Doppeldiamantstrukturen oder Lamellen vor [118].

Das Phasenverhalten von Polymeren kann durch experimentell steuerbare Faktoren wie den Flory-Huggins Parameter, der die Stärke der Abstoßung zwischen den Blöcken beschreibt, den Polymerisationsgrad und den Volumenanteil gesteuert werden. Dies macht eine gezielte Synthese gewünschter Strukturen möglich [147].

Wie in der Schmelze und im Festkörper assoziieren Diblockcopolymeren auch in Lösung und können abhängig von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise der Konzentration und Temperatur Kugeln, Stäbchen, Lamellen, Vesikel oder Doppelschichten ausbilden [117] [150]. Hierbei kollabiert der nichtlösliche Block dieser makromolekularen Amphiphile, während der lösliche Block mit dem Lösungsmittel wechselwirkt. Durch die Ausbildung der Strukturen wird die Wechselwirkung des kollabierten Blocks mit dem Lösungsmittel und somit auch die Enthalpie des Systems minimiert. Die Morphologie hängt auch in Lösung von der Zusammensetzung des Polymers ab [151].

In dieser Arbeit wurden amphiphile Polystyrol-*b*-poly-2-vinylpyridin (PS-*b*-P2VP) Diblockcopolymeren bestehend aus einem unpolaren Polystyrol- und einem polaren Polyvinylpyridinblock verwendet. Bei Lösung des Polymers in unpolaren Lösungsmitteln, in denen sich bevorzugt der hydrophobe Polystyrolblock löst, kommt es unter geeigneten Bedingungen zur Selbstorganisation inverser Mizellen. Durch die Ausrichtung des polaren Polyvinylpyridinblocks nach Innen werden dessen energetisch ungünstige Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel und somit die Enthalpie und freie Energie des Systems minimiert [152][151]. Abbildung 4.2 zeigt die Strukturformel des Polymers sowie das Prinzip der Bildung inverser Mizellen in einem unpolaren Lösungsmittel.

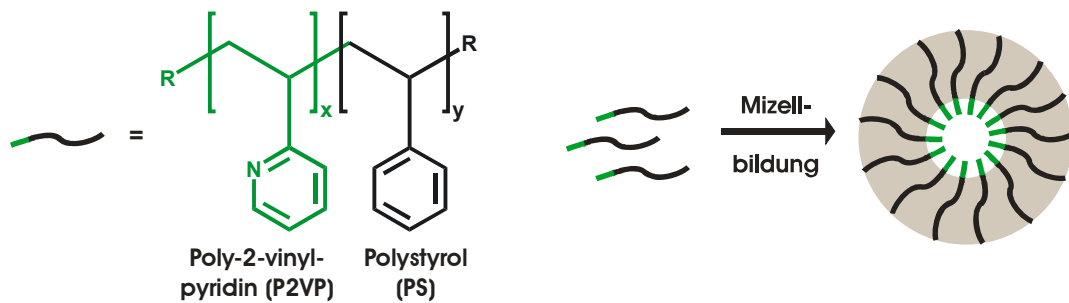


Abb. 4.2: **Strukturformel des PS-*b*-P2VP Diblock Copolymers und Prinzip der Bildung inverser Mizellen.** Polystyrol stellt den unpolaren Teil (schwarz), Poly-2-vinylpyridin den polaren Teil (grün) dar, der bei Lösung in einem unpolaren Lösungsmittel den Kern der Mizelle bildet.

Wird der Lösungsvorgang der Diblockcopolymeren genauer betrachtet, so zeigt sich, dass sie zunächst unterhalb der kritischen Mizellkonzentration (engl. critical micelle concentration, CMC) in ihrer monomeren Form vorliegen. Erst oberhalb dieser Konzentration assoziieren die Monomere zu inversen Mizellen, während die Konzentration an Monomeren in der Lösung bei weiter steigender Konzentration nahezu konstant bleibt (Abb. 4.3)[153]. Die CMC hängt stark vom Molekulargewicht des Polymers sowie der Molekulargewichtsverteilung der Blöcke ab. Je länger der innere Block der Mizelle, desto geringer ist die CMC, wenn die Länge des äußeren Blocks gleich bleibt [154].

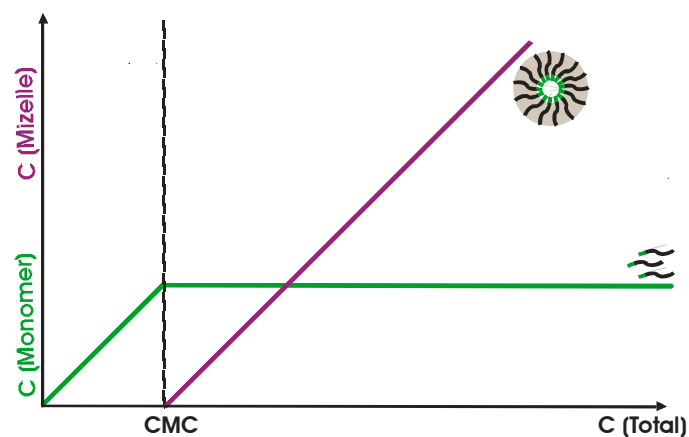


Abb. 4.3: **Kritische Mizellkonzentration.** In Lösung liegen PS-*b*-P2VP Diblockcopolymeren unterhalb der CMC als Monomer vor, oberhalb bleibt die Monomerkonzentration gleich während die Mizellkonzentration linear ansteigt.

Der hydrophile Polyvinylpyridinkern der Mizelle ist in der Lage verschiedene, in organischen Lösungsmitteln schlecht lösliche Metallsalze wie HAuCl_4 , CoCl_2 , ZnCl_2 , LiAuCl_4 , H_2PtCl_6 , CdCl_2 , NiCl_2 oder TiCl_3 zu binden. Wird das Salz zur Mizelllösung gegeben diffundiert es in den Kern

der Mizelle und stabilisiert diese [150][155][156]. Dieser als Beladung der Mizelllösung bezeichnete Vorgang wird in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt.

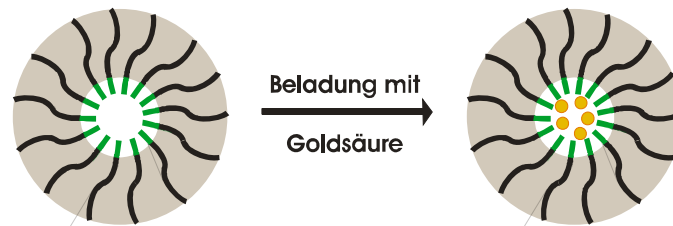


Abb. 4.4: **Prinzip der Beladung inverser Mizellen.** Nach Zugabe des HAuCl_4 reichert sich dieses im polaren Mizellkern an.

Wird das Metallsalz gelöst, kommt es zu einer Komplexierung oder Säure-Base-Reaktion, die durch die Polaritätserhöhung zu einer deutlichen Steigerung der thermodynamischen sowie kinetischen Stabilität führt [157][155]. Nach dem HSAB-Konzept (Konzept der harten und weichen Säuren und Basen) sind Metalle meist weiche Säuren und können somit gut von weichen Basen wie dem Stickstoffatom im Pyridin stabilisiert werden. Metallsalze mit harten Basen wie Chlorid oder Nitrat als Gegenion dienen dabei als Vorläufer [117]. Abbildung 4.5 zeigt diese Stabilisierung durch die beschriebene Ionisierung des Vinylpyridins am Beispiel des in dieser Arbeit verwendeten HAuCl_4 .

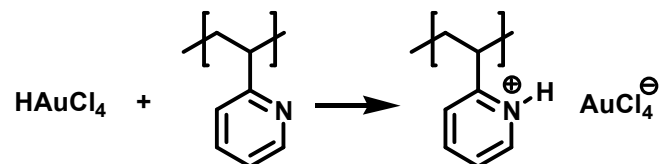


Abb. 4.5: **Stabilisierung der Mizelle.** Durch Protonierung des Kernblocks wird die Mizelle stabilisiert [157].

Die Beladung kann anhand von Gleichung 4.1 quantifiziert werden. Hier gibt der Neutralisationsgrad N die berechnete Menge an HAuCl_4 -Molekülen pro Vinylpyridineinheit an. Er ist definiert als Verhältnis der mit Metallsalz beladenen Vinylpyridineinheiten n zur Anzahl aller Vinylpyridine m . Je höher der Neutralisationsgrad ist, desto höher ist die Stabilität der durch Ionisierung des Kernblocks stabilisierten Mizellen [150].

$$N = \frac{n [\text{HAuCl}_4 / \text{VP}]}{m[\text{VP}]} \quad (4.1)$$

Aufgrund der sphärischen Struktur der mit Metallsalz beladenen Mizellen können diese zur Dekoration einer Oberfläche mit hexagonal angeordneten Partikeln verwendet werden. Hierzu müssen sie auf die Oberfläche aufgebracht werden. Sowohl Rotationsbeschichtung als auch Auftropfen der Lösung auf die Oberfläche führen nicht zu optimaler lateraler Ordnung. Daher werden die Mizellen standardmäßig mittels eines Tauchbeschichtungsprozesses abgeschieden, indem die zu beschichtende Oberfläche, wie in Abbildung 4.6 dargestellt, bei konstanter Geschwindigkeit aus der Mizelllösung gezogen wird [118][144] [158][159].

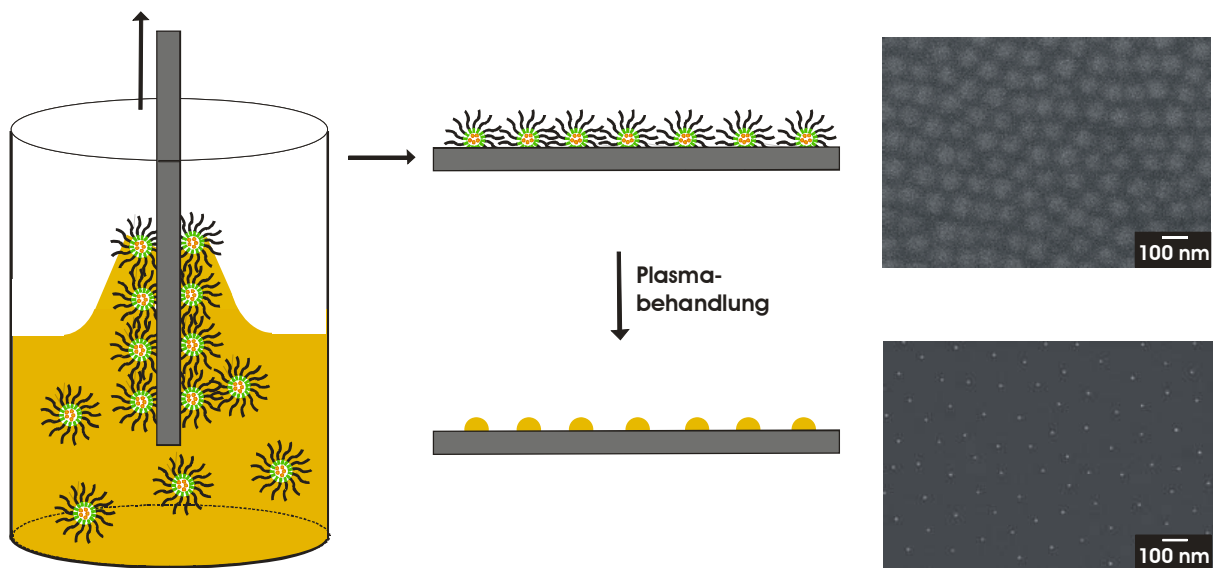


Abb. 4.6: **Prinzip der Blockcopolymer Mizellen Lithografie.** Die Oberfläche wird durch Herausziehen aus der Mizelllösung mit Mizellen dekoriert. Durch nachfolgende Plasmabehandlung wird das Polymer entfernt, das Metallsalz reduziert und es entstehen definierte Partikel.

Die Morphologie der auf der Oberfläche entstehenden Strukturen hängt stark von der Konzentration der Lösung ab. Ist letztere sehr niedrig, werden sehr große Mizellen beobachtet. Eine Erhöhung führt zunächst zur gewünschten, quasi-hexagonalen Anordnung kleiner Mizellen, dann zu Bändern und schließlich zu Mizellmultilagen. Die BCML verwendet somit Lösungen mittlerer Konzentration. So können, wie in der REM-Aufnahme in Abbildung 4.6 rechts oben erkennbar, quasi-hexagonal angeordneten Mizellen auf der Oberfläche erzeugt werden. Zwischen diesen existieren weit reichende van-der-Waals Kräfte sowie Kapillarkräfte, so dass ein geschlossener, homogener Mizellfilm entsteht. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels wird das Polymer glasig und die Struktur fixiert [153].

Das strukturgebende Polymer kann durch Behandlung der Oberfläche in einem Sauerstoff-, Wasserstoff- oder Argonplasma oxidiert und damit vollständig entfernt werden ohne die zuvor erzielte hexagonale Ordnung zu zerstören. Dies führt neben der Entfernung des

Polymers zur Reduktion des Metallsalzes und der Entstehung definierter, sehr stabiler Partikel auf der Oberfläche [17]. Diese sind in der REM-Aufnahme in Abbildung 4.6 rechts unten aufgrund ihrer hohen Dichte (siehe Kapitel 3.1) als weiße Punkte erkennbar. Alternativ zur Reduktion im Plasma kann das Metallsalz auch vor dem Aufbringen auf die Oberfläche in der Mizelle reduziert werden. Die entstehenden Strukturen unterscheiden sich nicht von solchen die ohne Reduktion hergestellt werden [17][160].

4.2 Plasmabehandlung

Wie in 4.1 beschrieben, wurden im Rahmen dieser Arbeit mit einer Mizellmonolage beschichtete Oberflächen im Plasma behandelt um definierte Goldpartikel zu erzeugen. Hierzu wurde zunächst das Plasmasystem TePla100-E bei einem Wasserstoffdruck von 0,4 mbar und einer Leistung von 150 W verwendet. Die genannten Bedingungen ermöglichen die zuverlässige Herstellung auf der Oberfläche stabiler, Goldnanostrukturen. Dies wurde nach dem jeweiligen Experiment im Rasterelektronenmikroskop kontrolliert. Nachdem diese Überprüfung vermehrt zu dem Ergebnis führte, dass Partikel während der Verwendung in Motilitäts-Assays (siehe Kapitel 6) instabil waren und sich ablösten, konnte das Plasmasystem klar als Ursache der Probleme identifiziert werden. Abbildung 4.7 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Abbildung einer goldnanostrukturierten Oberfläche nach dem Motilitäts-Assay, sowie eine Vergrößerung in der die stabilen Partikel rot und die abgelösten Partikel grün markiert sind. In diesem Fall kam es zu einer Ablösung von ca. 45% der Goldpartikel. In anderen Experimenten wurden Werte zwischen 5 und 90% erreicht. Bei den in der Abbildung erkennbaren, dunklen Bereichen handelt es sich vermutlich um Protein- und Salzurückstände, die sich bevorzugt im Bereich der abgelösten Partikel ablagern.

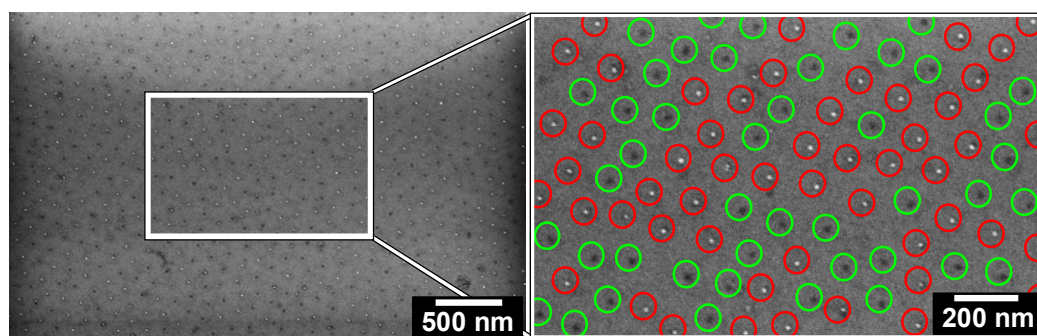


Abb. 4.7: **Instabilität der Goldnanopartikel.** Die im Motilitäts-Assay verwendete Oberfläche zeigte eine Ablösung von 45% der Partikel.

Eine Überprüfung des Geräts ergab, dass es aufgrund nicht behebbarer Mängel nicht länger für die Herstellung stabiler Goldnanopartikel verwendbar war. Daher wurde es durch das TePla PS210 System ersetzt. Dieses unterscheidet sich deutlich vom TePla100-E. Somit wurden verschiedene Parameter zur Erzeugung stabiler Partikel getestet. Das Gerät kann zwischen 1 mbar und 0,3 mbar betrieben werden, da es sich einerseits um den vom Hersteller angegebenen Maximaldruck und andererseits um den Wert, bei dem das Gerät zuverlässig zündet, handelt. Die maximale Leistung beträgt 600 W. Um die genannte Spannweite der Parameter abzudecken wurden Wasserstoffdrücke von 0,3 sowie 0,5 und 1 mbar und Leistungen von 300 und 600 W getestet und die erzeugten Oberflächen verglichen. Es zeigte sich, dass Mizellösungen kurzer Polymere zu instabileren Partikeln führten als die länger Polymere. Daher wurde für weitere Tests das kurze PS(52200)-*b*-P2VP(34000)-Polymer verwendet.

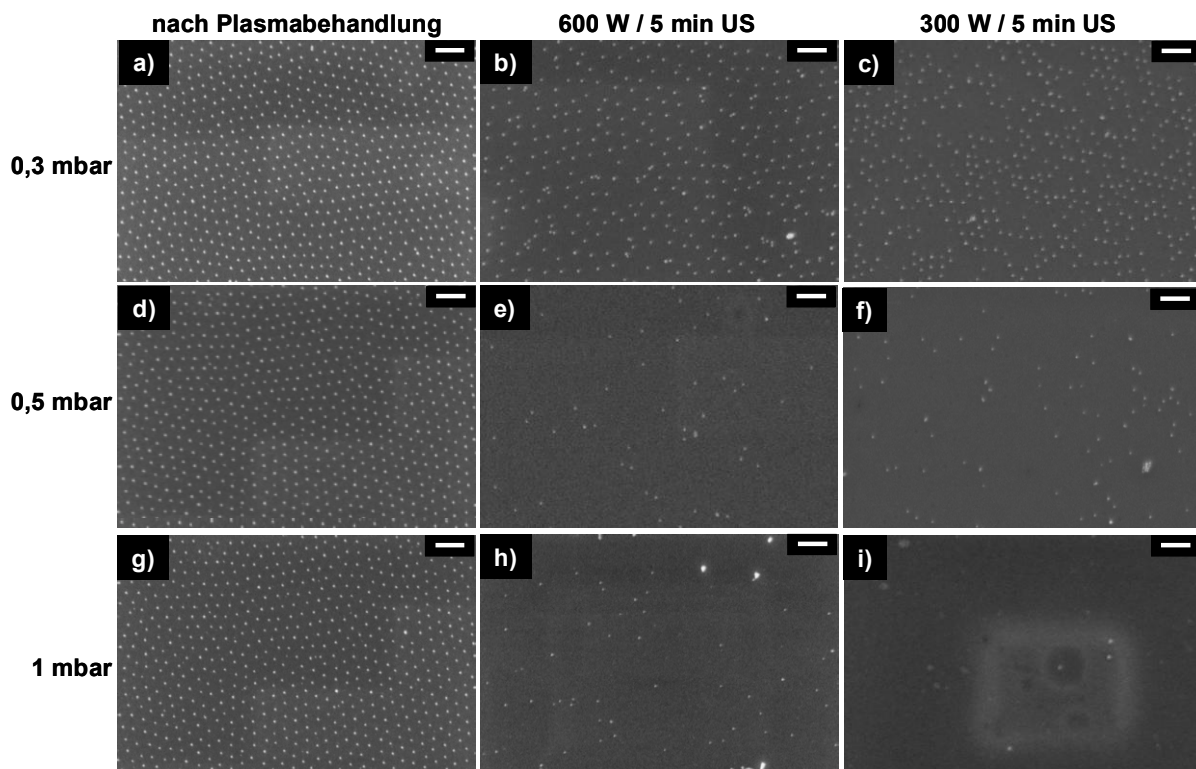


Abb. 4.8: **Stabilitätstests 1.** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen Goldpartikel-dekorierter Oberflächen, die bei 0,3 sowie 0,5 und 1 mbar hergestellt wurden. a, d, g) bei 600 W hergestellte Oberflächen nach der Plasmabehandlung, b, e, h) bei 600 W behandelte und für 5 min in PBS im Ultraschall behandelte Oberflächen, c, f, i) bei 300 W behandelte und für 5 min in PBS im Ultraschall behandelte Oberflächen. Die Skala entspricht in allen Bildern 200 nm.

Die unter Verwendung der oben genannten Drücke und Leistungen hergestellten Substrate wurden nach der Plasmabehandlung für 5 min in PBS im Ultraschall behandelt und im

Rasterelektronenmikroskop untersucht. Dies diente als erster Stabilitätstest, der gewählt wurde, da im Rahmen der weiteren Verwendung der Oberflächen kurze Behandlungen im Ultraschall üblich sind. Somit dürfen sich die Partikel im Ultraschall nicht ablösen.

Abbildung 4.8 zeigt in der linken Reihe (4.8 a, d und g) Oberflächen nach der Plasmabehandlung bei 0,3 sowie 0,5 und 1 mbar. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen bei 300 W und 600 W behandelten Oberflächen. Somit werden hier nur Letztere gezeigt. Auf allen Oberflächen wurde nach der Plasmabehandlung eine homogene Beschichtung mit hexagonal angeordneten Goldpartikeln beobachtet. Nach 5 min in PBS im Ultraschall kam es jedoch auf allen im TePla210 behandelten Oberflächen zur Ablösung der Goldpartikel (4.8 b, c, e, f, h und i). Somit konnten mittels des TePla PS210 Systems hergestellte Oberflächen nicht ohne zusätzliche Behandlung weiter verwendet werden. Ein für die weiteren Untersuchungen wichtiges Ergebnis war aber, dass sich auf Oberflächen, die beim niedrigsten Wasserstoffdruck von 0,3 mbar behandelt wurden, weniger Goldpartikel ablösten als bei 0,5 und 1 mbar.

Zum Zweck der Fixierung der Goldnanopartikel auf der Oberfläche wurde nach dem Plasmaschritt eine Behandlung in einem Konvektionsofen bei 300°C durchgeführt. Da bei einem Wasserstoffdruck von 0,3 mbar hergestellte Oberflächen im Stabilitätstest 1 die höchste Stabilität aufwiesen (siehe Abb. 4.8), wurde nur dieser Wasserstoffdruck weiter verwendet. Es wurden Leistungen von 300 und 600 W verglichen und in Kombination mit Temperzeiten zwischen 1 und 48 h getestet. Abbildung 4.9 zeigt exemplarisch einige der überprüften Oberflächen. Sowohl bei 300 als auch bei 600 W behandelte Oberflächen waren nach 24 h bei 300°C stabil, so dass es auch nach Behandlung in PBS im Ultraschall für bis zu 25 min nicht zur Ablösung von Goldpartikeln kam. Abbildung 4.9 a zeigt dies anhand einer bei 0,3 bar und 600 W im Plasma hergestellten Oberfläche. Eine Verkürzung der Temperzeit durch Verwendung eines Konvektionsofens bei 500°C führte nicht zu besser haftenden Partikeln. Abbildung 4.9 b zeigt dies anhand einer bei 0,3 mbar und 600 W behandelten Oberfläche, die für 3 h bei 500°C behandelt wurde. Die Partikel waren unter diesen Bedingungen auf der Oberfläche mobil, so dass die hexagonale Ordnung zerstört wurde (Abb. 4.9 b). Daher ist eine Temperatur von 500°C im Gegensatz zu 300°C nicht zur Stabilisierung der Goldpartikel auf der Oberfläche geeignet.

Im nächsten Schritt wurden bei 0,3 mbar und 300 W sowie bei 0,3 mbar und 600 W hergestellte Substrate in Gleitexperimenten (vgl. Kapitel 6) verwendet. Beide Oberflächentypen wurden aufgrund der vorangegangenen Stabilitätstests vor dem Experiment für 24 h bei 300°C getempert. Es zeigte sich, dass die Partikel auf der bei 300 W behandelte Oberflächen deutlich schwächer fixiert waren (Abb. 4.9 c). Es kam zu im Experiment

zu einer Ablösung von bis zu 75% der Goldpartikel. Bei 600 W behandelte Oberflächen hingegen waren auch während der Gleitexperimente stabil und die Partikel lösten sich nicht ab (Abb. 4.9 d). Somit wurden für alle in Proteinexperimenten verwendeten, im TePla PS210 System hergestellten Oberflächen 0,3 mbar und 600 W als Parameter verwendet und diese im Anschluss für 24 h bei 300°C im Konvektionsofen getempert.

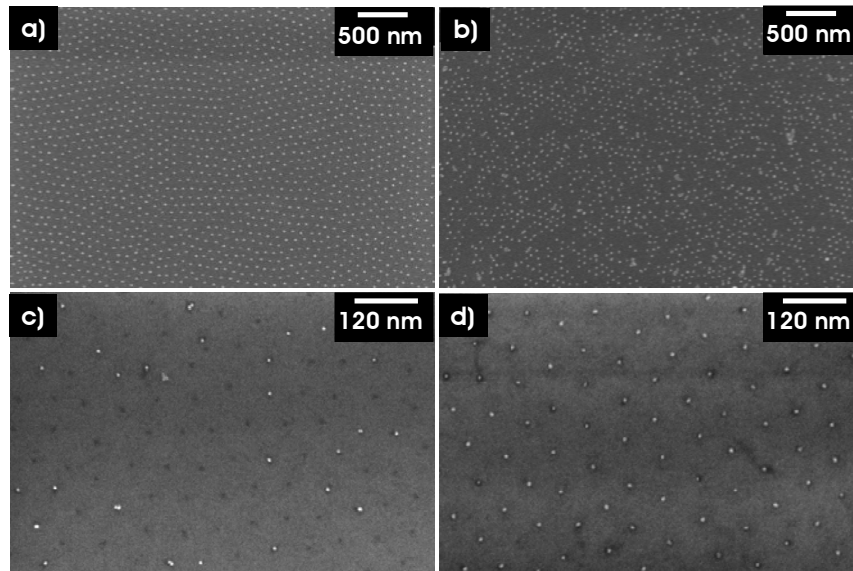


Abb. 4.9: **Stabilitätstests 2.** a) bei 0,3 mbar und 600 W behandelte Probe nach 24 h tempern bei 300°C und 25 min im Ultraschall, b) bei 0,3 mbar und 600 W behandelte Probe nach 3 h tempern bei 500°C, c) bei 0,3 mbar und 300 W behandelte Probe nach 24 h tempern bei 300°C nach Verwendung im Gleitexperiment, d) bei 0,3 mbar und 600 W behandelte Probe nach 24 h tempern bei 300°C nach Verwendung im Gleitexperiment.

Der Erfolg der Plasmabehandlung wurde zusätzlich im Röntgenphotoelektronenspektroskop (XPS) untersucht. Hierzu wurden Spektren nach der Beschichtung der Glasoberflächen mit einer Mizellmonolage sowie nach der Behandlung dieser im Plasma (TePla PS210, 0,3 mbar H_2 , 600 W) aufgenommen und verglichen (Abb. 4.10). Erstere sind jeweils in rot, letztere in schwarz dargestellt.

In Abbildung 4.10 a sind die XP-Übersichtsspektren der beiden Oberflächen abgebildet. Es ist klar erkennbar, dass die Intensität der Si2p und 2s Signale sowie die des O1s Signals nach dem Plasmaprozess deutlich zunimmt. Dies beruht auf der Entfernung des die Oberfläche abschirmenden Polymers. Das Detailspektrum des Kohlenstoffsignals bei 284 eV ist in Abbildung 4.10 b zu sehen. Da es wie auch das Stickstoffsignal (Abb. 4.10 c) bei 400 eV durch das Polymer verursacht wird, beweist das nahezu vollständige Verschwinden beider Signale nach der Plasmabehandlung die erfolgreiche Entfernung der Polymerhülle. Abbildung 4.10 d zeigt zusätzlich das Au4f Signal, das ein Dublett der $4f_{5/2}$ und $4f_{7/2}$ Signale ist. Es

war sowohl nach der Beschichtung mit Mizellen als auch nach der Plasmabehandlung detektierbar. Die Bindungsenergie erniedrigte sich jedoch aufgrund der Reduktion zu elementarem Gold um ca. 4 eV, was die Reduktion des Goldsalzes zu elementarem Gold und somit den erfolgreichen Plasmaprozess beweist. Der Erfolg der Plasmabehandlung ist wichtig, damit die nachfolgende Passivierung, die durch Reste des Polymers auf der Oberfläche gestört wird, effektiv ablaufen kann.

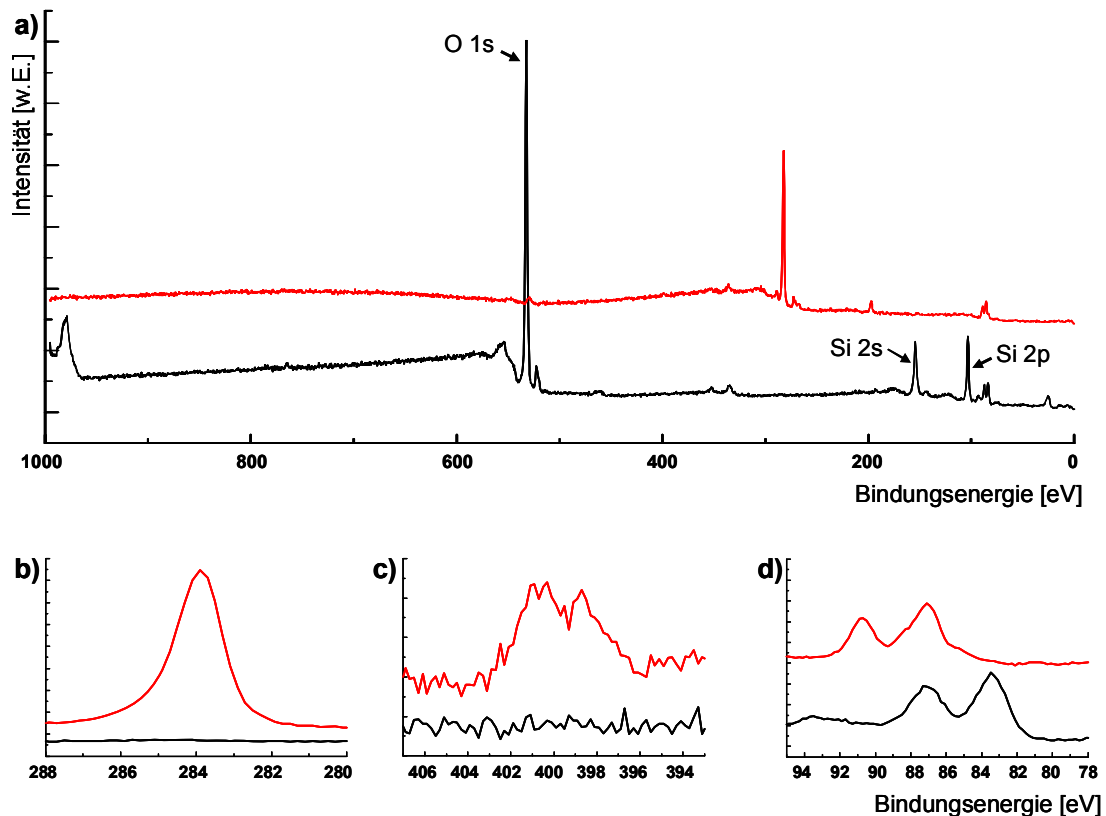


Abb. 4.10: XP-Spektren einer Oberfläche nach der Beschichtung mit Mizellen (rot) und nach erfolgreicher Plasmabehandlung (schwarz). a) Übersichtsspektrum: es ist eine deutliche Zunahme der Si 2p sowie 2s und O 1s sowie ein fast vollständiges Verschwinden des C 1s (b) und N 1s Signals (c) nach der Plasmabehandlung erkennbar, während das Au 4f Signal (d) durch Reduktion zu elementarem Gold zu geringeren Bindungsenergien verschoben ist.

4.3 Abstand der Partikel und Qualität der Ordnung

Wie in Kapitel 4.1 und 4.2 ausgeführt, können mittels Blockcopolymer Mizellarer Lithografie großflächig hexagonal angeordnete Goldpartikel auf verschiedenen Oberflächen wie Glas, Silizium oder Indiumzinnoxid (engl. indium tin oxide, ITO) hergestellt werden. Metallpartikel mit einem Durchmesser zwischen 1 nm und 12 nm und einem Partikelabstand zwischen 20 nm und 250 nm können auf diesem Weg erzeugt werden. Diese Parameter

können über das verwendete Polymer, die Eigenschaften der Mizelllösung sowie die Geschwindigkeit beim Herausziehen aus der Lösung gesteuert werden [159]. Durch Variation der Geschwindigkeit während des Herausziehens der Oberfläche können zusätzlich auf einfachem Weg Gradienten hergestellt werden [161,162].

Abbildung 4.11 zeigt eine Auswahl an mit quasi-hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln dekorierten Glasoberflächen, die in dieser Arbeit verwendet wurden und zu deren Herstellung Polymere verschiedener Länge verwendet wurden. Die gezeigten Abstände variieren zwischen 45 nm und 230 nm. Detaillierte Informationen zu den hierzu verwendeten Parametern und erzielten Ergebnissen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

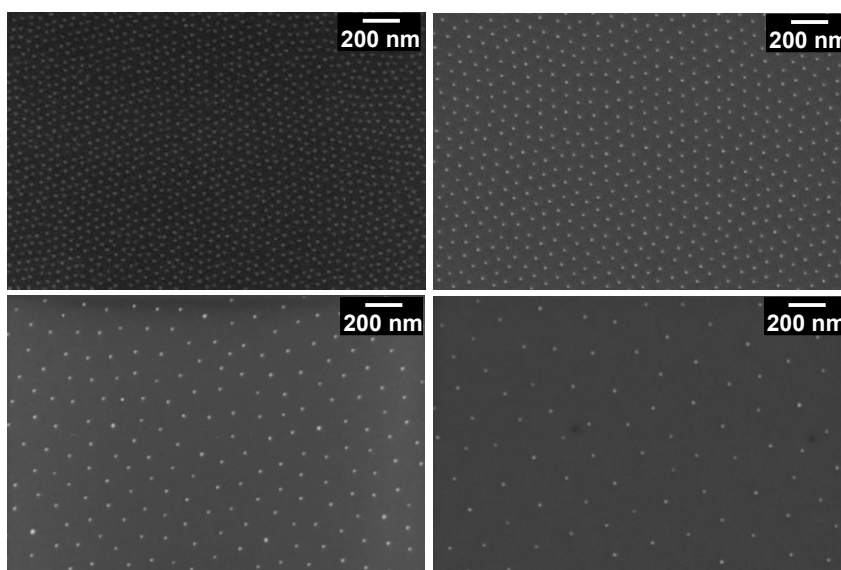


Abb. 4.11: **Goldnanopartikel dekorierte Glasoberflächen mit verschiedenen Partikelabständen.** Die Abstände der mittels BCML hergestellten Strukturen variieren zwischen 45 nm (oben links) und 230 nm (unten rechts). Tabelle 4.1 fasst die verwendeten Parameter sowie die erzielten Ergebnisse zusammen.

Es wurden die in Tabelle 4.1 genannten Polymere verwendet, die von oben nach unten mit aufsteigender molekularer Masse aufgeführt sind. Die Polymerkonzentration c und der Neutralisationsgrad N (siehe Gleichung 4.1) der in dieser Arbeit verwendeten Mizelllösungen lag zwischen 1 und 7 mg mL^{-1} und Werten von $0,1$ bis $0,6$. Alle zu strukturierenden Oberflächen wurden mit konstanter Geschwindigkeit v aus den so charakterisierten Goldbeladenen Mizelllösungen gezogen. Nach dem Verdampfen des Toluols und einer Plasmabehandlung zur Entfernung des Polymers, der Reduktion des Goldsalzes und dem Zusammenschmelzen der Partikel wurden mit Goldpartikeln im Abstand d dekorierte Oberflächen erhalten. Der ebenfalls in Tabelle 4.1 aufgeführte Ordnungsparameter Φ_6 gibt die Güte der hexagonalen Ordnung an (siehe 4.3).

Tab. 4.1: **Parameter und Ergebnisse der zur Herstellung der in Abbildung 4.11 gezeigten hexagonalen Goldstrukturen verwendete Mizellösungen.** c = Konzentration des Polymers in Toluol, N = Neutralisationsgrad, v = Geschwindigkeit, d = Abstand der Partikel \pm Standardabweichung, Φ_6 = Ordnungsparameter.

Polymer	c [mg mL ⁻¹]	N	v [mm min ⁻¹]	d [nm]	Φ_6
PS(52200)- <i>b</i> -P2VP(34000)	5	0,5	40	45 nm \pm 7	0,61
PS(110000)- <i>b</i> -P2VP(52000)	5	0,5	24	85 nm \pm 12	0,75
PS(216000)- <i>b</i> -P2VP(60000)	2	0,5	12	150 nm \pm 23	0,68
PS(557000)- <i>b</i> -P2VP(75000)	1	0,2	7	230 nm \pm 46	0,56

Für viele Anwendungen sind der einstellbare Abstand der Partikel sowie die scharfe Verteilung der Partikelgröße entscheidend. Die Größe der Partikel betrug zwischen 5 nm und 8 nm und wurde durch die vom verwendeten Polymer und Neutralisationsgrad abhängige Menge an Metallvorläufer pro Mizelle festgelegt. Der Abstand der Partikel hingegen wurde zusätzlich durch weitere Parameter beeinflusst. Auch er hing vom verwendeten Polymer ab. Je größer die molekulare Masse des verwendeten Polymers, desto größer waren die gebildeten Mizellen und somit erhöhte sich der Abstand der resultierenden Partikel (siehe Tabelle 4.1). Auch die Ausbildung der Mizellmonolage während des Beschichtungsprozesses hatte entscheidenden Einfluss. Mizellen verhalten sich nicht wie harte Kugeln und können daher während der Adsorption auf der Oberfläche deformiert werden. Die Anzahl adsorbierter Mizellen und die Qualität der entstehenden Monolage hängen vor allem von der Dicke der Lösungsmittelschicht an der Luft-Lösungsmittel-Grenzschicht ab. Experimentell wurde nach Herstellung der beladenen Mizellösung ausschließlich die Geschwindigkeit, mit der die Oberfläche aus dieser gezogen wurde, variiert. Je höher die Geschwindigkeit war, desto geringer war der Abstand der erhaltenen Partikel.

Es wurden verschiedene Substrate mit Goldpartikeln beschichtet. Die Verwendung von Silizium als führte zu nanostrukturierten Oberflächen, die bezüglich der Monodispersität der Partikel wie auch des Ordnungsparameters vergleichbar waren. Im Gegensatz dazu zeigten ITO-Oberflächen aufgrund der höheren Rauigkeit deutliche Unterschiede. Die erzielten Ergebnisse werden in 7.4.2 diskutiert.

4.4 Material und Methoden

Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden ein LEO1530 sowie ein Ultra 55 Mikroskop (beide Zeiss SMT, Oberkochen, Deutschland) verwendet. In beiden Geräten wird der Elektronenstrahl mittels eines Schottky Feldemitters erzeugt. Typische Beschleunigungsspannungen lagen zwischen 3 bis 15 kV, der Druck lag mindestens unterhalb $5 \cdot 10^{-6}$ mbar. Nicht leitende Glasoberflächen wurden vor ihrer Untersuchung mit einer ungefähr 5 nm dicken Graphitschicht beschichtet. Hierzu wurde der MED020 Sputter Coater (BAL-Tec AG Liechtenstein, jetzt Leica Microsystems, Wetzlar) verwendet.

4.4.1 Reinigung der Oberflächen

Glas-Deckgläser (Carl Roth & Co GmbH, Karlsruhe) sowie zugeschnittene Siliziumwafer (Si-Mat Silicon Materials, Landsberg am Lech) mit P/Bor Dotierung und 1-30 Ohm·cm spezifischem Widerstand wurden in Teflonhaltern fixiert und für mindestens 60 min in frisch hergestellter Caroscher Säure, bestehend aus einer 3:1 Mischung aus konzentrierter H_2SO_4 (95%, AppliChem GmbH, Darmstadt) und H_2O_2 (30%, AppliChem GmbH, Darmstadt) gereinigt. Nach intensivem Spülen der Oberflächen mit deionisiertem Wasser, Behandlung für 10 min im Ultraschallbad und erneutem Spülen wurden sie mit Stickstoff trocken geblasen und sofort verwendet.

Mit ITO beschichtete Deckgläser (30-60 Ohm Widerstand, SPI Supplies[®], Westchester, USA) wurden ebenfalls in Teflonhaltern fixiert und 2 mal 10 min in einer 4:1 Mischung aus deionisiertem Wasser und Extran MA01 (Merck, Darmstadt) im Ultraschallbad behandelt. Nach intensivem Spülen mit deionisiertem Wasser, Behandlung für 10 min im Ultraschallbad und erneutem Spülen wurden sie mit Stickstoff trocken geblasen und sofort verwendet.

4.4.2 Herstellung der Mizellösungen

Das jeweilige Polystyrol-*b*-poly-2-vinylpyridin Diblockcopolymer (Polymer Source Inc., Montreal, Kanada) wurde in ein zuvor mittels Caroscher Säure gereinigtes Glasgefäß eingewogen. Die Molekulargewichte $M_{PS\text{-Kette}}$ des Polystyrol- und $M_{P2VP\text{-Kette}}$ des Polyvinylpyridinblocks sowie die Anzahl der Styrol- und Vinylpyridin-Einheiten sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Toluol (zur Analyse, Merck, Darmstadt) wurde für mindestens 20 h gerührt.

Die im Anschluss entsprechend dem gewünschten Neutralisationsgrad N zugegebene Menge an $HAuCl_4$ konnte mittels Gleichung 4.2 berechnet werden.

$$m(\text{Metallsalz}) = \frac{m(\text{Polymer}) * M(\text{HAuCl}_4) * \text{Einheiten (VP)} * N}{M(\text{Polymer})} \quad (4.2)$$

Hierzu müssen die eingewogene Masse an Polymer $m(\text{Polymer})$, die molekulare Masse des eingesetzten Metallsalzes $M(\text{HAuCl}_4)$, die Anzahl der im Polymer enthaltenen P2VP-Einheiten sowie die molekulare Masse des Polymers $M(\text{Polymer})$ bekannt sein. Im Fall von HAuCl_4 variiert abhängig von der Menge an eingelagertem Kristallwasser die molekulare Masse. In dieser Arbeit wurde das Trihydrat ($393,83 \text{ g mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich, Schnelldorf) verwendet.

Die Lösung wurde bis zur Lösung des Metallsalzes unter Lichtausschluss gerührt. Um Polymeraggregate sowie nicht vollständig gelöstes Metallsalz zu entfernen, wurden die Lösungen vor der ersten Verwendung durch einen PTFE-Filter mit einer Porengröße von $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, Eschborn) gefiltert. Die Lösungen wurden unter Lichtausschluss gelagert.

Tab. 4.2: **Zusammensetzung der verwendeten Diblockcopolymeren.** M = Molare Masse

Polymer	$M_{\text{PS-Kette}}$	$M_{\text{P2VP-Kette}}$	Anzahl PS-Einheiten	Anzahl P2VP-Einheiten
PS(52200)- <i>b</i> -P2VP(34000)	52200	34000	501	323
PS(110000)- <i>b</i> -P2VP(52000)	110000	52000	1056	495
PS(216000)- <i>b</i> -P2VP(60000)	216000	60000	2074	571
PS(557000)- <i>b</i> -P2VP(75000)	557000	75000	5348	713

4.4.3 Oberflächenbeschichtung und Plasmabehandlung

Gereinigte Oberflächen wurden durch ihr Herausziehen aus einer Mizelllösung mit einer Mizellmonolage beschichtet. Hierzu wurde eine spezielle angefertigte Apparatur verwendet, um die Geschwindigkeit konstant zu halten. Für alle in dieser Arbeit verwendeten Mizelllösungen wurde die Beschichtung der Oberflächen bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden verschiedene Polymere in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedliche Geschwindigkeiten verwendet, um den Abstand der Partikel einzustellen (siehe Kapitel 4.3). Nach dem vollständigen Verdampfen des Lösungsmittels wurden die Oberflächen für 45 min in einem isotropen Mikrowellenplasmagerät (PVA TePla AG, Wettenberg) behandelt. Hierfür wurden für Silizium- und Glasoberflächen sowohl das TePla100-E bei einem Wasserstoffdruck von 0,4 mbar und einer Leistung von 150 W als auch das TePla PS210

System bei einem Wasserstoffdruck von 0,3 mbar und einer Leistung von 600 W verwendet. Die beiden Prozesse führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Im Fall der ITO-beschichteten Deckgläser wurde ausschließlich das TePla100-E bei einem Sauerstoffdruck von 0,4 mbar und einer Leistung von 150 W genutzt. Aus jeder Charge wurde eine Oberfläche im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Qualität der Ordnung der erzeugten Strukturen sowie die Abstände der Partikel wurden unter Verwendung eines im Folgenden beschriebenen, von Dr. Philippe Girard geschriebenen ImageJ Plugins¹ ausgewertet. Das Plugin basiert auf einem von Kansal *et al.* entwickelten Algorithmus [163].

4.4.4 Ordnungsparameter und Ordnung der Partikel

Mittels BCML auf eine Oberfläche aufgebrachte Mizellen ordnen sich in einer quasi-hexagonalen Struktur auf dem Substrat an. Zur Quantifizierung der hexagonalen Ordnung der resultierenden Partikel wird der Ordnungsparameter Φ_6 verwendet.

$$\Phi_6 = \left| \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \Psi_6(r_j) \right| \quad (4.3)$$

Hier ist N die Anzahl der Partikel im Bild und Ψ_6 der lokale Ordnungsparameter eines Partikels j mit der Position r . Φ_6 kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei $\Phi_6 = 1$ perfekter hexagonaler Ordnung und $\Phi_6 = 0$ vollständiger Unordnung entspricht. Der lokale Ordnungsparameter eines Partikels j und seiner sechs nächsten Nachbarn k berechnet sich nach

$$\Psi_6(r_j) = \frac{1}{n_j} \sum_{k=1}^{n_j} \exp [6i\theta_{jk}] \quad (4.4)$$

wobei θ_{jk} den Winkel der Gerade zwischen dem Partikel j und einem seiner Nachbarn k relativ zu einer festgelegten Referenz bezeichnet und $i^2 = -1$ ist.

Das zur Auswertung verwendete Plugin misst den Winkel θ_{jk} für jeden Partikel und berechnet den realen und imaginären Anteil von Ψ_6 . Somit berechnet sich Φ_6 wie folgt:

$$\Phi_6 = \frac{1}{6N} \sqrt{\left(\sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^6 \cos(6\theta_{jk}) \right)^2 + \left(\sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^6 \sin(6\theta_{jk}) \right)^2} \quad (4.5)$$

¹ Research Services Branch, Image Analysis Software, NIH, USA

Der in Tabelle 4.1 angegebene Abstand d der Partikel auf einer nanostrukturierten Oberfläche wird als Abstand r_{jk} eines Partikels j zu seinen nächsten Nachbarn k berechnet und über alle Partikel im Bild N gemittelt.

$$d = \frac{1}{6N} \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^6 r_{jk} \quad (4.6)$$

Zur Auswertung der Abstände der Partikel und zur Bestimmung des Ordnungsparameters werden REM Bilder nanostrukturierter Oberflächen an verschiedenen Positionen aufgenommen und die erhaltenen Bilder mittels des beschriebenen Plugins ausgewertet. Der Ordnungsparameter wird hierbei nach Gleichung 9, der Abstand nach Gleichung 10 bestimmt.

4.4.5 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die gezeigten XP-Spektren wurden wie in Kapitel 5.3 beschrieben aufgenommen und ausgewertet.

5. Passivierung und Funktionalisierung

Um die in Kapitel 4 und 7 vorgestellten Nano- und Mikronanostrukturen zur Untersuchung und Anwendung von Motorproteinen nutzen zu können, müssen die Bereiche zwischen den Goldpartikeln gegen unspezifische Proteinadsorption passiviert werden. Dies ermöglicht die selektive Funktionalisierung der Goldpartikel im darauf folgenden Schritt. Passivierung und Funktionalisierung sind die Grundlage für die Verwendung der Oberflächen zur gerichteten Proteinanbindung. Auf diesem Weg wird sichergestellt, dass Proteine funktional angebunden werden und somit ihre Aktivität nicht beeinträchtigt wird.

Der erste Teil des Kapitels beschäftigt sich mit der Passivierung der Oberfläche zwischen den Goldpartikeln mittels proteinresistenter Polyethylenglykolschichten gefolgt von ihrer Funktionalisierung mittels verschiedener Moleküle im zweiten Teil. Es wurden drei Moleküle zur Goldpartikelfunktionalisierung verwendet: 1) Nitriilotriacetat, das die Anbindung von Proteinen über Chelatisierung ermöglicht, 2) Biotin, das durch die spezifische Wechselwirkung mit dem tetrameren Protein Streptavidin zur Anbindung biotinylierter Proteine verwendet werden kann und 3) Coenzym A, das durch Nutzung der enzymatischen Aktivität einer Phosphopantetheinyltransferase zur kovalenten Proteinanbindung geeignet ist.

5.1 Proteinresistente Beschichtungen

Die Verminderung unspezifischer Proteinadsorption auf Oberflächen hat in den Bereichen der Medizin, Bioanalytik und Nanotechnologie große Bedeutung [164]. Um dieses Ziel zu erreichen, werden Oberflächen mit Proteinresistenz erzeugenden Makromolekülen beschichtet. Es werden standardmäßig Monolagen sterisch anspruchsvoller Polyether, so genannter Polyethylenglykole (PEG) verwendet, deren proteinresistenter Charakter auf verschiedenen Faktoren beruht [165,166,167]. Ein wichtiger Faktor ist die so genannte sterische Stabilisierung, die auf zwei Phänomenen, der Volumeneinengung und dem Volumenausschluss, beruht. Nähert sich ein Protein der PEG-beschichteten Oberfläche, so sind zwei Vorgänge denkbar. Nach der Theorie der Volumeneinengung kann das Protein die Polymerschicht nicht durchdringen und das Volumen dieser wird durch Kompression verkleinert.

Infolgedessen kommt es zu einer Entropieabnahme der PEG-Moleküle und einer Zunahme der freien Enthalpie, da das Polymer im komprimierten Zustand eine geringere Anzahl an Konformationen einnehmen kann (Abb. 5.1 links). Dies führt zur Abstoßung des Proteins und wird auch als entropische Stabilisierung bezeichnet [167]. Im Gegensatz zur Volumeneinengung, die die enthalpische Beiträge vernachlässigt, ist nach der Theorie des Volumenausschlusses das Protein in Kontakt mit der Polymerschicht und kann diese durchdringen. Es kommt ebenfalls zu einer konformativen Entropieabnahme sowie einer teilweisen Verdrängung der Lösungsmittelmoleküle aus der Kontaktzone. Dies hat zusätzlich eine Enthalpieänderung zur Folge, da die PEG-Moleküle anstelle von Lösungsmittelmolekülen von Proteinen umgeben sind. In der Summe ergibt sich dann eine Zunahme der freien Enthalpie, die Proteinadsorption verhindert [167].

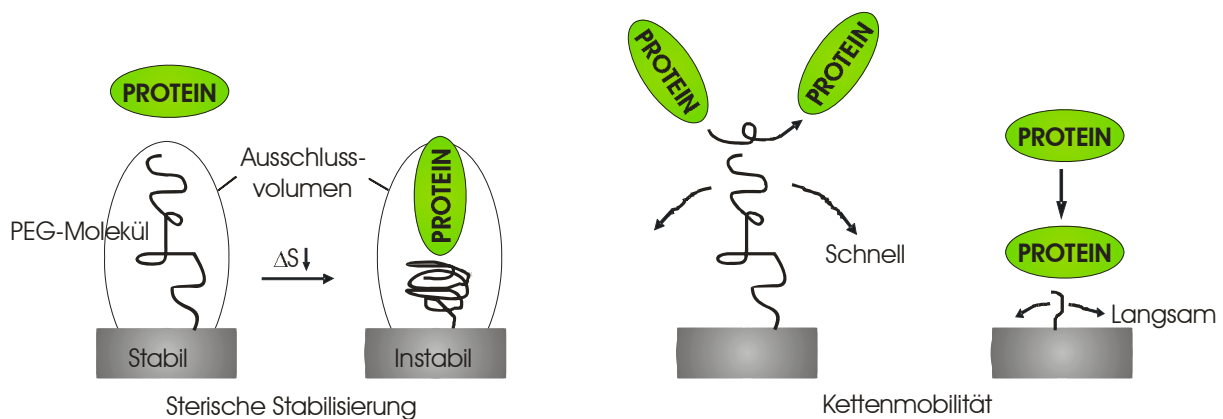


Abb. 5.1: **Mechanismen der Proteinresistenz von PEG-Oberflächen.** Links: Sterische Stabilisierung aufgrund eines Entropieverlusts in Folge von Kompression des PEG-Moleküls, rechts: Stabilisierung durch Kettenmobilität. Je länger die Kette, desto schneller die Bewegung und stärker die passivierende Wirkung [167].

Eine Erhöhung der Oberflächendichte, d. h. der Anzahl der pro Fläche gebundenen Polyethylenglykole, führt zu einer Verbesserung der Proteinresistenz. Dies beruht auf der Ausbildung so genannter Polymerbürsten, welche durch eine Streckung der PEG-Ketten verursacht wird und die sterische Repulsion maximiert [166].

Ein weiterer Faktor ist die Mobilität der PEG-Kette. Aufgrund des Fehlens sterisch anspruchsvoller Seitengruppen, sind PEG-Moleküle sehr flexibel und bewegen sich schnell auf der Oberfläche. Die Adsorption eines Proteins setzt Kontakt mit der Oberfläche voraus. Dieser wird durch die schnelle Fluktuation der Polymerketten verhindert [167]. PEG-Moleküle mit höherem Molekulargewicht zeigen größere Mobilität und weisen somit eine stärkere Proteinresistenz auf (Abb. 3.1 rechts).

Experimentelle Untersuchungen zeigen, dass die beschriebenen theoretischen Ansätze keine generelle Beschreibung inerte Oberflächen bieten. Bisher untersuchte proteinresistente Oberflächen weisen jedoch vier gemeinsame Eigenschaften auf. Sie sind hydrophil, enthalten Akzeptoren für Wasserstoffbindungen aber keine Donoren und sie sind elektronisch neutral. Somit ist die Fähigkeit stark mit Wassermolekülen in Wechselwirkung zu treten eine wesentliche Eigenschaft proteinresistenter Beschichtungen [168,169].

PEG ist als hydrophiles Polymer sowohl in organischen, als auch in wässrigen Medien löslich. Anders als andere Polyether ist PEG in allen Verhältnissen mit Wasser mischbar. Die gute Löslichkeit hängt direkt mit einer geringen Störung der Wasserstruktur zusammen. Dies resultiert in minimalen hydrophoben Wechselwirkungen. In wässriger Lösung binden zwei bis drei Wassermoleküle pro Ethylenglykoleinheit an PEG [170]. Aufgrund dieses hohen Grades an Solvatisierung und des flexiblen Rückgrads erscheint PEG in Lösung um ein Vielfaches größer, als Proteine derselben molekularen Masse. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass es in salzhaltigen, wässrigen Lösungen wie beispielsweise Puffern zu einem Aussalzeffekt, d. h. Kationen koordinieren an die Sauerstoffatome der PEG-Einheiten, kommt. Dies führt zu einer Verdrängung von Wassermolekülen und der Quellgrad wird minimiert [171].

Die Erzeugung proteinresistenter Schichten auf Oberflächen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Einerseits können mit Ankergruppen funktionalisierte PEG-Moleküle direkt an die Oberfläche angebunden werden [172,173,174,175,176]. Andererseits ist auch ein Zweistufenmechanismus möglich, der aus der Anbindung kleiner Moleküle mit funktioneller Gruppe und deren Umsetzung mit einem ebenfalls funktionalisierten PEG-Molekül besteht [177,178,179].

Neben der kovalenten Anbindung besteht auch die Möglichkeit der ionischen Wechselwirkung zwischen polyionischen PEG-Pfropfcopolymeren und entgegengesetzt geladenen Oberflächen. Ein Beispiel hierfür ist polykationisches Poly-L-Lysin-polyethylen-glykol (PLL-PEG), welches für die Passivierung negativ geladener Oberflächen wie Silizium und Glas eingesetzt wird. Nachteilig sind jedoch die im Vergleich mit kovalent angebundenen Molekülen geringere Stabilität aufgrund von Desorption und Austauschreaktionen der PLL-PEG Moleküle [180].

5.1.1 Passivierung Goldpartikel beschichteter Oberflächen

Die mittels Blockcopolymer Mizellarer Lithografie (BCML) mit Goldnanopartikeln strukturierten Glas oder Siliziumoberflächen können in den Bereichen zwischen den Partikeln mit einer proteinresistenten PEG-Schicht funktionalisiert werden. Diese selektive Passivierung beruht auf der Kombination der beiden chemisch sehr unterschiedlichen Materialien Silizium oder Glas

und Gold. Die Goldpartikel können über Thiolchemie mit organischen Molekülen funktionalisiert und dann zur orientierten Immobilisierung von Proteinen genutzt werden. Die dazwischen liegende Oberfläche kann hingegen über Silanchemie selektiv funktionalisiert werden. Hier ist die Schichtdicke der in wässriger Lösung geschwollenen, proteinresistenten Schicht entscheidend. Ist sie zu dünn, wird keine ausreichende passivierende Wirkung erzielt. Ist sie zu dick, kommt es zu einer Abschirmung der Partikel, so dass die Effizienz der nachfolgenden Funktionalisierung drastisch reduziert wird. Die optimale Schichtdicke liegt mit 5 nm im Bereich des Durchmessers der Goldpartikel. Die optimale Proteinresistenz wird nur im solvatisierten Zustand erreicht [181].

In dieser Arbeit wurde der in Abbildung 5.2 gezeigte, aufgrund des Molekulargewichts der PEG-Kette (2000 g mol^{-1}) als PEG2000 bezeichnete Harnstoff zur Passivierung von Glas- und Siliziumoberflächen verwendet. Er wurde, wie in Abbildung 5.2 dargestellt, in einer einstufigen Reaktion aus 3-Isocyanatopropyltriethoxysilan und ω -Aminopolyethylenglykolmonomethylether hergestellt [182].

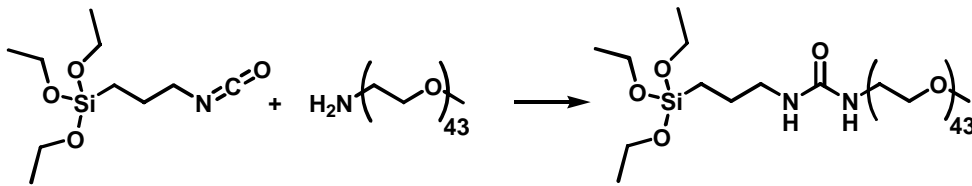


Abb. 5.2: **PEG2000-Synthese**. Durch Reaktion von 3-Isocyanatopropyltriethoxysilan mit ω -Aminopolyethylenglykolmonomethylether wird der als PEG2000 bezeichnete Harnstoff erhalten [182].

Die Anbindung des synthetisierten Alkoxysilans erfolgte an die durch Plasmabehandlung hydrophilierte Oberfläche (Abb. 5.3). Das Polyethylenglykol wird auf diesem Weg stabil an die Oberfläche angebunden.

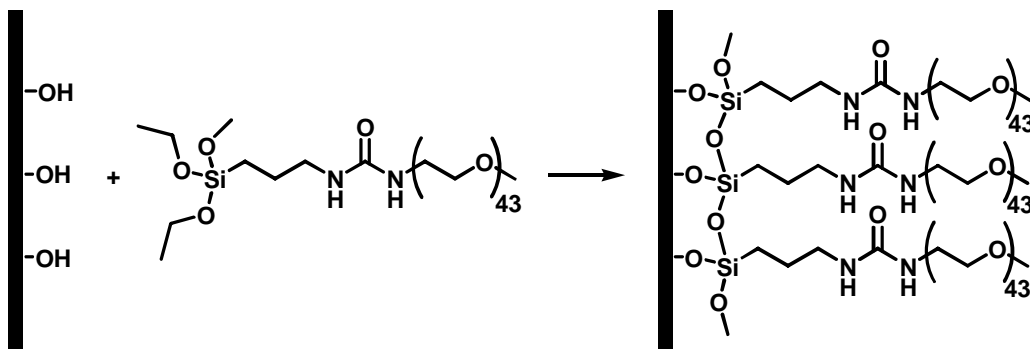


Abb. 5.3: **Passivierung der Oberfläche**. Durch Reaktion der Hydroxy-terminierten Oberfläche mit dem Alkoxysilan PEG2000 wird die passivierende Polyethylenglykolschicht angebunden.

Der Nachweis der passivierenden Wirkung der PEG-Schicht erfolgte als interne Kontrolle in jedem Experiment. Hierzu wurden die Glasoberflächen nur zur Hälfte mittels BCML strukturiert, so dass ein als Dippkante bezeichneter Bereich entsteht, der den strukturierten vom nicht strukturierten Bereich trennt. Abbildung 5.4 zeigt links eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme dieses Übergangs. Die Goldpartikel sind ausschließlich im oberen Teil lokalisiert. Der rechte Teil der Abbildung zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in diesem Bereich nach Passivierung der Glasoberfläche mit PEG2000 und Anbindung eines GFP-funktionalisierten Motorproteins. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anbindung ausschließlich auf den Goldpartikeln erfolgte, da im Falle unspezifischer Adsorption auf der Glasoberfläche auch im unteren Teil Fluoreszenz detektiert worden wäre. Die Passivierung wurde innerhalb jeden Experiments mittels dieser internen Kontrolle überprüft.

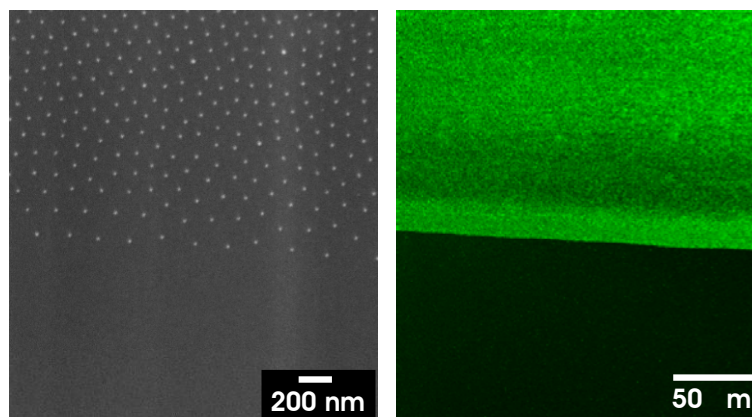


Abb. 5.4: **Kontrolle der Passivierung.** Der als Dippkante bezeichnete Übergang zwischen Goldpartikeldekorierte und undekorierte Oberfläche dient als interne Kontrolle der Passivierung. Die REM-Aufnahme (links) zeigt die Dippkante und die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (rechts) die Verhinderung unspezifischer Proteinadsorption im unteren, nur mit PEG2000 bedeckten Teil der Oberfläche.

5.2 Gerichtete Proteinnanbindung

Proteinnanbindung ist der entscheidende Schritt für die Verwendung mikro- und nanostrukturierter Oberflächen zur Untersuchung biologischer Fragestellungen. Die Aktivität und somit einwandfreie Funktion eines auf einer Oberfläche angebundene Proteins hängt neben der Erhaltung der nativen Konformation maßgeblich von seiner Orientierung ab. Nur wenn es in der richtigen Orientierung angebinden wird, ist die freie Zugänglichkeit der aktiven Domänen möglich. Hierzu muss die Anbindung spezifisch über definierte Aminosäuren oder Sequenzen des Proteins erfolgen, so dass maximale Aktivität erzielt werden kann. Im Folgenden werden physikalische, kovalente und bioaffine Anbindungsmethoden

verglichen, die in dieser Arbeit verwendeten Strategien erläutert und die erzielten Ergebnisse vorgestellt.

Generell gibt es viele Möglichkeiten Proteine an Oberflächen anzubinden. Die einfachste Variante stellt die unspezifische Physisorption dar, die auf ionischen, hydrophoben und polaren Wechselwirkungen beruht. Diese Methode weist die deutlichen Nachteile willkürlicher Orientierung sowie geringer Stabilität der Anbindung auf. Als Resultat kann ein hoher Anteil der Proteine inaktiv sein und es kann bei Austausch des verwendeten Puffers zu einer Ablösung des Proteins kommen [183].

Die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen funktionellen Gruppen bestimmter freizugänglicher Aminosäuren des Proteins und chemisch aktivierten Oberflächen stellt eine attraktivere Alternative dar. Vor allem die in Proteinen häufig vorkommenden funktionellen Gruppen wie Amino-, Hydroxy-, Carbonsäure- und Thiolgruppen, aber auch der C- und N-Terminus des Polypeptids werden in Kombination mit diversen, an die Oberfläche gebundenen Funktionalitäten wie Aldehyden, Epoxiden, Aminen, und Aktivestern unter Verwendung etablierter Biokonjugationstechniken genutzt [184]. Vergleichende Untersuchungen zeigen, dass dies zu homogeneren Oberflächen und deutlich höherer Reproduzierbarkeit als Anbindung über Physisorption führt [185]. Beide Methoden bedingen jedoch durch die direkte Wechselwirkung des Proteins mit der Oberfläche häufig einen Verlust oder einer Verringerung seiner Aktivität. Zusätzlich erlauben diese Methoden oftmals nur eine geringe Kontrolle über die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche, sowie über die Regioselektivität, da die funktionellen Gruppen in der Regel mehrfach vorkommen und die Reaktion eines spezifischen Aminosäurerests nicht gesteuert werden kann. Es resultieren, bis auf einige Beispiele, in denen eine einzelne, reaktive Aminosäure zur Anbindung genutzt werden konnte, geringe Reproduzierbarkeit, geringe Effizienz der Wechselwirkung und hohe Fehleraten im auf die Anbindung folgenden Experiment [186]. Diese Methode ist somit für eine Proteinanbindung auf Goldnanostrukturen eher ungeeignet, da hier durch die im Vergleich zur homogenen Oberflächen geringe Anzahl an Proteinen diese Probleme noch verstärkt werden.

Des Weiteren können bioaffine Wechselwirkungen zur Proteinimmobilisierung genutzt werden. Ein Beispiel ist die hohe Affinität von Biotin zu Avidin und Streptavidin [187]. Um sie zu nutzen muss das Protein durch Biotinylierung modifiziert werden. Erst dann kann es mit auf der Oberfläche immobilisiertem Streptavidin oder Avidin wechselwirken. Durch Verminderung der Protein-Oberflächen-Wechselwirkung ist die Aktivität des Proteins im Vergleich zur direkten Anbindung mittels Physisorption und Chemisorption (siehe oben) höher, da es in deutlich geringerem Ausmaß zu Denaturierung kommt. Allerdings ist bei Verwendung der kommerziell erhältlichen Biotinylierungsreagenzien die Anbindung des Biotins nicht selektiv,

so dass es willkürlich an mehrere Aminosäuren des Proteins anbindet. Somit kann auch in diesem Fall die Orientierung des Proteins auf der Oberfläche nicht ausreichend kontrolliert werden. Es existieren jedoch Verfahren zur orientierten Biotinylierung, die diesen Nachteil eliminieren und orientierte Anbindung ermöglichen [188]. Abbildung 5.5 fasst die vorgestellten Verfahren zur Anbindung von Proteinen an Oberflächen zusammen. Neben der physikalischen Anbindung, die heterogen beschichtete Oberflächen erzeugt, und kovalenter Anbindung, die oftmals den Nachteil des Aktivitätsverlusts durch Denaturierung aufweist, führt vor allem die bioaffine Anbindung zur orientierten Anbindung aktiver Proteine.

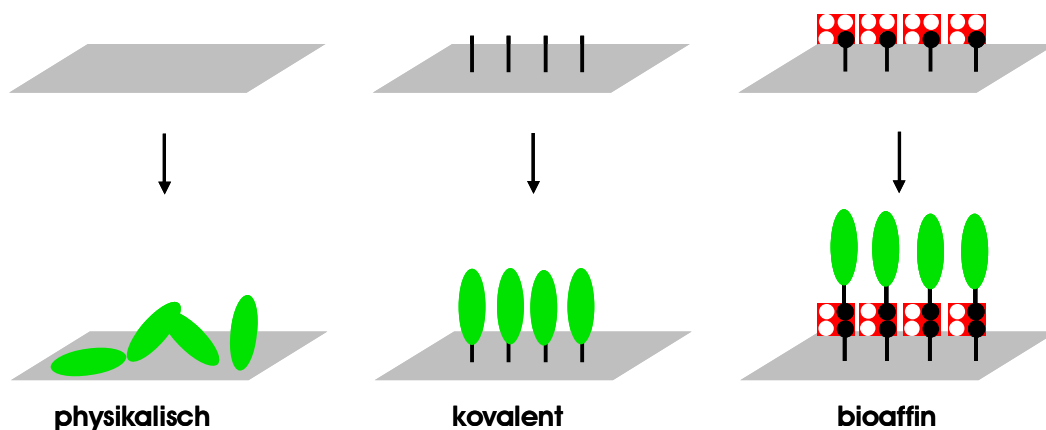


Abb. 5.5: **Proteinanbindung**. Physikalische Anbindung führt zu heterogen beschichteten Oberflächen, während kovalente wie auch bioaffine Anbindung Orientierung ermöglichen. Letztere erhält zusätzlich durch reduzierte Wechselwirkung mit der Oberfläche die Aktivität des Proteins [183].

Orientierte Anbindung kann wie oben ausgeführt durch hochaffine Wechselwirkungen zwischen einer spezifischen Sequenz des Proteins und einem auf der Oberfläche immobilisierten Molekül sowie durch kovalente Anbindung erfolgen. In beiden Fällen ist die Lokalisation der zur Anbindung verwendeten Sequenz an einer bestimmten Stelle des Proteins Voraussetzung für den Erfolg der orientierten Anbindung. Die beste Methode zur Einführung dieser Sequenz ist die Modifikation der DNS des entsprechenden Proteins. Das rekombinante Protein wird dann mit der gewünschten Sequenz exprimiert, die oftmals auch zur Aufreinigung verwendet werden kann. Es existieren verschiedene standardmäßig rekombinant einführbare Sequenzen. Das am häufigsten verwendete System besteht aus einer Histidinsequenz, die koordinative Bindungen mit an eine Oberfläche gebundenen Übergangsmetallionen eingehen kann. Ein standardmäßig zur Immobilisierung dieser Ionen auf Oberflächen verwendetes Molekül ist der Chelator Nitrilotriacetat (NTA). Der meist mit Ni^{2+} beladene Chelator ist sowohl zur Aufreinigung rekombinanter Proteine mit Histidinsequenz als auch zur orientierten Anbindung dieser auf Oberflächen geeignet [189, 190].

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Methoden zur orientierten Anbindung verwendet. Mit Ni^{2+} beladenes Nitrilotriacetat wurde zur Anbindung Histidin-funktionalisierter Motorproteine verwendet (siehe 5.2.1), während das Biotin-Streptavidin-System Anwendung zur Funktionalisierung eines Templates zur Mikrotubulianbindung und -polymerisation fand (siehe 5.2.2). Des Weiteren wurde eine Methode zur deutlich stabileren, kovalenten Proteinanbindung unter Nutzung der enzymatischen Aktivität der Phosphopantetheinyltransferase Sfp untersucht (siehe 5.2.3). Bei allen Methoden wurden die Goldnanopartikel mittels organischer Thiole funktionalisiert, so dass es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen den Goldatomen der Partikel und den Schwefelatomen der eingesetzten Moleküle kam. Die sich ergänzenden Methoden ermöglichen die orientierte und stabile Anbindung verschiedener Proteine an Goldnanopartikel. Im Folgenden werden die drei in dieser Arbeit verwendeten Funktionalisierungstechniken vorgestellt.

5.2.1 Nitrilotriacetat und Nickel(II)

Der Komplexbildner Nitrilotriacetat (NTA) wird standardmäßig zur Aufreinigung und Immobilisierung Histidin-funktionalisierter Proteine verwendet. NTA ist ein vierzähliger Ligand und bildet mit zweiwertigen Kationen wie Ni^{2+} oktaedrische Komplexe aus (Abb. 5.6). An die beiden nicht durch Sauerstoff- und Stickstoffatome des NTAs besetzten Koordinationsstellen des Nickels können weitere Liganden koordinieren. In wässriger Lösung sind sie von Wasser besetzt. Sie können jedoch durch andere Liganden wie der Aminosäure Histidin besetzt werden. Die Bindung erfolgt durch Koordination der Imidazoleinheit in der Seitenkette des Histidins an die chelatisierten Übergangsmetallionen. Somit können Proteine, die eine Histidinsequenz tragen, selektiv immobilisiert werden. Diese Sequenz dient als hochaffine Erkennungssequenz für das chelatisierte Metallion [191].

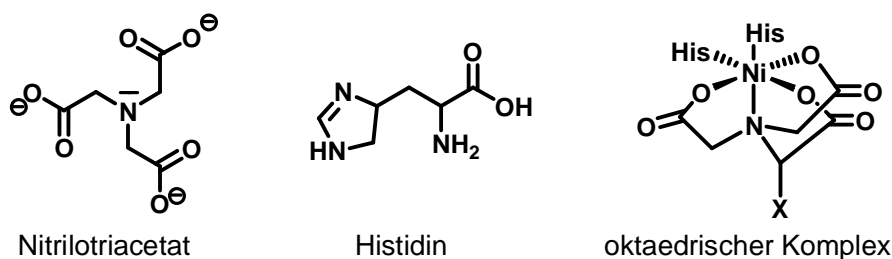


Abb. 5.6: **Strukturformeln der an der Anbindung beteiligten Moleküle.** Der vierzählige Chelator Nitrilotriacetat bildet mit Ni^{2+} einen oktaedrischen Komplex, dessen zwei verbleibende Bindungsstellen mit Histidinen belegt werden können.

Die Funktionalisierung von Proteinen mit Oligohistidin-Sequenzen und deren chemische Erkennung durch die mit Ni^{2+} beladenen NTA-Komplexe, können daher zur Anbindung auf Oberflächen und Aufreinigung von Proteinen genutzt werden [190,192]. Im Vergleich zur unspezifischen Physisorption, die zu Denaturierung sowie Blockade der reaktiven Domänen und somit Einschränkung oder Verlust der Funktion führen kann, bewirkt die Anbindung über NTAs eine orientierte Anbindung in der nativen Konformation [189].

Diese Immobilisierung durch Komplexierung der Histidinsequenz ist spezifisch, da nur die selten vorkommenden Histidine und Cysteine ausreichende Affinität zu Übergangsmetallionen zeigen. Des Weiteren sind die Komplexe unter physiologischen Bedingungen stabil und klein. Somit üben sie minimalen Einfluss auf biochemische und physikochemische Eigenschaften der Proteine aus [193]. Die Proteinanbindung über dieses Chelatorsystem ist reversibel, so dass Proteine unter milden Bedingungen wieder freigesetzt werden können. Dies kann unter anderem durch Verdrängung des Proteins durch den monovalenten Konkurrenten Imidazol oder Chelatisierung des Ni^{2+} durch EDTA erfolgen [189].

Untersuchungen von André *et al.* zeigen zusätzlich, dass NTAs selektiv verschiedene Oligohistidine binden. Konkurrieren mit einer Hexa- und Decahistidin-Sequenz funktionalisierte Peptide um immobilisierte NTA-Chelatoren, zeigen diese eine klare Affinität für die Anbindung des Decahistidins [194]. Somit können über NTAs nicht nur selektiv mit Histidinsequenzen funktionalisierte Proteine angebunden, sondern es kann auch zwischen unterschiedlichen Längen der Sequenz unterschieden werden.

Die Affinität des NTA- Ni^{2+} -His Systems erreicht im Fall monovalenter NTAs, d. h. Moleküle mit einer NTA-Einheit, nicht die hohen Werte des Biotin-Streptavidin Systems [195,196]. Daher kann es zu unerwünschter Proteindissoziation kommen, wenn gemischte Monolagen aus NTA-funktionalisierten Molekülen und Matrixmolekülen verwendet werden. Neben monovalenten NTAs wurden daher multivalente Systeme mit bis zu vier Chelatoreinheiten entwickelt, um das Problem der Metall- und Proteindissoziation zu lösen. Die Affinität und Stabilität steigt mit der Anzahl der möglichen Bindungen, das heißt sowohl eine Erhöhung der Multivalenz der NTAs als auch der Histidine bewirkt eine stabilere Bindung. Im Gegensatz zu mono-NTAs können Proteine mit multi-NTAs daher auch bei geringen Chelatorkonzentrationen auf der Oberfläche stabil immobilisiert werden [193].

Auf homogen mit NTA bedeckten Oberflächen bzw. bei hohen NTA-Konzentrationen unterscheiden sich mono- und multi-NTAs nicht. Proteine können mit gleicher Stabilität immobilisiert werden und ihre Aktivität bleibt in der Regel erhalten [197,198]. Auch bei Funktionalisierung von Goldnanopartikeln mit NTAs sollte kein Unterschied zwischen mono- und multi-NTAs bestehen, da keine Mischungen mit Matrixmolekülen verwendet werden. Somit wird die Oberfläche des Partikels homogen mit dem NTA bedeckt.

In dieser Arbeit wurden NTAs zur orientierten Anbindung von Motorproteinen auf mittels BCML (siehe Kapitel 4) hergestellten Goldnanopartikeln verwendet, um die freie Zugänglichkeit ihrer Motordomänen zu gewährleisten und somit maximale Aktivität zu erzielen. Dies diente dem Ziel eine universelle Methode zu ihrer Untersuchung zu entwickeln.

Untersuchungen von Valiokas *et al.* zeigen, dass die Wechselwirkung sterisch anspruchsvoller NTA-Gruppen die dichte Packung der Alkylketten des Moleküls verhindert. Dies begünstigt unspezifische Adsorption auf der Oberfläche [199]. Somit wurde die Anbindung des NTAs auf den Goldpartikeln in dieser Arbeit in zwei Schritten durchgeführt.

Abbildung 5.7 zeigt die Funktionalisierung der Partikel mit Nitrilotriacetat. Ausgehend von 11-Mercaptoundecansäure (1) wurde zunächst durch Umsetzung mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) die Carbonsäurefunktion als so genannter NHS-Ester (2) aktiviert [200,201]. Im Anschluss wurde der Aktivester über seine Thiolgruppe an die Goldpartikel angebunden. Die Bereiche zwischen den Partikeln wurden zuvor mit dem in 5.1.1 beschriebenen PEG2000 passiviert. Im nächsten Schritt gelang die Einführung der NTA-Gruppe durch Reaktion des Aktivesters mit dem Lysinderivat N_{α},N_{α} -Bis(carboxymethyl)-*L*-Lysin auf der Oberfläche.

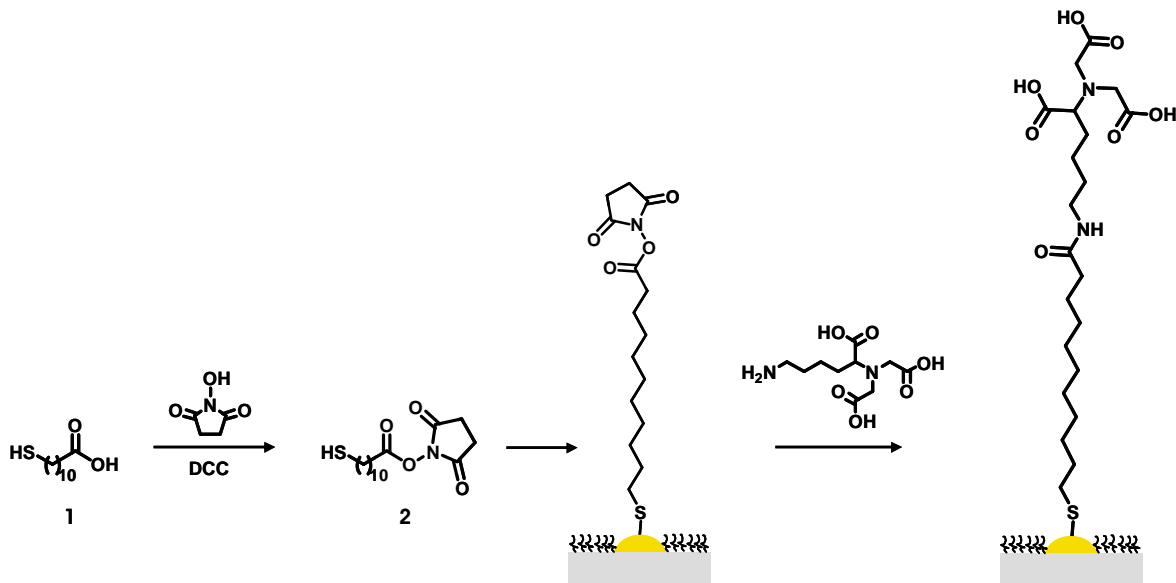


Abb. 5.7: **Schema der Funktionalisierung der Goldpartikel mit NTA.** 11-Mercaptoundecansäure (1) wurde zum NHS-Ester (2) umgesetzt und über die Thiolgruppe auf den Goldpartikeln angebunden. Im Anschluss wurde die NTA-Gruppe durch Reaktion mit dem Lysinderivat eingeführt.

Die Anbindung des Aktivesters an Gold und seine Reaktion zum NTA wurde im Röntgenphotoelektronenspektroskop auf homogenen Goldoberflächen untersucht. Abbildung 5.8 zeigt typische C1s-, N1s-, Au4p_{3/2}- , O1s- und S2p-Detaillspektren des angebundenen Aktivesters. Es waren deutliche Signale dieser im Molekül vorhandenen Atome nachweisbar. Das

Kohlenstoffsignal ist aufgrund der sich unterscheidenden chemischen Umgebung der Kohlenstoffe im Molekül aufgespalten. Die Bindungsenergie der Carbonylkohlenstoffe ist hierbei aufgrund des elektronenziehenden Charakters des Sauerstoffs zu höherer Bindungsenergie verschoben. Zusätzlich verursachen die den Carbonylgruppen benachbarten Kohlenstoffe eine deutliche Schulter am aliphatischen Signal. Das Stickstoffsignal bei 401,5 eV zeigt, dass der Aktivester intakt und nicht zur deaktivierten Carbonsäure abreagiert war. Das Schwefel S2p-Signal sollte in ein Dublett aus S2p_{3/2} und S2p_{1/2} mit einem Intensitätsverhältnis 2:1 aufspalten. Da die Intensität aber aufgrund des Vorhandenseins nur eines Schwefelatoms im Molekül sowie seiner Lage in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche gering ist, ist diese Aufspaltung nicht erkennbar.

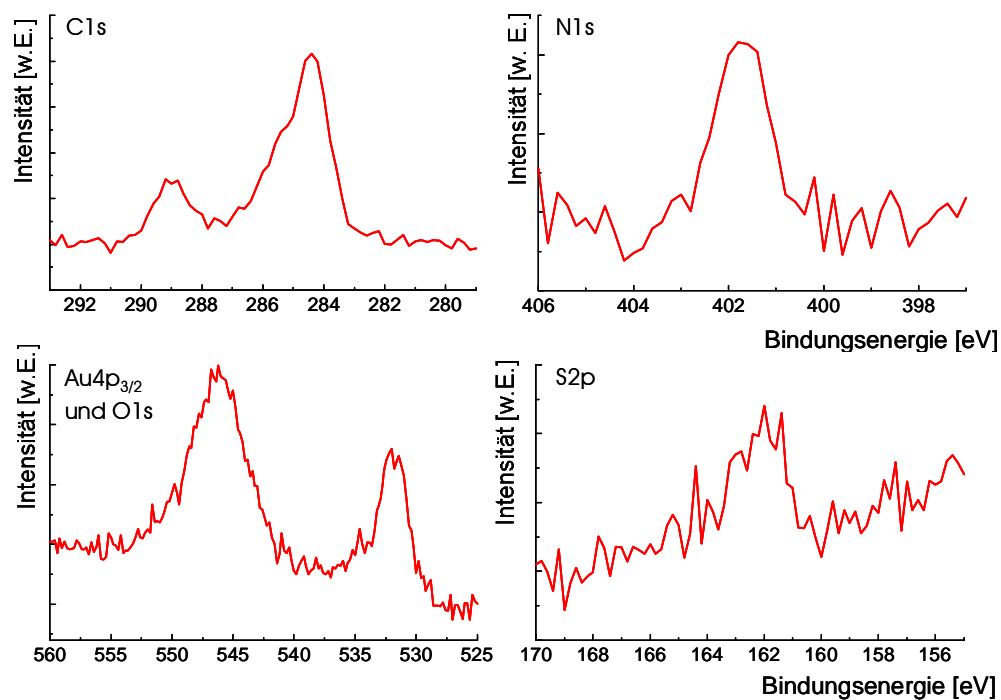


Abb. 5.8: **XP-Detailspektren der Aktivester-funktionalisierten Oberfläche.** Ein deutliches Kohlenstoff-Stickstoff-, Sauerstoff- und Schwefelsignal sind erkennbar. Die Aufspaltung des Kohlenstoffsignals beruht auf der unterschiedlichen chemischen Umgebung der Kohlenstoffe im Molekül.

Durch Auswertung der Intensitätsverhältnisse der Signale der Elemente zueinander konnte die Elementzusammensetzung der Oberfläche quantitativ bestimmt werden. Hierzu wurde Gleichung 5.1 (siehe unten) verwendet, die die Abschwächungslängen und Wirkungsquerschnitte der verschiedenen Atome berücksichtigt. Tabelle 5.1 fasst die theoretischen sowie die mittels dieser Methode ermittelten Signalverhältnisse zusammen. Im Rahmen der Genauigkeit der Methode stimmen die Werte miteinander überein auch wenn sich vor

allem beim Verhältnis des Kohlenstoffs zum Schwefel eine deutliche Abweichung zeigt. Dies ist jedoch aufgrund verschiedener Faktoren wie der Lage des Schwefels im Molekül zu erwarten.

Tab. 5.1: **Elementzusammensetzung der Aktivesteroberfläche.**

Signale	theoretisches Signalverhältnis	ermitteltes Signalverhältnis
C1s : N1s	2,75:1	2,4:1
C1s : O1s	11:1	12,3:1
C1s : S2p	11:1	14,6:1

Des Weiteren belegt auch die Auswertung der Signalverhältnisse der Kohlenstoffe in unterschiedlicher chemischer Umgebung, dass der intakte Aktivester auf der Oberfläche angebunden wurde. Abbildung 5.9 zeigt die einzelnen Signale der verschiedenen Kohlenstoffe. Das Signal ist in Einzelsignale bei 288,6 eV, 286,2 eV und 284,5 eV in einem Verhältnis von 1:1:3,2 aufgespalten. Diese konnten den Carbonylkohlenstoffen, den Kohlenstoffen neben Carbonylkohlenstoffen und den aliphatischen Kohlenstoffen, die in einem theoretischen Verhältnis von 1:1:3 stehen zugeordnet werden.

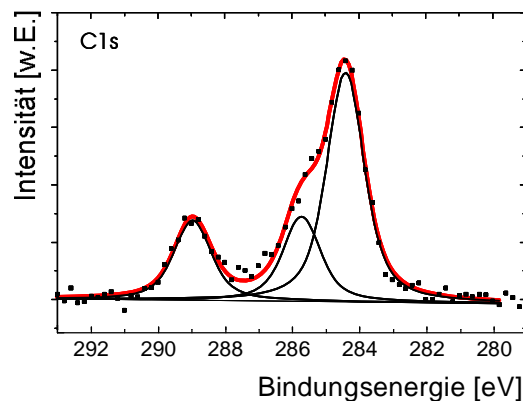


Abb. 5.9: **C1s XP-Detailsspektren des Aktivesters.** Das Verhältnis der Kohlenstoffe in unterschiedlicher chemischer Umgebung zueinander beträgt 1:1:3,2.

Auch die Einführung der NTA-Gruppe wurde im XPS überprüft. Die Art der im Molekül vorhandenen Atome verändert sich nach der Reaktion nicht. Somit waren auf der NTA-Oberfläche die gleichen Signale nachweisbar wie auf der Aktivesteroberfläche. Auch ihr Verhältnis zueinander war mit dem der Aktivesteroberfläche vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Dies war aufgrund der ähnlichen Elementverhältnisse in beiden Molekülen zu erwarten. Trotzdem

konnte die erfolgte Reaktion anhand der in Abbildung 5.10 gezeigten N1s Detailspektren belegt werden. Die Abbildung zeigt die N1s Detailspektren der Aktivesteroberfläche (rot) sowie der Oberfläche nach Reaktion zum NTA (schwarz). Nach der Reaktion des Aktivesters zum NTA verschiebt sich die Lage des Signals aufgrund der veränderten chemischen Umgebung des Stickstoffs um ca. 1,5 eV auf 400 eV. Zusätzlich wird eine annähernde Verdoppelung der Fläche unterhalb des Signals beobachtet. Dies ist aufgrund der Erhöhung der Anzahl der Stickstoffe im Molekül von 1 auf 2 zu erwarten. Die beiden Veränderungen belegen die erfolgreiche Funktionalisierung der Goldoberfläche mit dem Chelator NTA.

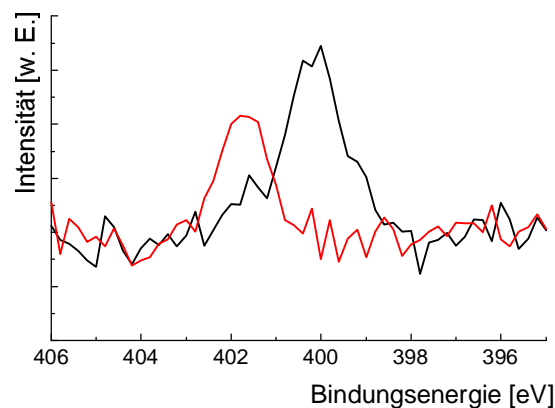


Abb. 5.10: **N1s XP-Detailsspektren des Aktivesters sowie des NTAs.** Das Signal des NTAs (schwarz) verschiebt sich im Verhältnis zum Aktivester (rot) zu niedrigerer Bindungsenergie und das Integral unter der Kurve verdoppelt sich.

Das an die Oberfläche angebundene NTA wurde mit Ni^{2+} beladen, so dass im Anschluss mit einer Histidinsequenz funktionalisierte Motorproteine angebunden werden konnten. Zunächst wurde das mit einer Sequenz aus sechs aufeinander folgenden Histidinen funktionalisierte Rattenkinesin rk555 verwendet. Es war zusätzlich GFP-markiert, so dass die Anbindung im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden konnte. Es wurde beobachtet, dass das Rattenkinesin eine starke Physisorptionstendenz zeigt, was eine orientierte Anbindung erschwert. Daher wurden zunächst Experimente ohne Beladung des Chelators mit Ni^{2+} in Puffern mit unterschiedlicher Salzkonzentration durchgeführt und die Stärke der Physisorption unter den jeweiligen Bedingungen überprüft. Abbildung 5.11 zeigt im linken Teil schematisch den Aufbau dieser Experimente. Es wurden mit Goldpartikeln dekorierte Oberflächen verwendet, deren freie Bereiche mit PEG2000 passiviert waren. Die Partikel selbst waren NTA-funktionalisiert (Abb. 5.11 Mitte). Um zu überprüfen, ob das Rattenkinesin unspezifisch auf der Oberfläche physisorbiert, wurde es ohne Beladung des NTAs mit Ni^{2+} zugegeben (Abb. 5.11 links) und die Oberfläche im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

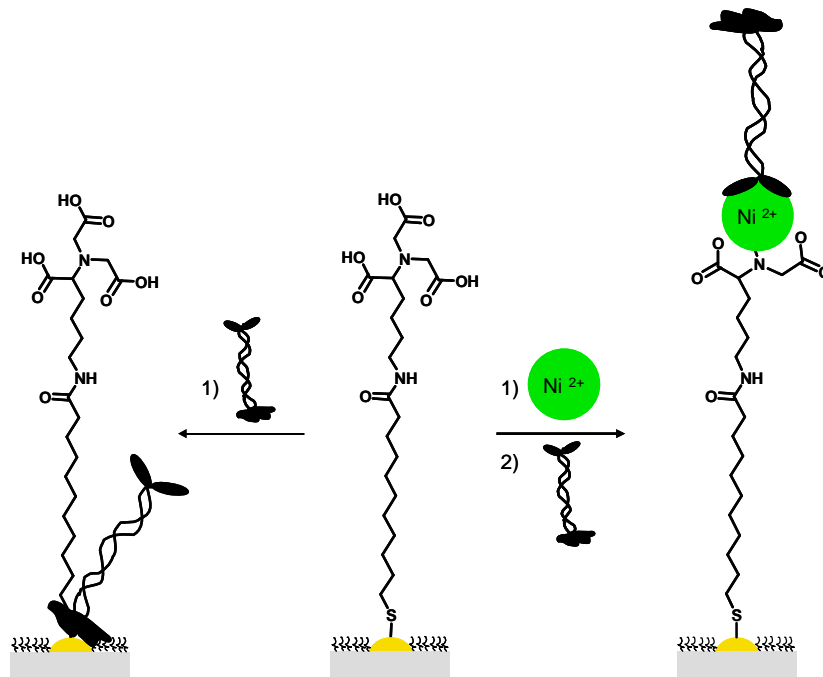


Abb. 5.11: **Schema der Physisorption und orientierten Anbindung der Motorproteine auf NTA-funktionalisierten Oberflächen.** Zur Überprüfung der Stärke der unspezifischen Adsorption des Motorproteins wurde dieses ohne Beladung des NTAs mit Ni^{2+} zugegeben (links). Die orientierte Anbindung erfolgte durch Beladung des Chelators mit Ni^{2+} gefolgt vom Motorprotein (rechts).

Abbildung 5.12 zeigt die Ergebnisse der Physisorptionsexperimente. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen den Bereich der Dippkante, d. h. des Übergangs zwischen mit Goldpartikeln strukturiertem Bereich im oberen Teil und unstrukturiertem Bereich im unteren Teil der Aufnahme.

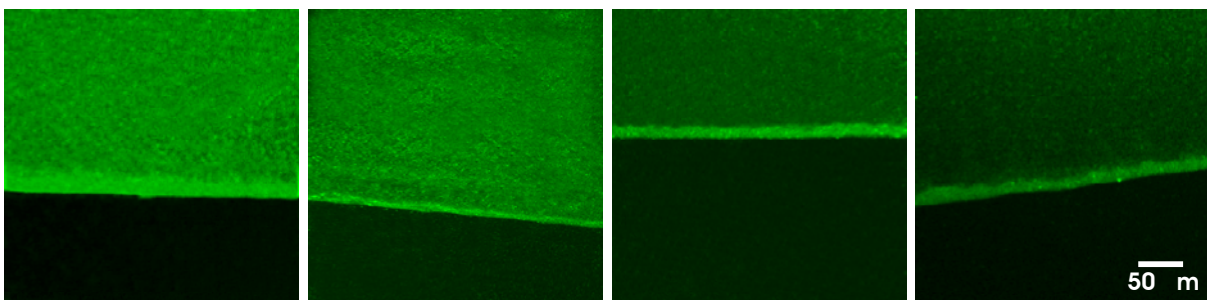


Abb. 5.12: **Physisorption des Rattenkinesins rk555 bei verschiedenen Salzkonzentrationen.** Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen von links nach rechts Physisorption in 0,5 x PBS, 1 x PBS, PBS mit zusätzlich 100 mM NaCl und PBS mit zusätzlich 200 mM NaCl.

Die Salzkonzentration der verwendeten Puffer steigt von links nach rechts an. Es wurden 0,5-faches PBS, PBS, PBS mit zusätzlichen 100 mM NaCl und PBS mit zusätzlichen 200 mM NaCl als Puffer verwendet. Auf allen vier Bildern ist die Fluoreszenz der GFP-Markierung sichtbar.

Eine Erhöhung der Salzkonzentration verminderte die Physisorption des Kinesins zwar, konnte sie jedoch nicht verhindern.

Bei Verwendung der NTA-funktionalisierten Oberflächen zur orientierten Anbindung des Rattenkinesins wurde der Chelator zunächst, wie in Abbildung 5.11 rechts schematisch gezeigt, mit Ni^{2+} beladen. Nach Chelatisierung der Nickelionen wurde das GFP-markierte Rattenkinesin zugegeben. Hierzu wurde PBS mit zusätzlichen 200 mM NaCl als Puffer verwendet, da in diesem Puffer die geringste Physisorption auftrat. Zur Kontrolle der spezifischen Anbindung wurde das Experiment ohne Ni^{2+} durchgeführt. Abbildung 5.13 zeigt die den direkten Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit (links) und ohne Ni^{2+} (rechts). Es ist deutlich zu erkennen, dass der Hauptteil der Anbindung über den Chelator erfolgt ist. Auf der Kontrolloberfläche ohne Nickel war jedoch wie nach den Physisorptionsexperimenten zu erwarten ebenfalls ein deutliches Fluoreszenzsignal detektierbar.

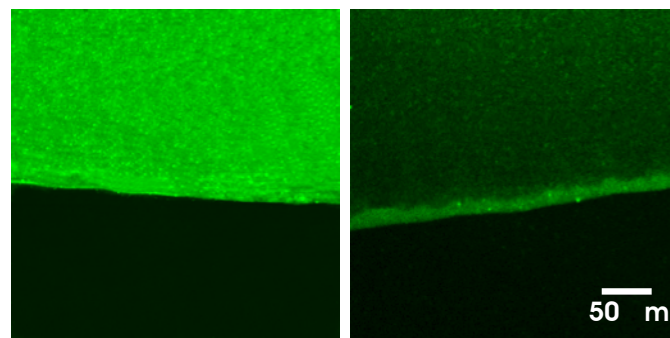


Abb. 5.13: **Orientierte Anbindung des Rattenkinesins rk555.** Das Kinesin wurde über das Ni^{2+} -beladene NTA orientiert angebunden (links). Die Kontrolle ohne Ni^{2+} (rechts) zeigt den Anteil der unspezifischen Adsorption.

Aufgrund der Tendenz des Rattenkinesins unspezifisch zu physisorbieren wurde ein weiteres Motorprotein, das Drosophilakinesin dkin401 verwendet. Dieses war wie das Rattenkinesin GFP-markiert. Auch hier wurde zunächst die Stärke der Physisorption in Puffern mit verschiedenen Salzkonzentrationen untersucht. Abbildung 5.14 zeigt die Ergebnisse der Physisorptionsexperimente. Die Salzkonzentration der verwendeten Puffer steigt auch hier von links nach rechts an. Es wurden 0,5-faches PBS, PBS, PBS mit zusätzlichen 100 mM NaCl und PBS mit zusätzlichen 200 mM NaCl als Puffer verwendet. Die detektierte Fluoreszenz war im Vergleich zum Rattenkinesins deutlich schwächer und war im Fall der Verwendung von PBS mit zusätzlichen 200 mM NaCl nur noch an der Dippkante detektierbar. Somit ist die orientierte Anbindung über das NTA bei Verwendung des Drosophilakinesins deutlich einfacher sicherzustellen.

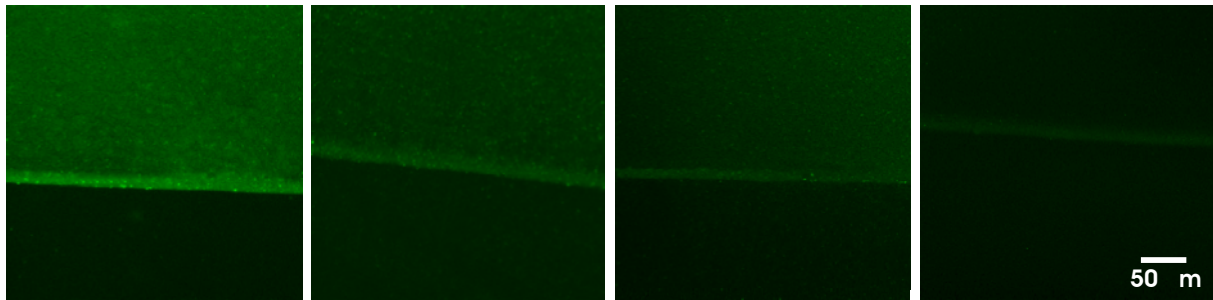


Abb. 5.14: **Physisorption des Drosophilakinesins dkin401 bei verschiedenen Salzkonzentrationen.** Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen von links nach rechts Physisorption in 0,5 x PBS, 1 x PBS, PBS mit zusätzlich 100 mM NaCl und PBS mit zusätzlich 200 mM NaCl.

Im Anschluss wurde die orientierte Anbindung des Drosophilakinesins über das mit Ni^{2+} beladene NTA durchgeführt. Nach Chelatisierung der Nickelionen wurde das GFP-markierte Drosophilakinesin zugegeben. Hierzu wurde wie beim Rattenkinesin PBS mit zusätzlichen 200 mM NaCl als Puffer verwendet. Als Kontrolle wurde das Experiment ohne Ni^{2+} durchgeführt. Abbildung 5.15 zeigt die den direkten Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen mit (links) und ohne Ni^{2+} (rechts). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anbindung über den Chelator erfolgt, da auf der Kontrolloberfläche ohne Nickel nahezu kein Fluoreszenzsignal detektierbar ist.

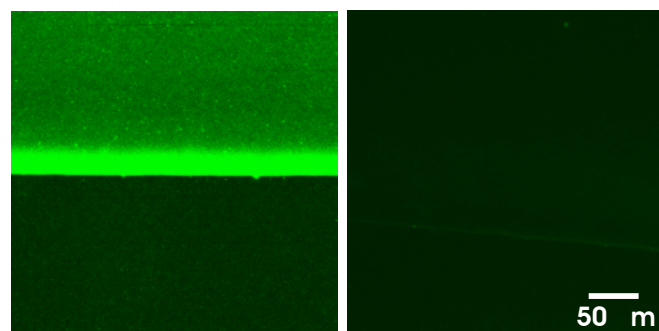


Abb. 5.15: **Orientierte Anbindung des Drosophilakinesins dkin401.** Das Kinesin wurde über das Ni^{2+} -beladene NTA orientiert angebunden (links). Die Kontrolle ohne Ni^{2+} (rechts) zeigt nahezu keine unspezifische Adsorption.

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse wurde für die weiteren Experimente zur Mikrotubuli-anbindung und Verwendung in Gleitexperimenten sowie zum Nachweis der Funktionalität der Motorproteine (siehe Kapitel 6) ausschließlich das Drosophilakinesin dkin401 verwendet. So wurde eine orientierte Anbindung sichergestellt und eine Deaktivierung des Motorproteins durch Denaturierung oder Blockade der Motordomänen verhindert.

5.2.2 Biotin und Streptavidin

Die Wechselwirkung des tetrameren Proteins Streptavidin mit dem organischen Molekül Biotin ist aufgrund ihrer annähernden Irreversibilität und hohen Spezifität das am häufigsten eingesetzte binäre Affinitätssystem zur Proteinanbindung auf Oberflächen [187]. Die mittels rasterkraftmikroskopischer Messungen bestimmte Bindungsstärke liegt im Bereich einiger hundert Piconewton. Sie ist somit die Stärkste aller nicht-kovalenten Wechselwirkungen [196, 202, 203].

Streptavidin besteht aus vier identischen Untereinheiten, wobei jede der vier Einheiten in der Lage ist ein Biotinmolekül zu binden. In Abwesenheit des Biotins ist die Bindungsdomäne des Streptavidins mit fünf Wassermolekülen besetzt, die in Anwesenheit des Biotins durch dieses ersetzt werden [204]. Streptavidin hat eine Masse von 60 kDa und verhindert die direkte Wechselwirkung des anzubindenden Proteins mit der Oberfläche. Somit wird eine Deaktivierung durch Denaturierung in der Regel vermieden. Das im Vergleich kleine Biotin hat nur eine Masse von 244 Da, so dass sich die Biotinylierung gar nicht bis minimal auf die biochemischen und physikochemischen Eigenschaften des Proteins auswirkt. Aufgrund dieser Eigenschaften der Bindungspartner in Verbindung mit der hohen Bindungsstärke wird das System standardmäßig zur Immobilisierung von Proteinen verwendet [187].

Hierzu muss das zu immobilisierende Protein jedoch zunächst biotinyliert werden. Im Vergleich zu NTA-His-Methode besteht der Nachteil, dass die Biotinylierung in der Regel nicht an einer definierten Aminosäure erfolgt und daher im Vergleich zur rekombinanten Einführung kurzer Peptidsequenzen deutlich weniger spezifisch ist. Zur orientierten Anbindung ist die Methode somit nicht optimal geeignet [205].

Im Rahmen der Arbeit wurde Biotin in Form des in Abbildung 5.16 gezeigten, kommerziell erhältlichen Biotinthiols an die mittels BCML erzeugten Goldpartikel angebunden und zur Immobilisierung von Streptavidin genutzt. Das Streptavidin kann dann im Folgenden zur orientierten Anbindung eines ebenfalls biotinylierten Proteins an die Oberfläche dienen.

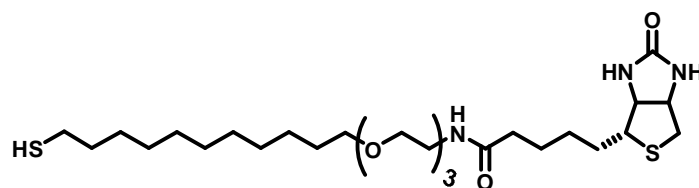


Abb. 5.16: **Biotinthiol**. Das kommerziell erhältliche Biotinthiol wurde zur Immobilisierung von Streptavidin kovalent an Goldpartikel angebunden.

Die Anbindung des Biotins an Gold wurde im Röntgenphotoelektronenspektroskop auf homogenen Oberflächen untersucht. Abbildung 5.17 zeigt typische C1s-, N1s-, Au4p_{3/2}-, O1s- und S2p-Detailspektren des angebundenen Biotins. Es waren deutliche Signale dieser im Molekül vorhandenen Atome nachweisbar. Das C1s Signal weist aufgrund der unterschiedlichen chemischen Umgebung der Kohlenstoffe im Molekül zwei Schultern bei 286,7 eV und 289,0 eV auf. Die Stickstoffe befinden sich in gleicher bis sehr ähnlicher Umgebung, so dass das N1s Signal bei 399,9 eV nicht aufgespalten ist. Das Schwefel S2p-Signal sollte in ein Dublett aus S2p_{3/2} und S2p_{1/2} mit einem Intensitätsverhältnis 2:1 aufspalten. Dies ist aber aufgrund der geringen Intensität des Signals nicht auflösbar.

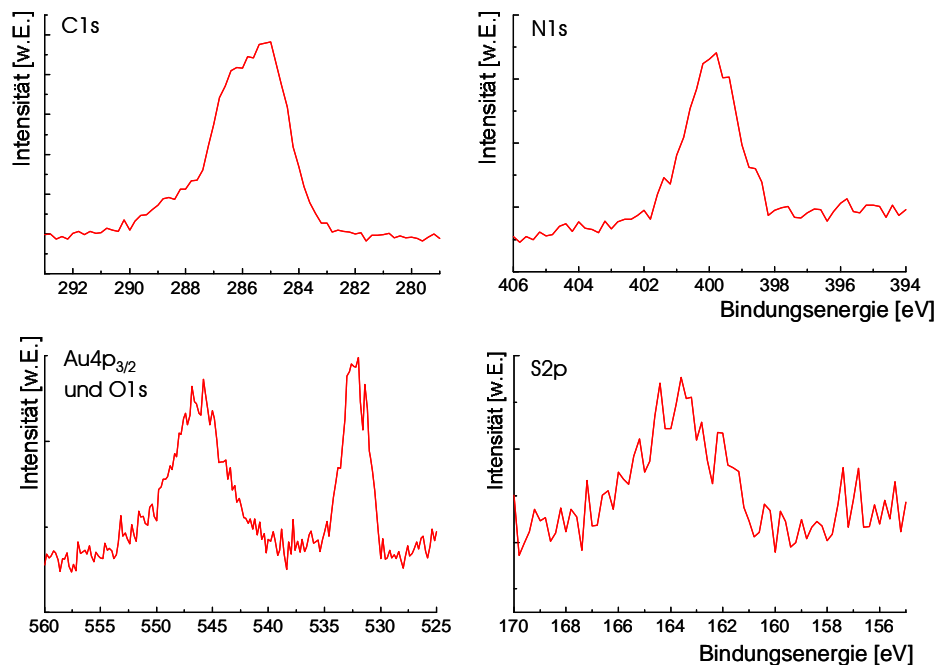


Abb. 5.17: **XP-Detailspektren der Biotin-funktionalisierten Oberfläche.** Ein deutliches Kohlenstoff-Stickstoff-, Sauerstoff- und Schwefelsignal sind erkennbar. Die Asymmetrie des Kohlenstoffsignals beruht auf der unterschiedlichen chemischen Umgebung der Kohlenstoffe im Molekül.

Durch Auswertung der Intensitätsverhältnisse der Signale der Elemente zueinander konnte die Elementzusammensetzung der Oberfläche quantitativ bestimmt werden. Hierzu wurde Gleichung 5.1 (siehe unten) verwendet, die die Abschwächungslängen und Wirkungsquerschnitte der verschiedenen Atome berücksichtigt. Tabelle 5.2 fasst die theoretischen sowie die mittels dieser Methode ermittelten Signalverhältnisse zusammen. Im Rahmen der Genauigkeit der Messmethode stimmen die jeweiligen Werte miteinander überein auch wenn Abweichungen von bis zu 12% auftreten.

Tab. 5.2: **Elementzusammensetzung der Biotinoberfläche.**

Signale	theoretisches Signalverhältnis	ermitteltes Signalverhältnis
C1s : N1s	9 : 1	8,1 : 1
C1s : O1s	5,4 : 1	4,8 : 1
C1s : S2p	13,5 : 1	15,3 : 1

Des Weiteren belegt die Auswertung der Signalverhältnisse der Kohlenstoffe in unterschiedlicher chemischer Umgebung, dass es sich bei dem auf der Oberfläche angeordneten Molekül um das Biotinthiol handelt. Abbildung 5.18 zeigt die einzelnen Signale der Kohlenstoffe. Das Signal ist in Einzelsignale bei 288,8 eV, 286,7 eV und 284,8 eV in einem Verhältnis von 1:4,7:6,8 aufgespalten. Diese konnten den Carbonylkohlenstoffen, den Kohlenstoffen neben Carbonylkohlenstoffen sowie Sauerstoff- und Stickstoffatomen und den Alkylkohlenstoffen, die in einem theoretischen Verhältnis von 1:5:7,5 stehen, zugeordnet werden. Dies ist ein weiterer Beleg für die Anbindung des Biotins auf der Goldoberfläche.

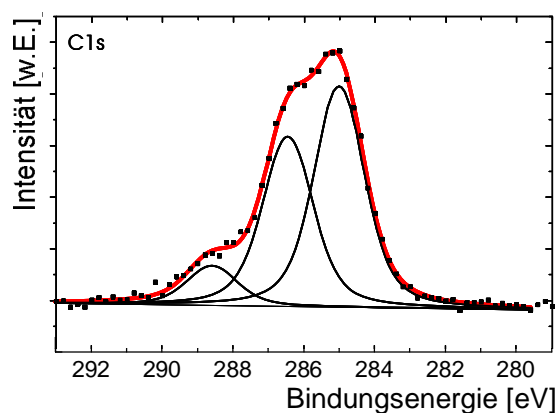


Abb. 5.18: **C1s XP-Detailspektrum des angebundenen Biotins.** Das Verhältnis der Kohlenstoffe in unterschiedlicher chemischer Umgebung zueinander beträgt 1:4,7:6,8.

Die Biotinylierung der mit Goldpartikeln dekorierten Oberflächen wurde analog zur Biotinylierung der homogenen Oberflächen durchgeführt. Im nächsten Schritt dienen diese Oberflächen zur Anbindung fluoreszenzmarkierten Streptavidins. Die Ergebnisse werden in Kapitel 8 in Zusammenhang mit ihrer Funktion zur Herstellung eines Templates zur polaritätsorientierten Anbindung und Polymerisation von Mikrotubuli gezeigt und diskutiert.

5.2.3 Coenzym A und Phosphopantetheinyltransferase

Ein Alternativkonzept zur Anbindung über NTA und Nickel(II) sowie Biotin und Streptavidin ist die kovalente Anbindung von Proteinen unter Ausnutzung der enzymatischen Aktivität einer Phosphopantetheinyltransferase (PPTase). Dieser Ansatz kombiniert gerichtete Anbindung mit einer hohen Bindungsstärke. Die PPTase Sfp überträgt bei dieser Form der Immobilisierung die Phosphopantetheinylgruppe des Coenzym A (CoA) auf einen spezifischen Serinrest innerhalb eines Proteins [206].

Hierzu müssen die anzubindenden Proteine wie im Fall des NTA-Nickel Systems mit einer Erkennungssequenz, die diesen Serinrest enthält, funktionalisiert werden. Yin *et al.* gelang es die aus 11 Aminosäuren bestehende ybbR-Sequenz zu ermitteln, die die Erkennung der Proteine ermöglicht [207]. Sie ist wie die Histidinsequenz klein genug, um eine Veränderung der Proteinstruktur nahezu auszuschließen. Proteine, die diese Sequenz enthalten, können, wie in Abbildung 5.19 dargestellt, mittels der PPTase Sfp an modifiziertes CoA (CoA-R) gebunden werden.

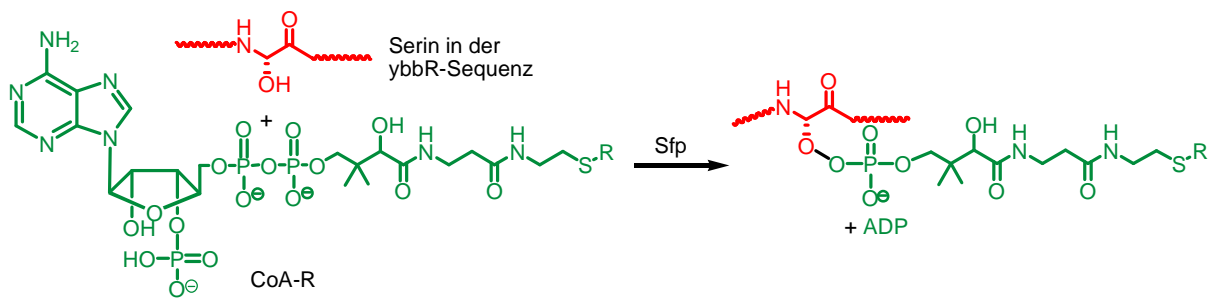


Abb. 5.19: **Gerichtete Anbindung mittels einer PPTase.** Die PPTase Sfp katalysiert die Übertragung der Phosphopantetheinylgruppe des Coenzym A auf ein spezifisches Serin der ybbR-Sequenz [207].

Dieser Mechanismus kann genutzt werden, um Proteine mit an CoA gebundenen Substanzen zu markieren. Wird zum Beispiel Biotin-CoA verwendet, wird ein an einer spezifischen Stelle des Proteins biotinyliertes Protein erhalten, das im Anschluss an Oberflächen angebinden werden kann [208]. Auch die Anbindung von Proteinen an Tabakmosaikviren ist möglich. Sie wurde beispielhaft anhand der Markierung der Viren mit Luciferase durchgeführt [209].

Das System ermöglicht des Weiteren die gerichtete Anbindung von Proteinen auf Oberflächen. Wong *et al.* konnten auf diesem Weg Luciferase auf Hydrogeloberflächen anbinden. Hierzu wurde das Hydrogel Maleimid-funktionalisiert und CoA über seine Thiolgruppe daran gekoppelt. Nach Übertragung der Phosphopantetheinylgruppe des angebundenen CoA auf die ybbR-Sequenz im anzubindenden Protein, ist dieses kovalent auf der Oberfläche immobilisiert [210].

Diese kovalente Immobilisierungsstrategie wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Verwendung auf mit Goldpartikeln dekorierten Oberflächen weiterentwickelt. Hierzu wurde mit einer N-terminalen ybbR-Sequenz funktionalisierte Leuchtkäfer-Luciferase mit Hilfe der Phosphopantetheinyltransferase Sfp an auf Goldoberflächen immobilisiertes CoA gekoppelt. Abbildung 5.20 zeigt den zweistufigen Prozess schematisch. CoA wird über seine Thiolgruppe auf den Goldpartikeln immobilisiert. Im Anschluss wird dann die Phosphopantetheinylgruppe durch die Sfp auf die ybbR-Sequenz der Luciferase übertragen und diese somit gerichtet auf der Oberfläche angebunden.

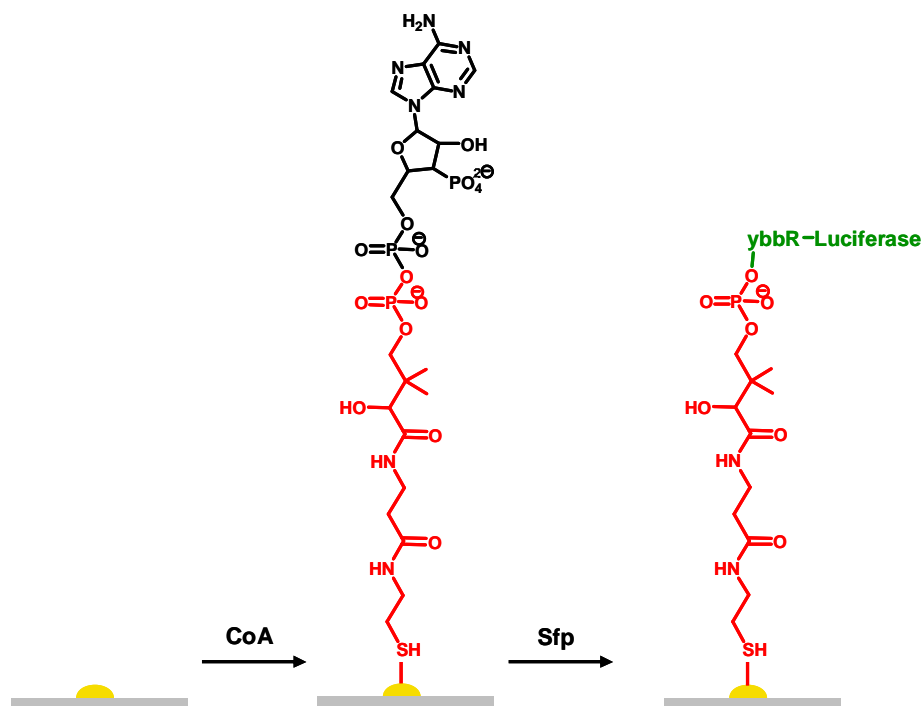


Abb. 5.20: **Schema der kovalenten Luciferaseanbindung an einen Goldpartikel.** Nach Anbindung des CoA über seine Thiolgruppe wird die Phosphopantetheinylgruppe durch die Sfp auf die ybbR-Sequenz der Luciferase übertragen.

Die Anbindung des Coenzym A auf der Goldoberfläche wurde zunächst mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie überprüft. Abbildung 5.21 zeigt typische C1s-, N1s-, Au4p_{3/2}-, O1s- und S2p-Detailspektren des angebundenen CoA. Es waren deutliche Signale dieser im Molekül vorhandenen Atome nachweisbar. Das C1s Signal ist aufgrund der unterschiedlichen chemischen Umgebung der Kohlenstoffe im Molekül und der Überlagerung ihrer Signale recht breit. Die Stickstoffe befinden sich in sehr ähnlicher Umgebung, so dass das N1s Signal bei 400 eV nicht aufgespalten ist. Das Schwefel S2p-Signal sollte in ein Dublett aus S2p_{3/2} und S2p_{1/2} mit einem Intensitätsverhältnis 2:1 aufspalten. Dieses ist aber aufgrund der geringen Intensität des Signals nicht auflösbar.

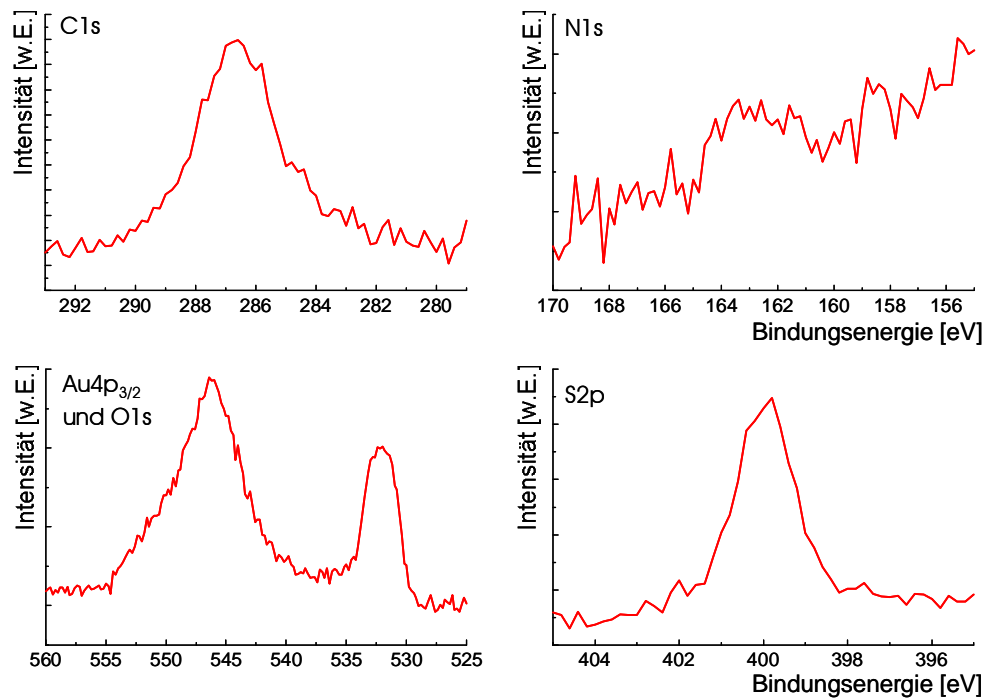


Abb. 5.21: **XP-Detaillspektren des angebondenen CoA.** Ein deutliches Kohlenstoff- Stickstoff-, Sauerstoff- und Schwefelsignal sind erkennbar.

Durch Auswertung der Intensitätsverhältnisse der Signale der Elemente zueinander konnte die Elementzusammensetzung der Oberfläche quantitativ bestimmt werden. Hierzu wurde Gleichung 5.1 (siehe unten) verwendet, die die Abschwächungslängen und Wirkungsquerschnitte der verschiedenen Atome berücksichtigt. Tabelle 5.3 fasst die theoretischen sowie die mittels dieser Methode ermittelten Signalverhältnisse zusammen. Im Rahmen der Genauigkeit der Methode stimmen die Werte miteinander überein auch wenn sich vor allem beim Verhältnis des Kohlenstoffs zum Schwefel eine deutliche Abweichung zeigt. Dies ist jedoch aufgrund der Lage des Schwefels im Molekül zu erwarten.

Tab. 5.3: **Elementzusammensetzung der CoA-Oberfläche.**

Signale	theoretisches Signalverhältnis	ermitteltes Signalverhältnis
C1s : N1s	3,14 : 1	2,9 : 1
C1s : O1s	2,2 : 1	2 : 1
C1s : S2p	22 : 1	25,2 : 1

Des Weiteren belegt die Auswertung der Signalverhältnisse der Kohlenstoffe in unterschiedlicher chemischer Umgebung, dass es sich bei dem auf der Oberfläche angebondenen

Molekül um CoA handelt. Abbildung 5.22 zeigt die einzelnen Signale der Kohlenstoffe. Das Signal ist in Einzelsignale bei 288,5 eV, 287,1 eV und 284,8 eV in einem Verhältnis von 1:4,7:6,8 aufgespalten. Diese konnten den Carbonylkohlenstoffen, den Kohlenstoffen neben Carbonylkohlenstoffen sowie Sauerstoffen und Stickstoffen und den aliphatischen Kohlenstoffen, die in einem theoretischen Verhältnis von 1:5:7,5 stehen zugeordnet werden.

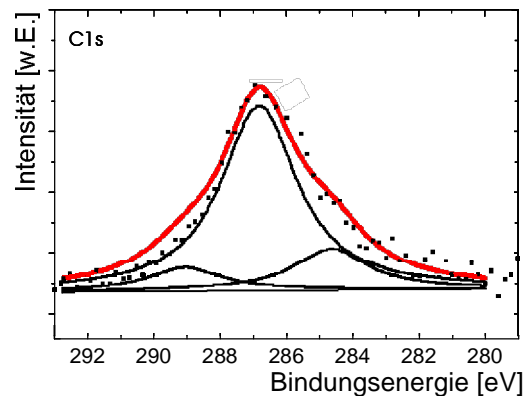


Abb. 5.22: **C1s XP-Detailspektrum des angebondenen CoA.** Das Verhältnis der Kohlenstoffe in unterschiedlicher chemischer Umgebung entspricht dem theoretischen Verhältnis.

Neben dem Nachweis mittels XPS wurde zudem die Schwingquarzmikrowaage (QCM) verwendet um die Anbindung des CoA zu überprüfen. Der Vorteil der Methode ist, dass die Anbindung in Echtzeit durch Beobachtung der Frequenzänderung verfolgt und auch die nachfolgende Übertragung der Phosphopantetheinylgruppe des CoA auf ybbR-Luciferase durch die PPTase Sfp untersucht werden kann. Abbildung 5.23 zeigt beispielhafte QCM-Messungen auf Gold-beschichteten Sensorkristallen. Beide Kurven zeigen den siebten Oberton der Schwingung des Sensorkristalls.

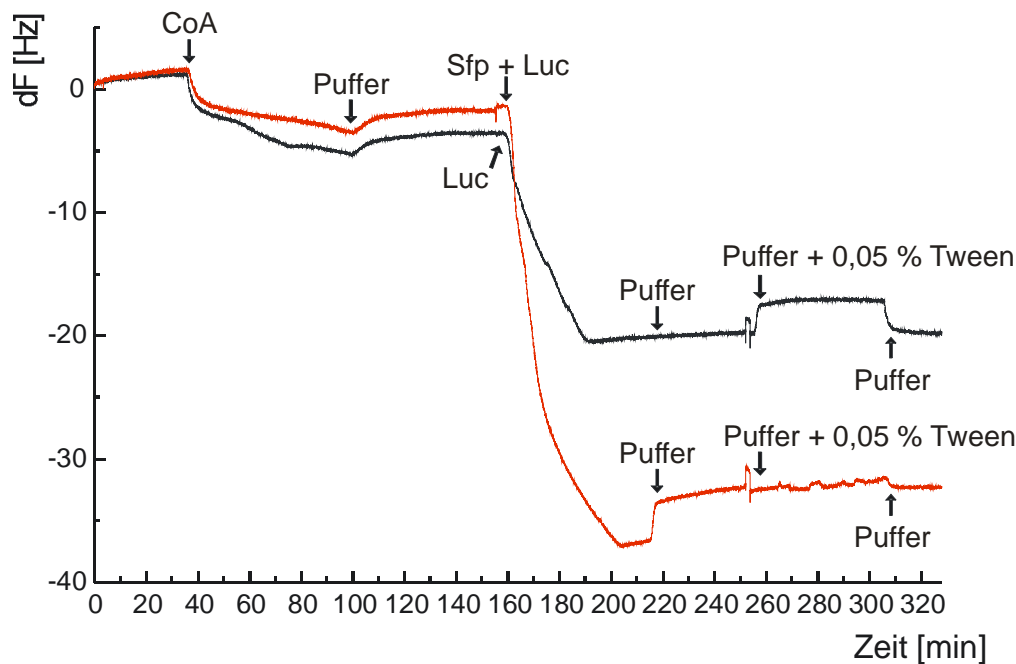


Abb. 5.23: **QCM-Messungen der Anbindung von CoA und ybbR-Luciferase auf Gold.** Nach Anbindung des CoA führt die Anbindung der ybbR-Luciferase durch die PPTase Sfp (rot) zu einer deutlich stärkeren Frequenzerniedrigung als die Physisorption ohne Sfp (schwarz).

Nach Zugabe von in HEPES-Puffer gelöstem CoA und nachfolgendem Spülen mit diesem Puffer konnte eine Frequenzerniedrigung um 2,5 Hz beobachtet werden. Die hieraus mittels der Sauerbrey-Gleichung (Gleichung 3.2) und Verwendung der für die verwendeten 5 MHz Kristalle geltenden Konstante $C = 17,7 \text{ ng Hz}^{-1}$ und der Obertonzahl 7 ermittelte Masse beträgt 6 ng. Nach Zugabe der PPTase Sfp und ybbR-Luciferase (rote Kurve) bzw. nur ybbR-Luciferase auf der Kontrolloberfläche (schwarze Kurve) war in beiden Fällen eine Frequenzerniedrigung zu beobachten. Diese betrug jedoch auf der Kontrolloberfläche nur 13,5 Hz, während die Anbindung mittels Sfp zu einer Frequenzerniedrigung um 30 Hz führte. Somit wurden in Anwesenheit der PPTase Sfp 76 ng Luciferase angebinden, während auf der Kontrolloberfläche nur 34 ng abgeschieden wurden. Diese Werte wurden ebenfalls mittels der Sauerbrey-Gleichung ermittelt. Die Ergebnisse zeigen, dass unter den gewählten Bedingungen mehr als die Hälfte der abgeschiedenen Luciferase gerichtet durch die PPTase Sfp über ihre ybbR-Sequenz angebinden wurde. Zusätzlich kam es jedoch auch zur ungerichteten Physisorption auf der Goldoberfläche. Dies zeigt, dass die kovalente Anbindung unter Ausnutzung der Phosphopantetheinyltransferase Sfp gelingt, die Physisorption aber durch Verwendung anderer Puffer oder den Einsatz von Detergenzien minimiert werden muss. Da die kovalente Anbindung im Gegensatz zur Anbindung über NTA oder Biotin deutlich stabiler ist, ist sie viel versprechend für die Verwendung in Langzeitexperimenten.

5.3 Material und Methoden

Alle für Synthese und Funktionalisierung verwendeten Lösungsmittel wurden über 3 Å Molekularsieb (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) für mindestens 24 h unter Stickstoffatmosphäre getrocknet. Aceton (zur Analyse) wurde von der Firma AppliChem (Darmstadt), Cyclohexan (zur Analyse), Dichlormethan (zur Analyse), Dimethylformamid (DMF, zur Analyse), Ethylacetat (zur Analyse), Petrolether (zur Analyse) und Toluol (zur Analyse) von der Firma Merck (Darmstadt) und Methanol (zur Analyse) von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Deionisiertes Wasser wurde mittels eines Millipore-Systems (Millipore, Eschborn) aufgereinigt. Alle weiteren Chemikalien wurden wie erhalten verwendet.

Das verwendete Rattenkinesin wurde freundlicherweise von Dr. Ivo Telley (Arbeitsgruppe Surrey, EMBL Heidelberg), das Drosophilakinesin von Dr. Peter Bieling (Arbeitsgruppe Surrey, EMBL Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen im Fall des aus 555 Aminosäuren bestehenden GFP-markierten Rattenkinesins rk555 $0,55 \text{ mg ml}^{-1}$ sowie im Fall des aus 401 Aminosäuren aufgebauten Drosophilakinesins dk401 $0,59 \text{ mg ml}^{-1}$. Die Konzentrationen der Lösungen wurden mittels eines Coomassie (Bradford) Protein Assay Kits (Thermo Scientific, Rockford, USA) überprüft. Beide Proteine waren mit einer Sequenz aus sechs Histidinen funktionalisiert.

Die verwendete ybbR-Luciferase wie auch die PPTase Sfp wurden von Dr. Fania Geiger (Arbeitsgruppe Spatz, MPI Stuttgart) zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. $0,55 \text{ mg ml}^{-1}$.

$^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren wurden mit einem Bruker AC-300-Spektrometer bei 300 MHz bzw. bei 75 MHz aufgenommen. NMR-Spektren wurden auf das Lösungsmittel normiert [CDCl_3 : $\delta(\text{H}) = 7.24$ und $\delta(\text{C}) = 77.0$] und Signalmultiplizitäten folgendermaßen abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett.

Mikroskopische Untersuchungen wurden mittels des Zeiss Axiovert220M (Carl Zeiss AG, Oberkochen) durchgeführt. Als Objektiv diente ein 40x/1.2 C-Apochromat Wasserimmersionsobjektiv (Carl Zeiss AG, Oberkochen).

Polykristalline Goldoberflächen wurden durch Beschichtung von Deckgläsern (Carl Roth GmbH, Darmstadt) mit einer ungefähr 5 nm dicken Titanschicht sowie einer 50 nm dicken Goldschicht beschichtet. Hierzu wurde der MED020 Sputter Coater (BAL-Tec AG Liechtenstein, jetzt Leica Microsystems, Wetzlar) bei 120 mA und $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar für 30 s bzw. bei 60 mA und $5 \cdot 10^{-2}$ mbar für 60 s verwendet. Die Deckgläser wurden zuvor mittels Behandlung im Ultraschall für zweimal für 5 min in Methanol : Ethylacetat = 1:1 gefolgt vom Abspülen der Oberflächen mit Methanol und Trocknung im Stickstoffstrom gereinigt.

Mittels BCML mit Goldpartikeln dekorierte Glas- oder Siliziumoberflächen wurden vor ihrer Passivierung oder Funktionalisierung für 10 min in einem isotropen Mikrowellenplasmagerät (PVA TePla AG, Wetzlar) aktiviert. Hierfür wurden sowohl das TePla100-E bei einem Wasserstoffdruck von 0,4 mbar und einer Leistung von 150 W als auch das TePla PS210 System bei einem Wasserstoffdruck von 0,3 mbar und einer Leistung von 600 W verwendet.

5.3.1 Synthese des *N*-3-Triethoxysilylpropyl-*N'*- ω -methoxy-polyethylenglykol-2000-harnstoffs (PEG2000)

Eine Lösung von 1 g ω -Aminopolyethylenglykolmonomethylether mit einem Molekulargewicht von 2000 g mol⁻¹ (Rapp Polymere, Tübingen) in 10 ml trockenem Dimethylformamid wurde unter Stickstoffatmosphäre mit 1 Äquivalent 3-Isocyanatopropyltriethoxysilan (Fluka, Neu-Ulm) versetzt und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Rohprodukt wurde durch Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und Trocknung im Feinvakuum erhalten. Zur Aufreinigung wurde es in trockenem Toluol gelöst und mit der doppelten Menge trockenem Cyclohexan überschichtet. Der nach 24 h erhaltene Niederschlag wurde mit kaltem, trockenem Cyclohexan gewaschen und im Feinvakuum getrocknet. *N*-3-Triethoxysilylpropyl-*N'*- ω -methoxypolyethylenglykol-2000-harnstoff wurde in Form eines weißen Pulvers (87%) erhalten und unter Argonatmosphäre gelagert. In dieser Arbeit wird die Verbindung als PEG2000 abgekürzt.

¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃):

δ = 0.58 (m, 2H, Si-CH₂), 1.20 (t, 3J = 6.9 Hz, 9H, O-CH₂-CH₃), 1.55 (m, 2H, Si-CH₂-CH₂), 3.12 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂-CH₂), 3.30 (s, 3H, O-CH₃), 3.39 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-O), 3.50 (m, 2H, N-CH₂-CH₂-O), 3.55-3.70 (s, 172H, O-CH₂-CH₂-O), 3.77 (m, 6H, Si-O-CH₂-CH₃), 5.11 (s, 2H, NH).

¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃):

δ = 7.4 (Si-CH₂), 18.3 (Si-O-CH₂-CH₃), 24.3 (Si-CH₂-CH₂), 41.1 (NH-CH₂-CH₂-O), 43.1 (CH₂-CH₂-CH₂-NH), 58.2 (Si-O-CH₂-CH₃), 59.0 (O-CH₃), 70.1 (CO-NH-CH₂-CH₂), 70.0-72.1 (O-CH₂-CH₂-O), 158.5 (C=O).

5.3.2 Passivierung von Glas und Siliziumoberflächen mittels PEG2000

Die nach der Aktivierung im Plasmagerät (TePla100-E bei 0,4 mbar H₂ und 150 W oder TePla PS210 System bei 0,3 mbar H₂ und 600 W) hydrophilen Substrate wurden über Nacht unter Stickstoffatmosphäre in einem 50 ml Schlenk-Kolben in einer 0,25 mM Lösung des PEG2000 in trockenem Toluol und Gegenwart von 2,5 μ M Triethylamin (Fluka, Neu-Ulm) bei 80°C inkubiert. Anschließend wurde sie mit Ethylacetat gespült, 5 min im Ultraschall behandelt,

wiederum mit Ethylacetat und darauf mit Methanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Oberflächen wurden sofort weiterverwendet oder für maximal 24 h unter Argonatmosphäre aufbewahrt.

5.3.3 Synthese des Aktivesters

1 g 11-Mercaptoundecansäure (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) wurde in 40 ml Dichlormethan gelöst. Eine Lösung von 500 mg *N*-Hydroxysuccinimid (Fluka, Neu-Ulm) und 30 mg 4-(Dimethylamino)-pyridin (Fluka, Neu-Ulm) in 10 ml Aceton wurde bei Raumtemperatur zur gelösten 11-Mercaptoundecansäure zugetropft. Die Reaktion wurde auf 0°C gekühlt und eine Lösung von 1,1 g 1,3-Dicyclohexylcarbodiimid (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) in 10 ml Dichlormethan zugetropft. Es wurde 1 h unter Stickstoff gerührt und dann auf Raumtemperatur aufwärmen lassen. Nach Rühren über Nacht wurde der in Form eines weißen Feststoffs ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der erhaltene gelbliche Feststoff säulenchromatographisch (Petrol-ether : Ethylacetat = 50:50, $R_f = 0,55$) aufgereinigt. Der Aktivester wurde als weißes Pulver mit einer Ausbeute von 72% erhalten und unter Argonatmosphäre gelagert.

¹H-NMR (300 MHz; CDCl₃):

$\delta = 1,17-1,41$ (m, 12H, H₄-H₉), $1,52-1,74$ (m, 4H, H₃+H₁₀), $2,52$ (pseudo dt, 2H, H₁₁), $2,63$ (t, 2H, $J = 7,3$ Hz, H₂), $2,87$ (s, 4H, H₁₂).

¹³C-NMR (75 MHz; CDCl₃):

$\delta = 24,3$ (C13), $24,5$ (C1), $24,9$ (C9), $28,3$ (C3), $29,0$ (C4), $29,1$ (C8), $29,4$ (C7), $29,7$ (C5+C6), $31,1$ (C10), $32,9$ (C2), $167,5$ (C11), $169,3$ (C12).

5.3.4 Chemisorption des Aktivesters auf polykristallinem Gold und Umsetzung zum NTA

Polykristalline Goldoberflächen wurden nach ihrer Herstellung unter Stickstoffatmosphäre für 1 h in einer 1 mM Lösung des Aktivesters in DMF bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit DMF gespült, 2 min im Ultraschall behandelt, wiederum mit DMF und darauf mit Methanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die getrockneten Oberflächen wurden unter Stickstoffatmosphäre für 5 h in einer 0,2 mM Lösung des *N*_α*N*_α-Bis(carboxymethyl)-*L*-Lysin (Fluka, Neu-Ulm) in DMF und Gegenwart von 2,5 μM Triethylamin (Fluka, Neu-Ulm) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden sie mit DMF gespült, 5 min im Ultraschall behandelt und 3 mal 30 min in DMF gewaschen. Nach Spülen der Oberflächen mit DMF gefolgt von Methanol wurden sie im Stickstoffstrom getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte unter Argonatmosphäre.

5.3.5 Chemisorption des Biotinthiols auf polykristallinem Gold

Polykristalline Goldoberflächen wurden nach ihrer Herstellung für 1 h in einer 1 mM Lösung des Biotinthiols (ProChimia, Polen) in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS gespült, 5 min im Ultraschall behandelt, wiederum mit PBS, gefolgt von deionisiertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte unter Argonatmosphäre.

5.3.6 Chemisorption des CoA auf polykristallinem Gold

Polykristalline Goldoberflächen wurden nach ihrer Herstellung für 1 h in einer 1,3 mM Lösung des CoA in 50 mM HEPES plus 10 mM $MgCl_2$ bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit 50 mM HEPES plus 10 mM $MgCl_2$ gespült, 5 min im Ultraschall behandelt, wiederum mit 50 mM HEPES plus 10 mM $MgCl_2$ gefolgt von deionisiertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte unter Argonatmosphäre.

5.3.7 Aufnahme der Röntgenphotoelektronenspektren

XP-Spektren wurden an einem MAX-200-Spektrometer der Firma Leybold-Heraeus aufgenommen. Als nicht-monochromatisierte Röntgenquelle diente eine Aluminiumanode mit einer Energie der $K_{\alpha 1,2}$ -Linie von 1486.6 eV. Zur Detektion der Elektronen wurde ein Energieanalysator EA 200 verwendet, die Linienbreite betrug 0.9 eV.

Durch Aufnahme eines Übersichtsspektrums zu Beginn der Messung konnten sowohl die Position der einzelnen Signale als auch durch etwaige Verunreinigungen bedingte zusätzliche Signale festgestellt werden. Im Anschluss wurden von jeder Atomspezies Detailspektren zur genaueren Quantifizierung aufgenommen. Die Detektionswahrscheinlichkeit, die vom Wirkungsquerschnitt des Elements sowie von dessen Position im Probenmaterial abhängt, bestimmt die Messdauer im entsprechenden Energiefenster.

Tab. 5.4: Zur Aufnahme von XP-Spektren verwendete Messparameter

Orbital	Startenergie [eV]	Endenergie [eV]	Schrittweite [meV]	Verweilzeit [ms]	Passenergie [eV]	Anzahl Scans
Übersicht	1000	-5	400	10	96	5
Au4p3/2, O1s	560	525	200	40	48	10
N1s	410	390	200	250	48	15
C1s	295	275	200	20	48	10

S2p	175	150	200	250	48	15
Si2p	110	85	200	40	48	10
Au4f	100	70	200	10	48	10

5.3.8 Auswertung der Röntgenphotoelektronenspektren

Neben der qualitativen Analyse, die die Ermittlung der auf der Oberfläche vorhandenen Elemente erlaubt, ist es auch möglich die gemessenen XP-Spektren quantitativ auszuwerten. Für diese Arbeit war vor allem die Auswertung der Intensitätsverhältnisse der Signale verschiedener Elemente von Interesse. Unter Verwendung eines statistischen Modells, das die Molekulanordnung auf Oberflächen beschreibt, ergibt sich für zwei Elemente A und B, die statistisch und homogen auf der Oberfläche verteilt sind Gleichung 5.1 [182].

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{\sigma_B}{\sigma_A} \cdot \frac{\lambda_B}{\lambda_A} \quad (5.1)$$

Hier sind $I_{A/B}$ die Intensitäten der Signale der Elemente A und B sowie $\sigma_{A/B}$ und $\lambda_{A/B}$ ihre elementspezifischen Wirkungsquerschnitte und Abschwächungslängen. Die in dieser Arbeit benötigten Wirkungsquerschnitte und Abschwächungslängen wurden der Literatur entnommen und sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst [211,212]. Die Wirkungsquerschnitte wurden auf $C1s = 1$ normiert.

Tab. 5.5: **Elementspezifische Wirkungsquerschnitte $\sigma_{A/B}$ und Abschwächungslängen $\lambda_{A/B}$ [211,212].**

Orbital	O1s	N1s	C1s	S2p
σ	3,08	1,84	1	1,69
$\lambda[\text{\AA}]$	20,3	21,5	24	29,8

Zur Analyse der XP-Signale musste zunächst eine Kalibrierung gefolgt von einer Signalanpassung durchgeführt werden. Meist war auch eine Korrektur des Untergrundes notwendig. Die Darstellung der Spektren sowie die Signalanpassung wurden mit dem Programmpaket Origin 3.78 und dem darin enthaltenen Unterprogramm Peak Fitting Module (Microcal, Northampton, USA) durchgeführt.

Die gezeigten Messungen auf homogenen Goldoberflächen wurden bezüglich des $\text{Au}4f_{7/2}$ -Signals auf 84 eV kalibriert. Da der Untergrund aufgrund inelastisch gestreuter Sekundärelektronen für einige Signale deutlich zu höheren Bindungsenergien anstieg, wurde im Anschluss eine Korrektur des Untergrunds der Messsignale durchgeführt. Hierzu wurde eine Untergrundkorrektur nach Shirley durchgeführt [213]. Im Anschluss konnte dann die Signalanpassung zur quantitativen Analyse erfolgen. Hierzu wurden eine oder die Summe mehrerer mathematischer Funktionen an die Spektren angepasst um das Flächenintegral zu ermitteln. Wurden mehrere Kurven verwendet, entsprach die Anzahl der Kurven der Anzahl der verschiedenen chemischen Umgebungen des Elements und die Gesamtintensität ergab sich aus der Summe der Teilintensitäten. Zur Anpassung der Kurven wurden Voigt-Profile mit einem Verhältnis von Gauß- zu Lorentzfunktion von 4:1 verwendet. Das ermittelte Flächenintegral des XP-Signals ermöglichte unter Verwendung von Gleichung 5.1 die Bestimmung seiner Konzentration auf der Oberfläche.

5.3.9 Anbindung des NTAs auf mit Goldpartikeln dekorierten Oberflächen

Nach der Passivierung der Glasbereiche zwischen den Goldpartikeln wurden die Oberflächen unter Stickstoffatmosphäre für 5 h in einer 0,5 mM Lösung des Aktivesters in DMF bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit DMF gespült, 2 min im Ultraschall behandelt, wiederum mit DMF und darauf mit Methanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die getrockneten Oberflächen wurden erneut unter Stickstoffatmosphäre für 5 h in einer 0,2 mM Lösung des $N_{\alpha}N_{\alpha}$ -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) in DMF und Gegenwart von 2,5 μM Triethylamin (Fluka, Neu-Ulm) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden sie mit DMF gespült, 5 min im Ultraschall behandelt und dreimal 30 min in DMF gewaschen. Nach Spülen der Oberflächen mit DMF gefolgt von Methanol wurden sie im Stickstoffstrom getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte unter Argonatmosphäre.

5.3.10 Flusszelle zur Proteinanbindung auf funktionalisierten Goldpartikeln

Alle Proteinanbindungsexperimente wurden in der in Abbildung 5.24 dargestellten Flusszelle durchgeführt. Dies erlaubte neben der Verwendung kleiner Volumina den einfachen Austausch der Lösungen. Die Flusszelle wurde in zwei Schritten hergestellt. Zunächst wurde ein passiviertes Glasdeckglas (Carl Roth GmbH, Darmstadt), das nicht mit Goldpartikeln strukturiert war, mit der passivierten Seite nach oben mit doppelseitigem Klebeband (100 μm Dicke, Tesa SE, Hamburg) auf einem Objektträger fixiert. Im Anschluss wurde die mit Goldpartikeln strukturierte Oberfläche, deren Glasbereiche ebenfalls passiviert und deren Goldpartikel funktionalisiert waren, mit dem gleichen doppelseitigen Klebeband mit der

strukturierten Seite nach unten auf dem passivierten Deckglas befestigt. Das Einspülen der Lösungen erfolgte mittels einer Pipette (Eppendorf AG, Hamburg).

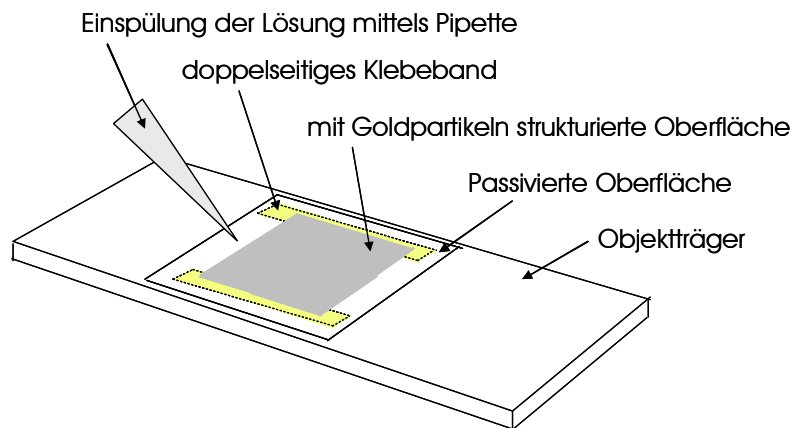


Abb. 5.24: **Flusszelle zur Verwendung in Proteinanbindungsexperimenten.** Die Flusszelle wurde in zwei Schritten durch Fixierung eines passivierten und eines Goldpartikel-dekorierten, passivierten und funktionalisierten Deckglases montiert.

5.3.11 Physisorption der Kinesine rk555 oder dk401 auf NTA-funktionalisierten Goldpartikeln

Es wurden $30\ \mu\text{l}$ des verwendeten Puffers in die Flusszelle gespült, auf 0°C gekühlt und für 10 min equilibriert. Als Puffer wurde in den verschiedenen Experimenten 0,5-fachem PBS (PBS : deionisiertes Wasser = 1:1), PBS, PBS mit zusätzlichen 100 mM NaCl oder PBS mit zusätzlichen 200 mM NaCl eingesetzt. Im nächsten Schritt wurde der Puffer gegen eine Lösung des Kinesins im jeweiligen Puffer ausgetauscht und für 20 min bei 0°C inkubiert. Hierzu wurde eine Lösung aus $1\ \mu\text{l}$ der Stammlösung des Kinesins in $29\ \mu\text{l}$ des Puffers bei verwendet. Im Anschluss wurde die Flusszelle dreimal mit $50\ \mu\text{l}$ des jeweiligen Puffers, welcher $1,25\ \text{mg ml}^{-1}$ BSA enthielt, gespült und auf Raumtemperatur aufwärmen lassen bevor die mikroskopische Untersuchung erfolgte.

5.3.12 Orientierte Anbindung der Kinesine rk555 oder dk401 auf NTA-funktionalisierten Goldpartikeln

Es wurden $30\ \mu\text{l}$ PBS, das zusätzliche 200 mM NaCl enthielt (PBS 200), in die Flusszelle gespült und für 10 min bei Raumtemperatur equilibriert. Nach Austausch gegen $30\ \mu\text{l}$ einer 100 mM NiCl_2 -Lösung in PBS 200 wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss dreimal mit $50\ \mu\text{l}$ PBS 200 gewaschen. Nach Kühlen auf 0°C wurde eine Lösung des Kinesins in PBS 200 eingespült und für 20 min bei 0°C inkubiert. Hierzu wurde eine Lösung aus $1\ \mu\text{l}$ der Stammlösung des Kinesins in $29\ \mu\text{l}$ PBS 200 verwendet. Dann wurde die

Flusszelle dreimal mit 50 μl PBS 200, welches 1,25 mg ml^{-1} BSA enthielt, gespült und auf Raumtemperatur aufwärmen lassen bevor die mikroskopische Untersuchung erfolgte.

5.3.13 QCM-Messungen der Anbindung von CoA und ybbR-Luciferase auf polykristal- linem Gold

Für die Messungen in dieser Arbeit wurde das kommerziell verfügbare System Q-Sense E4 von Q-Sense (Schweden) verwendet. Die verwendeten Gold-beschichteten Kristalle (Q-Sense, Schweden) wurden vor ihrer Verwendung für 60 min mittels eines isotropen Mikrowellenplasmas und nachfolgender Ultraschallbehandlung für 5 min gereinigt bevor sie in die Flusszelle eingesetzt wurden. Hierfür wurde das TePla100-E (PVA TePla AG, Wetzlar) bei einem Sauerstoffdruck von 0,4 mbar und einer Leistung von 150 W verwendet. Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde das System in 50 mM HEPES-Puffer, der bei einem pH-Wert von 7,8 10 mM MgCl_2 enthielt, und einer Flussrate von 40 $\mu\text{l min}^{-1}$ für 35 min bei Raumtemperatur equilibriert. Die weiteren Schritte des Experiments wurden ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Untersuchung der Anbindung des CoA wurden die Sensoren für 65 min bei einer Flussrate von 20 $\mu\text{l min}^{-1}$ einer 1,3 mM Lösung des CoA (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) im Equilibrierungspuffer ausgesetzt. Dann wurde 60 min mit dem Puffer gespült um zwischen Viskositätseffekten und Adsorption zu unterscheiden. Anschließend wurde bei einer Flussrate von 20 $\mu\text{l min}^{-1}$ eine Lösung der PPTase Sfp (34 $\mu\text{g ml}^{-1}$) plus Luciferase (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) bzw. im Kontrollexperiment ausschließlich Luciferase (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) für 55 min verwendet. Dann wurden die Sensoren für 35 min bei 40 $\mu\text{l min}^{-1}$ mit dem Puffer gefolgt von 55 min mit dem Puffer plus 0,05% Tween20 und abschließend für 25 min mit dem Puffer gespült.

6. Motilität und Funktionalität molekularer Motoren

Das Verständnis der Funktion molekularer Motoren stellt die Basis dar um sie in der Nanotechnologie zu verwenden sowie Krankheiten, die auf defekten Motorproteinen beruhen, zu verstehen und zu behandeln. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Methoden zur Untersuchung der Motilität und Funktionalität molekularer Motoren ausgearbeitet, die es erlauben diese unter hochdefinierten Bedingungen zu untersuchen. Sie werden im Folgenden als Motilitätsuntersuchung bzw. Gleitexperiment und als Funktionalitätsnachweis bezeichnet. Beide Methoden beruhen auf der in Kapitel 5 vorgestellten, orientierten Anbindung von Motorproteinen auf mit Goldnanopartikeln dekorierten Oberflächen.

6.1 Motorproteine und Filamente

Leben bedeutet Bewegung und die meisten Arten der Bewegung lebender Organismen werden durch faszinierende Proteine, die biochemische Nanomaschinen darstellen, ermöglicht. Diese als Motorproteine bezeichneten Systeme führen gerichtete Bewegung mit extrem hoher Spezifität und Effizienz aus, indem sie chemische in mechanische Energie umwandeln. Aufgrund dieser Fähigkeit können sie diverse Aufgaben wie den gerichteten Transport von Vesikeln erfüllen und leisten ihren Beitrag zu wichtigen Prozessen wie der Zellteilung. Defekte Motoren können daher zu schweren Erkrankungen führen oder sogar letal sein [9].

Es existieren drei Klassen von Motorproteinen: Myosine, die mit Aktinfilamenten wechselwirken sowie Dyneine und Kinesine, die mit Mikrotubuli interagieren [214,215,216]. Die Hydrolyse des als Adenosintriphosphat (ATP) bezeichneten universellen Trägers chemischer Energie aller Organismen ist die Grundlage der Bewegung aller Motorproteine. Diese führt zu einer kleinen Konformationsänderung der in jedem Motorprotein ein- bis mehrfach vorhandenen globulären Motordomäne, die durch angrenzende Bereiche verstärkt und in gerichtete Bewegung umgesetzt wird. Weitere Domänen sind für Dimerisierung, Regulation und Wechselwirkung mit anderen Molekülen zuständig. Dieser modulare Aufbau bedingt

die hohe Komplexität und die ungezählten Funktionen dieser Proteine. Bis heute wurden zahlreiche Vertreter aller drei Klassen entdeckt, wobei über die meisten wenig bekannt ist. Die zahlreichsten Informationen bezüglich der molekularen Mechanismen der Umwandlung chemischer in mechanische Energie wurden für die bekanntesten Repräsentanten der Kinesine und Myosine wie beispielsweise Kinesin-1, Myosin II oder auch Myosin V ermittelt. Hochaufgelöste Kristallstrukturen zeigen, dass die Region um die ATP-Bindungsstelle der beiden Klassen nahezu identisch ist, obwohl sich die Sequenzen stark unterscheiden [10].

Unter den zahlreichen Motorproteinen existieren monomere, wie auch dimere und tetramere Systeme [214,217]. Es besteht die Möglichkeit der Bewegung in Richtung des Plusendes als auch des Minusendes des Aktinfilaments oder Mikrotubulus, wobei sich die Motordomäne im ersten Fall am N-Terminus, im zweiten Fall am C-Terminus des Proteins befindet [214,217]. Neben dieser Positionierung der Motordomäne bestimmt auch der sich anschließende so genannte Hals des Motorproteins die Richtung der Bewegung. Dies konnte anhand von Chimären und Punktmutation in diesem Bereich gezeigt werden [218,219]. Des Weiteren können sich die Proteine nach einem Schritt ablösen oder bis zu mehrere Hundert Schritte auf dem Filament durchführen. Das erstgenannte Verhalten wird als nicht-prozessiv, das zweitgenannte als prozessiv bezeichnet. Nicht-prozessive Motoren arbeiten im Verbund während prozessive Proteine Individualisten sind, die unabhängig von anderen Motoren arbeiten.

Trotz dieses weiten Spektrums sind die die Bewegung initialisierenden Schritte der gut bekannten Kinesine und Myosine sehr ähnlich. Nach der Anbindung des ATP kommt es zur Abspaltung der γ -Phosphatgruppe gefolgt von einer konformativen Änderung konservierter Strukturen, die an die Bindungsstelle grenzen. Dies bedingt weitere konformative Änderungen der Filamentbindungsstelle sowie angrenzender Bereiche. Die Klasse der Dyneine unterscheidet sich deutlich von der der Kinesine und Myosine. Auf sie soll hier nicht näher eingegangen werden.

6.1.1 Mikrotubuli

Die Bewegung eines Motorproteins auf dem zugehörigen Filament hängt neben seiner Konformationsänderung auch von der Struktur des Filaments ab mit dem es interagiert [220]. *In vivo* bewegen sich Motorproteine auf den schon genannten, als Mikrotubulus oder Aktinfilament bezeichneten, polymeren Proteinstrukturen. Aktinfilamente und Mikrotubuli unterscheiden sich deutlich voneinander. Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit

Kinesinen und Mikrotubuli gearbeitet wurde, werden hier nur Mikrotubuli näher erläutert. Sie entstehen durch Selbstorganisation von Tubulin, genauer gesagt von α,β -Heterodimeren, die die lösliche Form des Tubulins darstellen, in der Gegenwart von Guanosintriphosphat [221]. Die Heterodimere lagern sich zu linearen Protofilamenten zusammen, die ihrerseits zum Mikrotubulus assemblieren. Im Normalfall sind 13 Protofilamente lateral zueinander angeordnet, so dass eine hohle Röhrenstruktur mit einem Durchmesser von ca. 25 nm entsteht [222]. Während Mikrotubuli *in vivo* eine hohe Dynamik aufweisen, können sie *in vitro* auf verschiedenen Wegen stabilisiert werden. Eine verbreitete Möglichkeit ist die Stabilisierung mittels Taxol, einer den Abbau von Mikrotubuli verhindernden Substanz, die in der Krebstherapie verwendet wird [223]. Aufgrund der Asymmetrie der Heterodimere sind Mikrotubuli polar und haben ein schnell wachsendes Plusende, das vom β -Tubulin begrenzt und ein langsam wachsendes Minusende, das vom α -Tubulin begrenzt wird [224].

Mikrotubuli sind in der Zelle vom Centrosom ausgehend polar angeordnet. Ihr Minusende liegt im Centrosom und ist dort gegen Abbau geschützt, das Plusende kann verlängert oder verkürzt werden. Es wächst vom Centrosom zur Zellperipherie. Neben der Wechselwirkung mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen zu verschiedenen Zwecken wie Transportvorgängen haben Mikrotubuli eine strukturgebende Funktion [225].

Die hier gegebene kurze Einführung in das Gebiet der Motorproteine und ihrer zugehörigen Filamente macht deutlich, dass es sich um hochkomplexe Systeme mit vielfältigen Aufgaben handelt. Um das vorhandene Potential in der Nanotechnologie ausschöpfen zu können, ist es notwendig Motorproteine besser zu verstehen, als es heute der Fall ist. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein in diesem Kapitel präsentiertes System zur Untersuchung der Motilität von Motorproteinen entwickelt. Dieses wurde unter Verwendung des am besten erforschten Vertreters der Kinesine, Kinesin-1, getestet.

6.1.2 Kinesin-1

Kinesin-1 ist ein homodimeres Motorprotein, das streng prozessives Verhalten zeigt und sich in Richtung des Plusendes eines Mikrotubulus bewegt. Es besteht, wie in Abbildung 6.1 a gezeigt, aus einer N-terminalen Motordomäne, die die Nukleotid- und Tubulinbindungsstelle beinhaltet, einer Halsregion gefolgt von einer langen linearen Schaffstruktur, die der Dimerisierung dient sowie einer Bindungsstelle für zu transportierende Ladung. Die Reaktionszyklen der beiden auch als Köpfe bezeichneten Motordomänen sind so aufeinander-

der abgestimmt, dass immer mindestens ein Kopf an den Mikrotubulus gebunden ist. Abbildung 6.1 b zeigt dies schematisch.

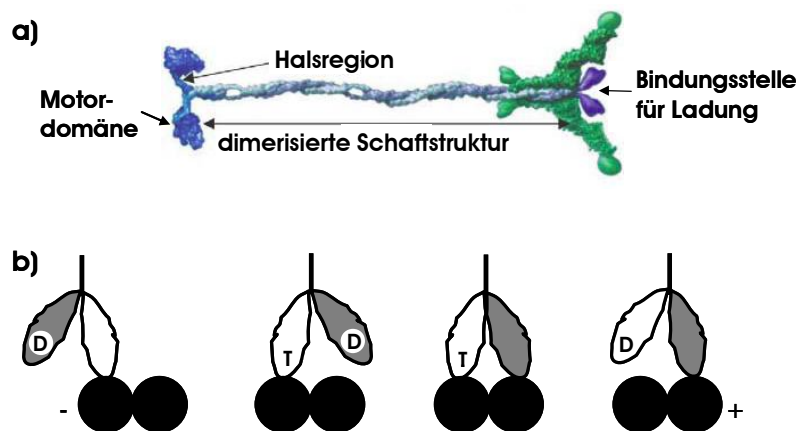


Abb. 6.1: **Struktur und Bewegung von konventionellem Kinesin.** a) Schematische Darstellung des aus Motordomänen, Halsregion, dimerer Schaffstruktur und Bindungsstelle für Ladung bestehenden konventionellen Kinesins, b) Schematische Darstellung der Bewegung des Kinesins entlang des Mikrotubulus [217,226].

Sobald sich ATP an den im linken Teil von Abbildung 6.1 b weiß dargestellten Kinesinkopf anlagert, beginnt dieser sich um seine eigene Achse zu drehen und bewegt dadurch den in grau dargestellten Kinesinkopf um eine Schrittlänge nach vorne. Während sich der graue Kinesinkopf nach vorne bewegt löst sich Adenosindiphosphat (ADP), das an diesen Kopf gebunden ist er bindet an die Kinesinbindungsstelle des Tubulins. Nach der Anbindung des zweiten Kopfes hydrolysiert dann das an den weißen Kinesinkopf gebundene ATP zu ADP und dieser Kopf löst sich vom Tubulin. Dann beginnt der Zyklus von vorne, indem sich ATP an den grauen Kinesinkopf anlagert. Die Schrittlänge des Kinesins bei dieser Bewegung beträgt 8 nm, was der Länge eines Tubulinheterodimers entspricht. Pro Schritt wird ein ATP verbraucht [227]. Kinesin-1, wie auch andere Motorproteine der Myosin- und Dyneinklassen entwickeln hierbei Kräfte im Bereich von 1-10 pN [228,229]. Des Weiteren ist diese Kraft lastabhängig [230]. Neben der beschriebenen mechanistischen Komponente der prozessiven Bewegung weist diese auch einen diffusiven Anteil auf. Dies konnte anhand von Mutanten mit zusätzlichen positiven oder negativen Ladungen im Bereich der Filamentbindungsstelle gezeigt werden. Erstere verhielten sich ultraprozessiv und konnten so bis zu vierfache Strecken auf dem Mikrotubulus zurücklegen, während letztere verminderte Prozessivität aufwiesen [231].

6.2 Motilitätsuntersuchungen in Gleitexperimenten

Die Isolation natürlich vorkommender Motorproteine ermöglicht die Untersuchung ihrer Eigenschaften und Funktionen mittels verschiedenster Methoden. Gleitexperimente, in denen Motorproteine auf Oberflächen angebunden werden um fluoreszenzmarkierte Filamente zu transportieren, stellen eine der Standardmethoden zur Untersuchung der Motilität molekularer Motoren dar [13,14,15]. Im Rahmen dieser Motilitätsuntersuchungen (engl. Motility Assays) werden Motorproteine *in vitro* verwendet um die dynamischen Wechselwirkungen der Proteine mit den zugehörigen Filamenten zu untersuchen. Die inverse Anordnung der Proteine weist den Vorteil auf, dass die Motilität durch die Fluoreszenzmarkierung der Filamente präzise beobachtet werden kann ohne die Aktivität des Motorproteins zu beeinflussen. Des Weiteren kann im Gegensatz zu Einzelmolekülexperimenten kooperatives Verhalten molekularer Motoren untersucht werden [232,233]. Abbildung 6.2 zeigt schematisch den Aufbau eines solchen Experiments. Auf einer Oberfläche angebundene, schwarz dargestellte Kinesine transportieren rot dargestellte, stabilisierte Mikrotubuli. Die Analyse der Bewegung der Mikrotubuli ermöglicht die Ermittlung kinetischer Daten der molekularen Motoren.

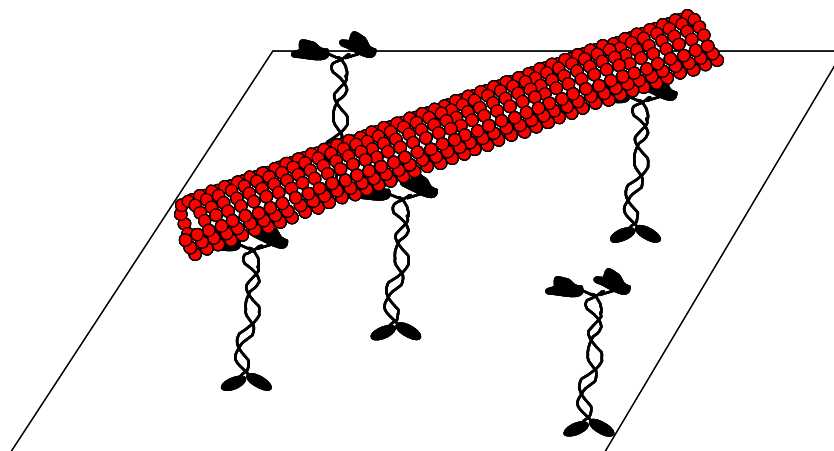


Abb. 6.2: **Schematische Darstellung eines Gleitexperiments zur Motilitätsuntersuchung.** Stabilisierte Mikrotubuli (rot) werden durch auf einer Oberfläche immobilisierte Kinesine (schwarz) über diese bewegt.

Kinesine erkennen die polare Struktur des Mikrotubulus. Dies bestimmt die Richtung ihrer Bewegung relativ zum Filament. Werden die molekularen Motoren, wie in Abbildung 6.2 dargestellt, im Gleitexperiment auf der Oberfläche immobilisiert, wird im Mikroskop eine ungerichtete Bewegung der Mikrotubuli beobachtet. Die Kontrolle über die Richtung der Bewegung ist aber ein wichtiger Faktor um das Systems in der Nanotechnologie verwenden zu können. Dies kann sowohl durch auf Oberflächentopografie und -chemie beruhende

Ansätze, als auch mittels der Verwendung elektrischer und magnetischer Felder sowie durch das Anlegen eines Flusses ermöglicht werden [235]. Auf weitere Aspekte des gerichteten Transports soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden, da sich Kapitel 7 mit dieser Thematik befasst. Zur Untersuchung der kooperativen Eigenschaften von Kinesinen in Gleitexperimenten ist es nicht notwendig die Richtung der Bewegung der Mikrotubuli zu kontrollieren.

6.2.1 Kontrolle der Dichte

Gleitexperimente stellen ein vereinfachtes Modell der *in vivo* Situation dar, in dem die natürliche Anordnung jedoch invertiert ist. Ein Nachteil des in Abbildung 6.2 gezeigten, sehr einfachen Aufbaus des Experiments ist die unspezifische Physisorption der Kinesine auf der Oberfläche, die dazu führt, dass ein Teil der Proteine denaturiert oder in der falschen Orientierung angebunden wird. Dies führt zur Einschränkung bis hin zum Verlust der Aktivität einiger Motorproteine. Zur Vermeidung dieses Problems können verschiedene Methoden zur orientierten Anbindung an die Oberfläche verwendet werden. Ein Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten wurde in Kapitel 5 gegeben. Für die Anbindung von Motorproteinen haben sich Nitrilotriacetate, die die orientierte Immobilisierung über Chelatisierung ermöglichen, bewährt [236].

Gleitexperimente zur Untersuchung der Motilität dienen der Ermittlung kinetischer Daten. Dichteabhängige Untersuchungen zeigen, dass die Kinetik von der Dichte angebundener molekularer Motoren abhängt, wenn diese nicht-prozessives oder schwach prozessives Verhalten zeigen [237]. Somit ist die Kontrolle der Dichte der Motorproteine sowie des Abstandes einzelner Proteine zueinander interessant um detaillierte kinetische Daten ermitteln und prozessive von nicht-prozessiven Motorproteinen unterscheiden zu können. Die präzise Kontrolle der Dichte wurde von Blümmel *et al.* durch die Anbindung auf mit hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln dekorierten Oberflächen realisiert. Wie in Abbildung 6.3 schematisch dargestellt, immobilisierten sie das tetramere Kinesin Eg5, das eine wichtige Rolle in der Zellteilung spielt und daher ein interessantes Objekt der Krebsforschung ist [11,238]. Aufgrund der tetrameren Struktur des Proteins ist die Untersuchung auf homogenen Oberflächen nicht möglich. Dies beruht vermutlich auf einer Anbindung und daraus folgenden Deaktivierung der Motordomänen des Proteins beiderseits der Schaffstruktur. Blümmel *et al.* lösten dieses Problem durch Anbindung des Eg5 auf den gezeigten Goldnanopartikeln (Abb. 6.3.3) und konnten zeigen, dass Mikrotubuli in Abhängigkeit vom Abstand der Proteine als auch von der Salzkonzentration der verwendeten Lösungen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten transportiert wurden.

Dieses Experiment ermöglichte die Analyse des kooperativen Verhaltens des sonst schwer zu untersuchenden Kinesins Eg5 unter hochdefinierten Bedingungen.

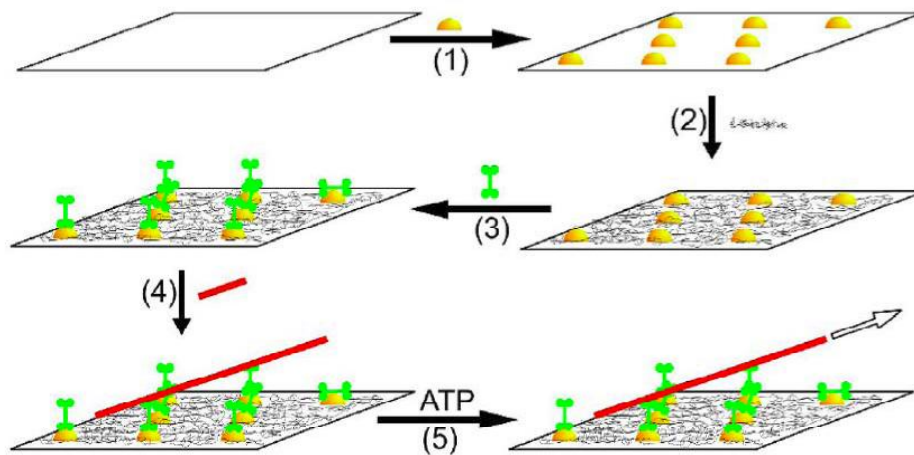


Abb. 6.3: **Schema der Probenpräparation des Dichte- und Abstandsabhängigen Gleitexperiments zur Untersuchung der Motilität von Eg5.** Nach Dekoration der Oberfläche mit hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln (1) und Passivierung der Bereiche zwischen den Partikeln (2) wird das tetramere Kinesin Eg5 (grün) auf den Partikeln immobilisiert (3), so dass es Mikrotubuli (rot) binden kann (4). Diese werden in ATP-Gegenwart transportiert [238].

6.2.2 Gerichtete Anbindung Histidin-funktionalisierter Motorproteine

Ein wesentlicher Nachteil der im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten Methode zur Untersuchung der Motilität von Motorproteinen auf mit Goldnanopartikeln dekorierten Oberflächen ist die fehlende Orientierung der Motorproteine, die zum Teil zur Einschränkung bis hin zum Verlust ihrer Aktivität führt. Des Weiteren ist dieses für die Untersuchung von Eg5 entwickelte Verfahren nicht ohne weiteres auf andere Motorproteine übertragbar. Gründe hierfür sind, dass zum Teil keine Anbindung auf den Goldpartikeln erfolgt oder diese zu einem so hohen prozentualen Verlust der Aktivität führt, dass kein Mikrotubulitransport beobachtet werden kann. Daher wurde die Methode im Rahmen dieser Arbeit weiterentwickelt um ihre Anwendbarkeit auf alle Motorproteine mit Histidinsequenz zu erweitern. Hierzu wurden die molekularen Motoren, wie in Kapitel 5 ausgeführt und in Abbildung 6.4 schematisch dargestellt, über chelatisiertes Ni^{2+} auf hexagonal auf der Oberfläche angeordneten Goldnanopartikeln immobilisiert. Dies wird durch die Chelatisierung einer ins Motorprotein eingeführten Histidinsequenz ermöglicht. Auf diesem Weg können Motorproteine gerichtet an Goldnanopartikel angebunden und untersucht werden [191]. Das System wurde unter Verwendung des gut erforschten prozessiven molekularen Motors Kinesin-1

getestet, da dessen Verhalten wohlbekannt ist und kinetische Daten, die mit den ermittelten Werten verglichen werden können, zur Verfügung stehen [236].

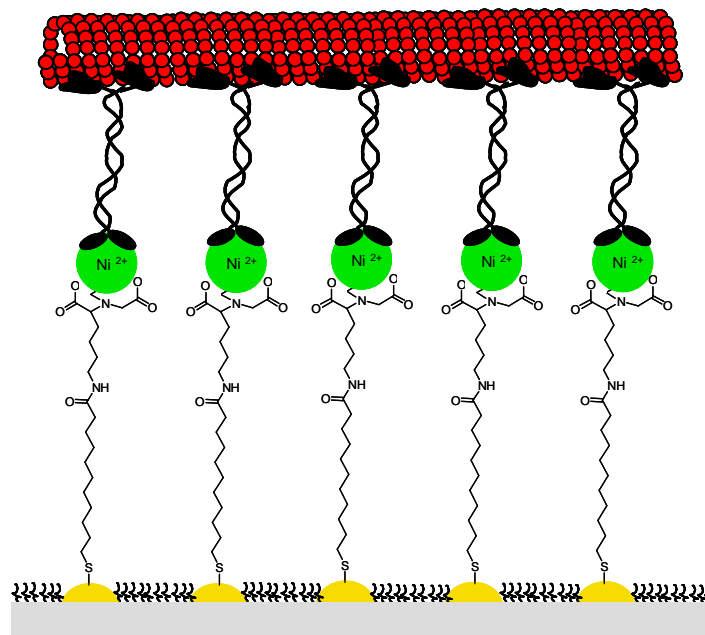


Abb. 6.4: **Schema der Gleitexperimente auf orientiert an Goldnanopartikel angeordneten Motorproteinen.** Mit hexagonal angeordneten Goldnanopartikeln dekorierte Oberflächen, die zwischen den Partikeln passiviert sind, werden zur orientierten Anbindung der Motorproteine (schwarz) über auf den Partikeln immobilisiertes Ni^{2+} (grün) verwendet und der Transport von Mikrotubuli (rot) beobachtet.

6.2.3 Durchgeführte Anbindungs- und Gleitexperimente

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente mit dem dimeren Drosophilakinesin dk401, durchgeführt.¹ Es besteht aus 401 Aminosäuren, die sich an den N-Terminus anschließen und setzt sich aus der Motordomäne, der Halsregion und einer kurzen Sequenz, die für die Homodimerisation essentiell ist, zusammen [236]. Die für die Verwendung in Gleitexperimenten erforderliche orientierte Anbindung dieses Kinesins an die Goldnanopartikel wurde in Kapitel 5 beschrieben. Die so funktionalisierten Oberflächen wurden verwendet um Mikrotubuli zu immobilisieren und transportieren. Abbildung 6.5 zeigt dies anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen des als Dippkante bezeichneten Grenzbereichs zwischen dem mit Goldpunkten dekorierten Bereich im oberen Teil der Bilder und dem undekorierten, mit Polyethylenglykol passivierten Bereich der Oberfläche im unteren Teil. Für beide Aufnahmen wurden Oberflächen mit einem Goldpartikelabstand von 45 nm verwendet. Die in

¹ freundlicherweise von Dr. Peter Bieling, Arbeitsgruppe Surrey, EMBL Heidelberg zur Verfügung gestellt

Abbildung 6.5 a gezeigte Oberfläche wurde mit orientiert angebundenem Kinesin funktionalisiert, während Abbildung 6.5 b die Kontrolle ohne Motorprotein darstellt. Es ist deutlich erkennbar, dass die Anbindung der Alexa-568 markierten Mikrotubuli spezifisch über das angebundene Kinesin erfolgt, da keine Mikrotubuli im passivierten Bereich unterhalb der Dippkante sowie auf der Kontrolloberfläche ohne Motorprotein nachweisbar waren. Auf der Kontrolle ohne Kinesin (Abb. 6.5 b) sind ausschließlich Bruckstücke der Mikrotubuli im Bereich der Dippkante sichtbar. Des Weiteren sind in Abbildung 6.5 a Mikrotubuli, die über die Dippkante in den passivierten Bereich hinausragen unscharf, da sie in diesem unstrukturierten Bereich nicht anbinden und sich somit frei bewegen können.

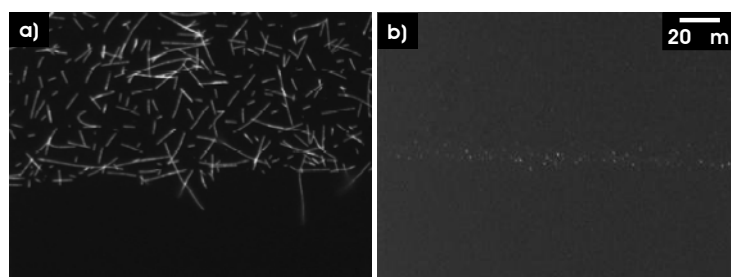


Abb. 6.5: **Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Anbindung Alexa-568 markierter Mikrotubuli.**

a) Mikrotubuli binden an Goldnanopartikel, auf denen das Kinesin orientiert angebunden wurde an.
b) Keine unspezifische Anbindung der Mikrotubuli auf Kontrolloberflächen ohne Kinesin.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Mikrotubulibewegung in diesem Grenzbereich zwischen dem mit Goldpunkten dekorierten und dem undekorierten Bereich der Oberfläche zeigten, dass nicht nur die Anbindung, sondern auch der Transport der Mikrotubuli ausschließlich im Bereich der strukturierten Oberfläche möglich ist. Dies ist aufgrund der Abwesenheit des Kinesins im unstrukturierten Bereich zu erwarten.

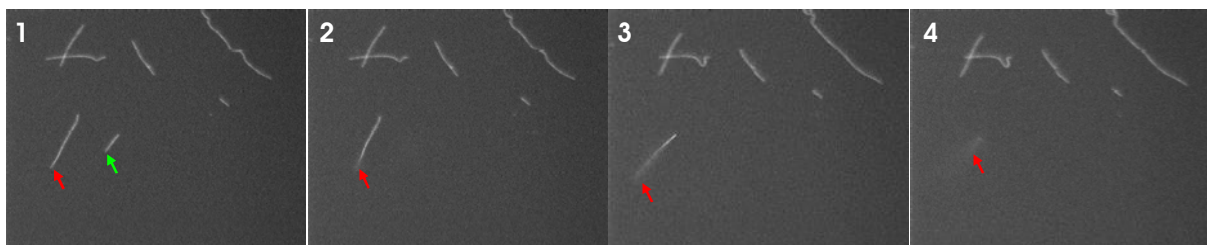


Abb. 6.6: **Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Mikrotubuliablösung im Grenzbereich zwischen mit Goldnanopartikeln strukturiertem und unstrukturiertem Bereich.** Die markierten Mikrotubuli lösen sich von der Oberfläche ab und diffundieren in die Lösung sobald sie die Grenze zum unstrukturierten Bereich im unteren Teil der Aufnahmen erreichen.

Abbildung 6.6 zeigt Mikrotubuli in diesem Grenzbereich auf einer mit Goldnanopartikeln in einem Abstand von 85 nm dekorierten Oberfläche. Die Bilder wurden von links nach rechts in Abständen von 6 s aufgenommen. Es ist deutlich erkennbar, dass sich die beiden markierten Mikrotubuli beim Überschreiten der Grenze zum unstrukturierten Bereich von der Oberfläche ablösen und in die Lösung diffundieren. Anhand des rot markierten, längeren Mikrotubulus wird die Affinität zum orientiert an die Goldstruktur gebundenen Motorprotein deutlich. Der Teil, der die Grenze zum unstrukturierten Bereich im unteren Teil der Bilder bereits überschritten hat, bewegt sich ungebunden in der Lösung und erscheint unscharf während der Rest, welcher noch über Motorproteine über die Oberfläche transportiert wird weiterhin im Fokus des Mikroskops bleibt bis sich der Mikrotubulus im letzten Bild vollständig ablöst und in die Lösung diffundiert.

Die bisher gezeigten Ergebnisse belegen die Anbindung von Mikrotubuli an mit Kinesin funktionalisierte Goldnanopartikel und ihren Transport durch das Motorprotein. Diese Anbindung gelingt nur im mit Goldnanopartikeln strukturierten Bereich und gelingt, wie in Abbildung 6.5 zu erkennen, nur in Anwesenheit des.

Das in Kapitel 4 vorgestellte Verfahren der BCML zur Herstellung der Goldnanopartikel bietet den großen Vorteil der einfachen Variation des Abstandes der Partikel. Um den Einfluss des Abstandes auf die Mikrotubulianbindung zu überprüfen, wurden Oberflächen mit verschiedenen Abständen in Anbindungsexperimenten verwendet.

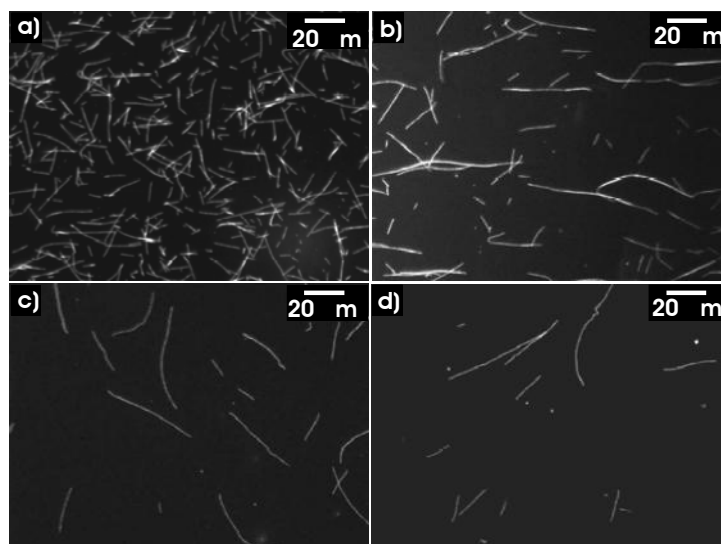


Abb. 6.7: **Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Anbindung Alexa-568 markierter Mikrotubuli auf mit Goldnanopartikeln unterschiedlichen Abstandes dekorierten Oberflächen.** a) $45 \text{ nm} \pm 7$, b) $85 \text{ nm} \pm 12$, c) $150 \text{ nm} \pm 23$, d) $230 \text{ nm} \pm 46$. Die Mikrotubulidichte nimmt mit abnehmendem Abstand der Partikel ab.

Abbildung 6.7 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Mikrotubuli auf mit Goldpartikeln in unterschiedlichen Abständen dekorierten Glasoberflächen. Die Abstände der Goldpartikel nehmen von a) nach d) von 45 ± 7 nm, über 85 ± 12 nm und 150 ± 12 nm auf 230 ± 46 nm zu. Wie erwartet nimmt die Mikrotubulidichte mit abnehmender Dichte der Goldnanopartikel ebenfalls ab. Sie ist jedoch auch im Fall des höchsten Abstandes hoch genug um sie für kinetische Untersuchungen verwenden zu können.

Um zu testen, ob das entwickelte System zur Ermittlung kinetischer Daten von Motorproteinen geeignet ist, wurden Mikrotubuli-Gleitexperimente auf mit Goldpartikeln dekorierten und mit Kinesin funktionalisierten Oberflächen durchgeführt. Abbildung 6.8 zeigt exemplarisch eine Abfolge fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen Alexa-568 markierter Mikrotubuli auf einer mit Goldpartikeln in einem Abstand von 230 nm dekorierten Oberfläche.

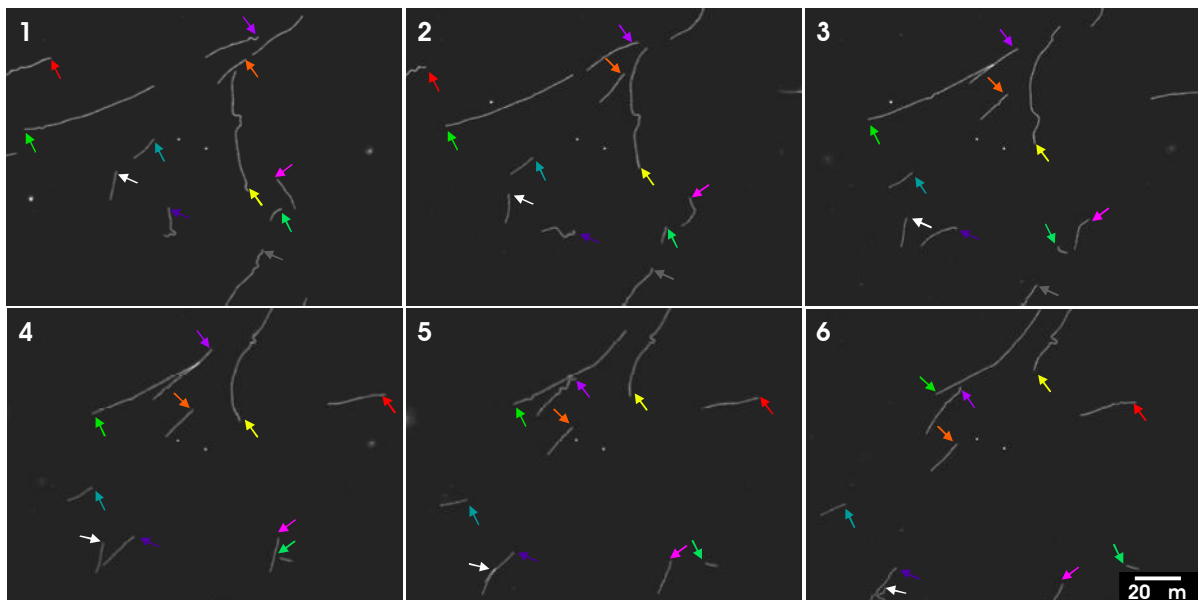


Abb. 6.8: **Abfolge fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen des Transports Alexa-568 markierter Mikrotubuli auf mit Kinesin funktionalisierten Goldnanopartikeln.** Die Mikrotubuli werden auf mit Kinesin funktionalisierten Goldpartikeln in einem Abstand von 230 nm mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $0,62 \pm 0,05 \mu\text{m s}^{-1}$ transportiert.

Das hintere Teil der Mikrotubuli ist mit Pfeilen in verschiedenen Farben markiert um ihre Bewegung über die Oberfläche zu verfolgen. Die Geschwindigkeit der Mikrotubuli wurde mittels eines speziell geschriebenen Analyseprogramms (IDL 6.0; Interactive Data Language, Research System Inc., CO, USA) ermittelt.² Die Analyse ergab eine durchschnittliche Ge-

² geschrieben und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Christian Böhm, Arbeitsgruppe Spatz, Max-Planck Institut Stuttgart

geschwindigkeit von $0,62 \pm 0,05 \mu\text{m s}^{-1}$. Dies entspricht dem Literaturwert aus Einzelmolekül-experimenten, der bei $0,66 \mu\text{m s}^{-1}$ liegt.[236] Des Weiteren zeigte sich, dass die Fähigkeit des Kinesins Mikrotubuli zu transportieren deutlich von der Versuchsanordnung abhängt. Reproduzierbare Ergebnisse ließen sich nur dann erzielen, wenn das Kinesin in Gegenwart von ATP an die Oberfläche gebunden wurde. Auch die darauf folgenden Schritte wurden in ATP-Anwesenheit durchgeführt. Versuche, den Motor erst im letzten Schritt durch Zusatz von ATP zu starten, schlugen in vielen Fällen fehl. Dieses Verhalten entspricht dem Verhalten des tetrameren Kinesins Eg5 und beruht auf einem Verlust der Motoraktivität während der Inkubationsschritte [182]. Um dies zu vermeiden wurden alle Experimente zur Ermittlung der Geschwindigkeit in ständiger ATP-Gegenwart durchgeführt.

Um den Einfluss des Abstands der Goldnanopartikel und somit auch des Abstands der Proteine zueinander auf die Geschwindigkeit der Mikrotubuli zu untersuchen, wurden Oberflächen mit verschiedenen Abständen unter vergleichbaren Bedingungen bezüglich der Kinesinkonzentration, Puffer und Zusätze sowie der Inkubationszeiten und Temperatur untersucht.

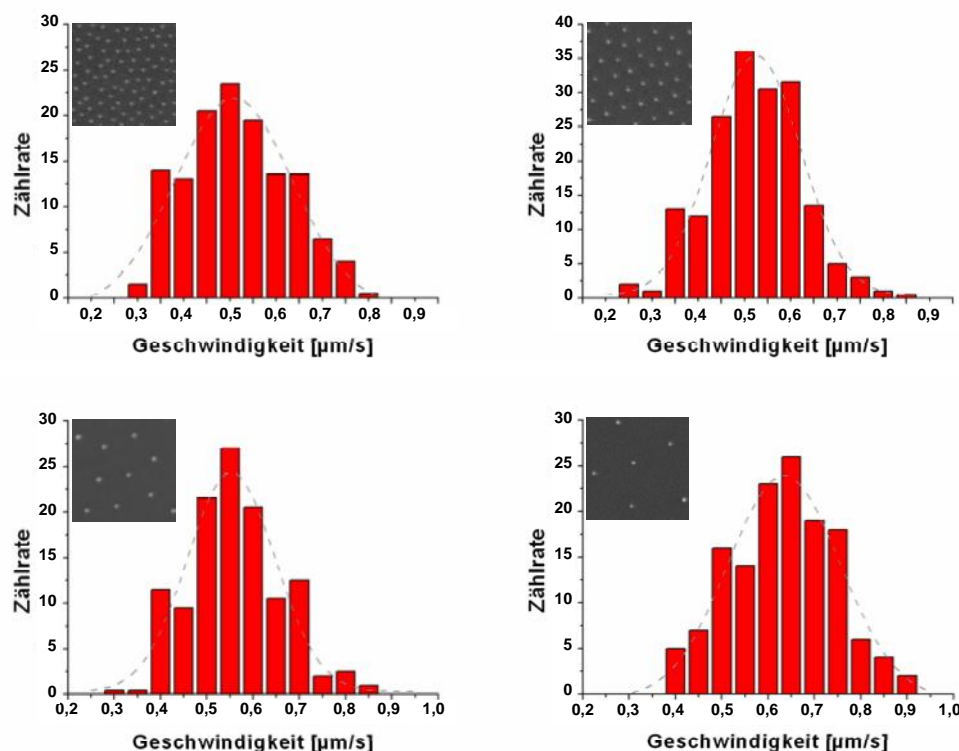


Abb. 6.9: **Geschwindigkeitsverteilungen des Transports Alexa-568 markierter Mikrotubuli auf verschiedenen Goldpartikelabständen.** Die Geschwindigkeiten betragen $0,51 \pm 0,02 \mu\text{m s}^{-1}$ auf einem Abstand von 45 nm (a), $0,53 \pm 0,02 \mu\text{m s}^{-1}$ auf einem Abstand von 85 nm (b), $0,55 \pm 0,03 \mu\text{m s}^{-1}$ auf einem Abstand von 150 nm (c) und $0,62 \pm 0,05 \mu\text{m s}^{-1}$ auf einem Abstand von 230 nm (d).

Die Ergebnisse der Auswertung der Experimente sind in Abbildung 6.9 dargestellt. Es wurden Abstände von 45 ± 7 nm, 85 ± 12 nm, 150 ± 12 nm und 230 ± 46 nm verwendet. Die ermittelten durchschnittlichen Geschwindigkeiten betragen $0,51 \pm 0,02 \mu\text{m s}^{-1}$, $0,53 \pm 0,02 \mu\text{m s}^{-1}$, $0,55 \pm 0,03 \mu\text{m s}^{-1}$ und $0,62 \pm 0,05 \mu\text{m s}^{-1}$. Somit kommt es zu einem Anstieg der Geschwindigkeit mit steigendem Abstand.

Für konventionelles Kinesin, das wie oben beschrieben ein prozessives Motorprotein ist, sollte die Mikrotubuligeschwindigkeit in Gleitexperimenten von der verwendeten Dichte auf der Oberfläche unabhängig sein [237]. Die hier beobachtete Abhängigkeit beruht jedoch darauf, dass prozessive Motorproteine im Verbund nicht synchron zusammenarbeiten. Aufgrund dieses statistischen Verhaltens ist im Fall einer mechanischen Kopplung der Proteine, wie sie im Fall des gemeinschaftlichen Transports eines Mikrotubulus auftritt, eine gegenseitige Beeinflussung zu erwarten. Diese wurde jedoch bis vor kurzem in der Literatur ausschließlich für nicht-prozessive Motorproteine beschrieben [237]. Bieling *et al.* konnten sie aber kürzlich auch für konventionelles Kinesin nachweisen, indem sie kurze, nur 401 Aminosäuren enthaltende Konstrukte, untersuchten [236]. Sie zeigten, dass diese Konstrukte, die neben der Motor- und Halsdomäne nur die für die Dimerisierung essentiellen Aminosäuren enthalten, sich gegenseitig negativ beeinflussen. In Gleitexperimenten beobachteten sie, dass es zu einer Verringerung der Geschwindigkeit der transportierten Mikrotubuli kam, wenn die Motordichte auf der Oberfläche stieg, da jeder Motor der gerade nicht aktiv am Transport beteiligt ist, eine zusätzliche Last für die gerade aktiven molekularen Motoren darstellt. Dieses Phänomen kann aber nur im Fall sehr kurzer Konstrukte beobachtet werden, da längere Konstrukte eine höhere Flexibilität ermöglichen, die den Bremseffekt kompensiert [236]. Daher wurde sie in vorangegangenen Untersuchungen, die längere und somit flexiblere Konstrukte verwendet haben, nicht beobachtet. In dieser Arbeit wurden die sehr kurzen, aus 401 Aminosäuren bestehenden Kinesinkonstrukte verwendet. Somit stimmt die Beobachtung eines Bremseffektes bei erhöhter Kinesindichte mit den Ergebnissen von Bieling *et al.* überein. Auf den verwendeten Oberflächen sind unter der Annahme, dass ein molekularer Motor pro Goldnanopartikel gebunden ist, 450, 150, 50 oder 25 Kinesine in Abständen von 45, 85, 150 oder 230 nm pro μm^2 angebunden. Die hier ermittelten Geschwindigkeiten liegen im Bereich der von Bieling *et al.* beschriebenen Werte für diese Kinesindichten [236]. Die hier beobachtete Abhängigkeit stellt somit keinen Widerspruch zum dichteunabhängigen Verhalten längerer Konstrukte dar und beruht darauf, dass prozessive Motorproteine nicht synchron zusammenarbeiten.

6.3 Nachweis der Funktionalität angebundener Motorproteine

Zur Überprüfung der Aktivität immobilisierter Proteine wird in der Regel ihr Vermögen spezifische Biomoleküle anzubinden überprüft. Ein Beispiel ist die Anbindung eines spezifischen Liganden an einen immobilisierten Rezeptor [197]. Im Fall von Motorproteinen werden in der Regel Mikrotubuli verwendet. Werden diese erfolgreich über die Oberfläche transportiert, belegt dies die Aktivität der molekularen Motoren. Diese Methode erlaubt es jedoch nicht einzelne inaktive Motoren zu erkennen.

Auch der Beweis, dass Gleitexperimente zur Untersuchung der Motilität von Motorproteinen anwendbar sind, wurde ausschließlich dadurch erbracht, dass die Experimente reproduzierbar durchgeführt werden können und die Geschwindigkeiten mit den *in vivo* ermittelten Geschwindigkeiten übereinstimmen [239]. Ein Nachweis des Erhalts der Aktivität einzelner Proteine existierte bislang nicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun die Funktionalität immobilisierter Kinesine durch Anbindung von kolloidalen Goldnanopartikeln und deren Freisetzung in ATP-Gegenwart auf molekularer Ebene nachgewiesen. Abbildung 6.10 zeigt das diesem Nachweis zugrunde liegende Prinzip schematisch. Orientiert auf den Goldpartikeln immobilisierte Kinesine (schwarz) bilden den Ausgangspunkt des Experiments. Zunächst wird in Gegenwart von AMP-PNP biotinyliertes Tubulin (rot) gefolgt von Streptavidin (blau) an die Motorproteine angebunden. AMP-PNP ist ein nicht hydrolysierbares ATP-Analogon, das Kinesin inhibiert und zum so genannten Rigorzustand, in dem keine Motilität möglich ist, führt [240]. Es wird verwendet, um die Anbindung an die Tubulindimere zu verstärken. Das Streptavidin ermöglicht die Anbindung biotinylierter kolloidaler Goldnanopartikel. Da diese im Gegensatz zu den angebundenen Proteinen ohne Probleme im Rasterelektronenmikroskop visualisiert werden können, kann bei dieser Versuchsanordnung im Gegensatz zum Gleitexperiment die Anbindung von Tubulin an einzelne Motoren direkt überprüft werden. Des Weiteren kann im Anschluss der Erhalt der Aktivität der angebundenen molekularen Motoren durch die Zugabe von ATP überprüft werden. Im Fall funktionaler Motorproteine kommt es zu ATP-Hydrolyse, die eine Freisetzung des Tubulins und somit auch des daran gebundenen biotinylierten kolloidalen Goldnanopartikels bedingt. So können aktive molekulare Motoren dann von solchen, deren Funktionalität zerstört wurde, unterschieden werden, da diese die über das Tubulin angebundenen Goldpartikeln weiterhin fest binden. Durch Untersuchung der Oberflächen im Rasterelektronenmikroskop können die kolloidalen Goldnanopartikel visualisiert werden und darüber die Aktivität der Motorproteine überprüft werden.

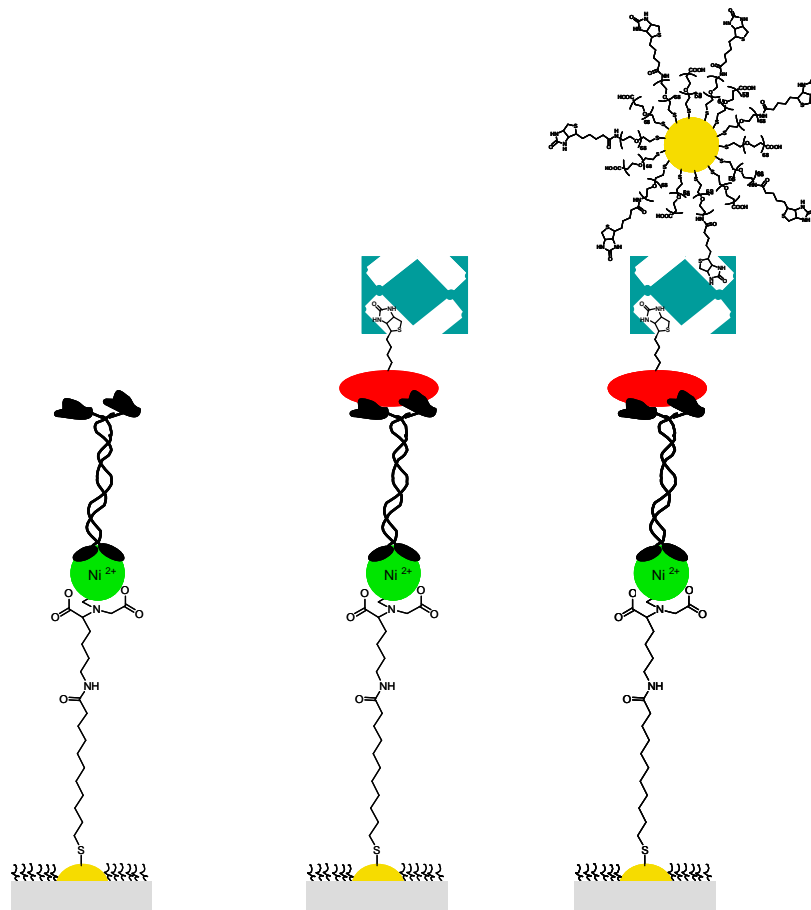


Abb. 6.10: **Schematische Darstellung des Funktionalitätsnachweises über Anbindung von Goldnanopartikeln.** Nach Anbindung von biotinyliertem Tubulin (rot) und Streptavidin (türkis) können biotinylierte Goldnanopartikel (gelb) angebunden und im Rasterelektronenmikroskop nachgewiesen werden.

6.3.1 Herstellung kolloidaler Goldpartikel

Die für den Nachweis benötigten kolloidalen Goldnanopartikel wurden im Rahmen dieser Arbeit nach einer von Grabar *et al.* entwickelten Methode hergestellt [241]. Die gezielte Synthese von Goldkolloiden wurde in der Literatur erstmals von Turkevich *et al.* beschrieben und später von Frens für die Synthese verschiedener Größen erweitert. Beide verwendeten die Reduktion von Gold(III)-chlorid mit Natriumzitat und Frens variierte zusätzlich das Verhältnis von Goldsalz zu Reduktionsmittel um den Durchmesser der entstehenden Kolloide zu beeinflussen [242,243]. Auch die in dieser Arbeit verwendete, von Grabar *et al.* entwickelte Methode basiert auf dem von Turkevich *et al.* ausgearbeiteten Ansatz. Es wurde lediglich die Konzentration an eingesetztem Gold(III)-chlorid erhöht, wodurch reproduzierbar sphärische Partikel erhalten werden können [241].

Eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mittels dieser Methode hergestellten Kolloide ist in Abbildung 6.11 a dargestellt. Zur Analyse der Partikel wurden elektronen-

mikroskopische Aufnahmen herangezogen und der Durchmesser mit Hilfe des Programms ImageJ ermittelt. Er betrug, wie anhand des Histogramms in Abbildung 6.11 b erkennbar, für die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Partikel durchschnittlich 12 nm.

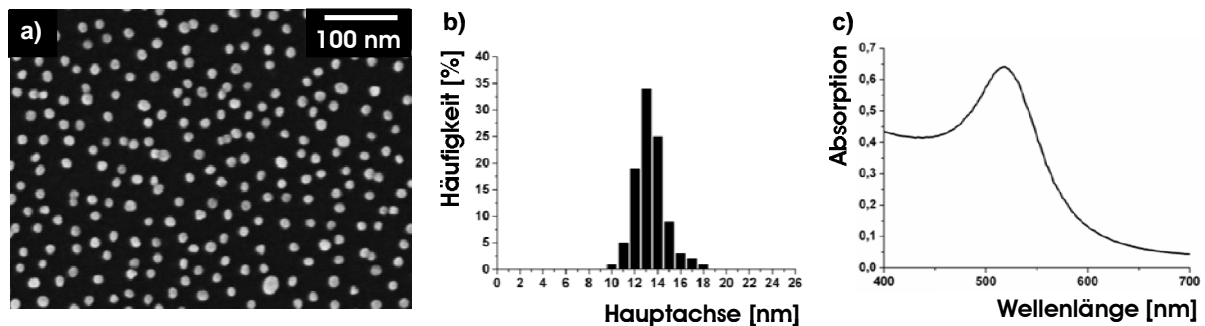


Abb. 6.11: **Synthetisierte 12 nm Kolloide.** Die REM-Aufnahme zeigt die hergestellten Kolloide mit einem Durchmesser von 12 nm. Die Lage des Maximums im UV/Vis-Spektrum bestätigt den Durchmesser.

Abbildung 6.11 c zeigt das zugehörige UV/Vis-Spektrum. Das Maximum der Plasmonresonanz ist von der Größe der Nanopartikel abhängig. Es verschiebt sich zu höheren Wellenlängen, wenn der Durchmesser der Nanopartikel steigt. Somit kann es zur groben Bestimmung der Größe der Kolloide herangezogen werden [244]. Das gemessene Maximum bei 520 nm bestätigt, dass die synthetisierten Kolloide einen Durchmesser im Größenbereich von 12 nm haben.

6.3.2 Biotinylierung der Goldpartikel

Nach der erfolgreichen Synthese der kollidalen Goldpartikel war ihre Funktionalisierung mit Biotin notwendig. Es bestehen verschiedene Möglichkeiten diese Biotinylierung durchzuführen. Die in dieser Arbeit verwendete Biotinylierungsstrategie ist ein einstufiges Verfahren, das die synthetisierten Partikel gleichzeitig stabilisiert und die Biotingruppe einführt. Hierzu wird, wie in Abbildung 6.12 schematisch gezeigt, eine Mischung aus (*N*-(6-(Biotinamido)hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamid und *O*-(2-Carboxyethyl)-*O'*-(2-mercaptoethyl)heptaethylenglykol verwendet. Eine Biotinylierung unter ausschließlicher Verwendung von (*N*-(6-(Biotinamido)-hexyl)-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamid war nicht erfolgreich, da es sofort nach der Zugabe zu einer Aggregation der kollidalen Partikel kam.

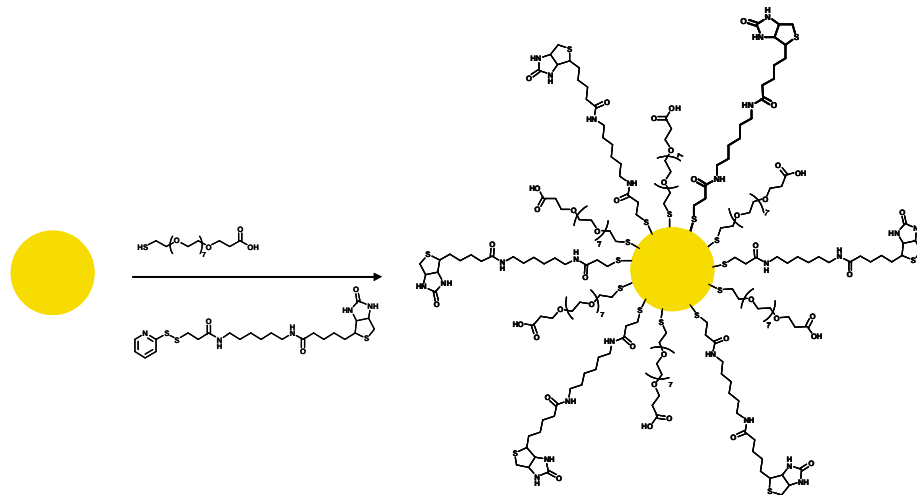


Abb. 6.12: **Einstufiges Verfahren zur Stabilisierung und Biotinylierung kolloidaler Goldnanopartikel.**

Die Partikel werden mit einer Mischung aus Carbonsäure-terminiertem Polyethylenglykol und Biotinthiol stabilisiert und biotinyliert.

Die Biotinylierung wurde mittels kommerziell erhältlicher, Streptavidin-beschichteter magnetisierbarer Partikel überprüft, indem eine Suspension dieser in Abbildung 6.13 a gezeigten Partikel mit den nach dem oben beschriebenen einstufigen Verfahren biotinylierten Goldkolloiden inkubiert und nach intensivem Waschen im Rasterelektronenmikroskop untersucht wurde. Aufgrund der Magnetisierbarkeit der Partikel können diese effizient aufgereinigt werden und sind damit ideal zum Nachweis der Biotinylierung geeignet. Abbildung 6.13 zeigt die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen unbehandelte Streptavidin-beschichtete Partikel (Abb. 6.13 a) im Vergleich mit Partikeln, die mit Goldpartikeln ohne Biotinfunktionalisierung (Abb. 6.13 b) sowie mit Biotinfunktionalisierung (Abb. 6.13 c) inkubiert wurden. Die Aufnahmen zeigen, dass ausschließlich biotinylierte Goldpartikel an die Streptavidin-beschichteten Partikel angebinden werden konnten. Somit erfolgt die Anbindung spezifisch über die erfolgreich eingeführte Biotinfunktionalität.

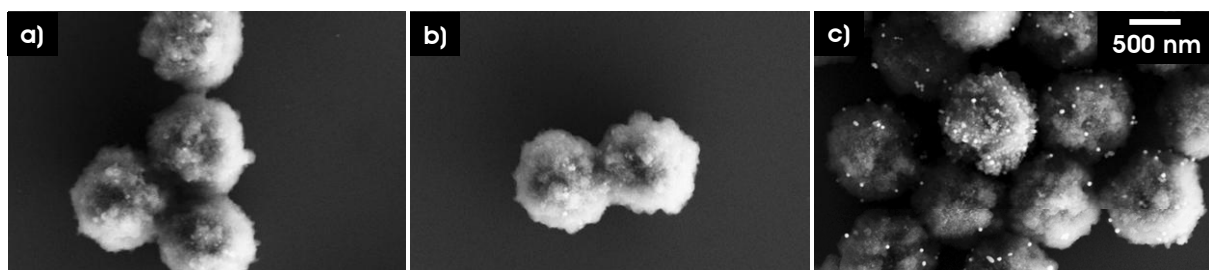


Abb. 6.13: **Nachweis der Biotinylierung der kolloidalen Goldpartikel über Streptavidin-beschichtete magnetisierbare Partikel.** Der Vergleich der unbehandelten Streptavidin-beschichteten Partikel (a) mit Partikeln, die mit Partikeln ohne Biotinfunktionalisierung (b) sowie mit Biotinfunktionalisierung (c) inkubiert wurden, zeigt, dass nur im Fall der biotinylierten Kolloide eine Anbindung erfolgt.

6.3.3 Anbindung des biotinylierten Tubulins über immobilisiertes Kinesin

Nach der erfolgreichen Biotinylierung der kolloidalen Goldpartikel wurde die für den Funktionsnachweis notwendige Anbindung des biotinylierten Tubulins über immobilisiertes Kinesin in AMP-PNP Gegenwart überprüft. Hierzu wurden kommerziell erhältliche, magnetisierbare Polystyrolpartikel, die mit Nitrilotriacetat funktionalisiert und mit Cobalt(II)ionen beladen sind verwendet. Sie ermöglichen die Anbindung von Motorproteinen über ihre Histidinsequenz. Die so angebotenen molekularen Motoren können dann auf ihre Fähigkeit biotinyliertes Tubulin in AMP-PNP Gegenwart zu binden getestet werden. Abbildung 6.16 a zeigt schematisch den Ablauf des durchgeführten Experiments.

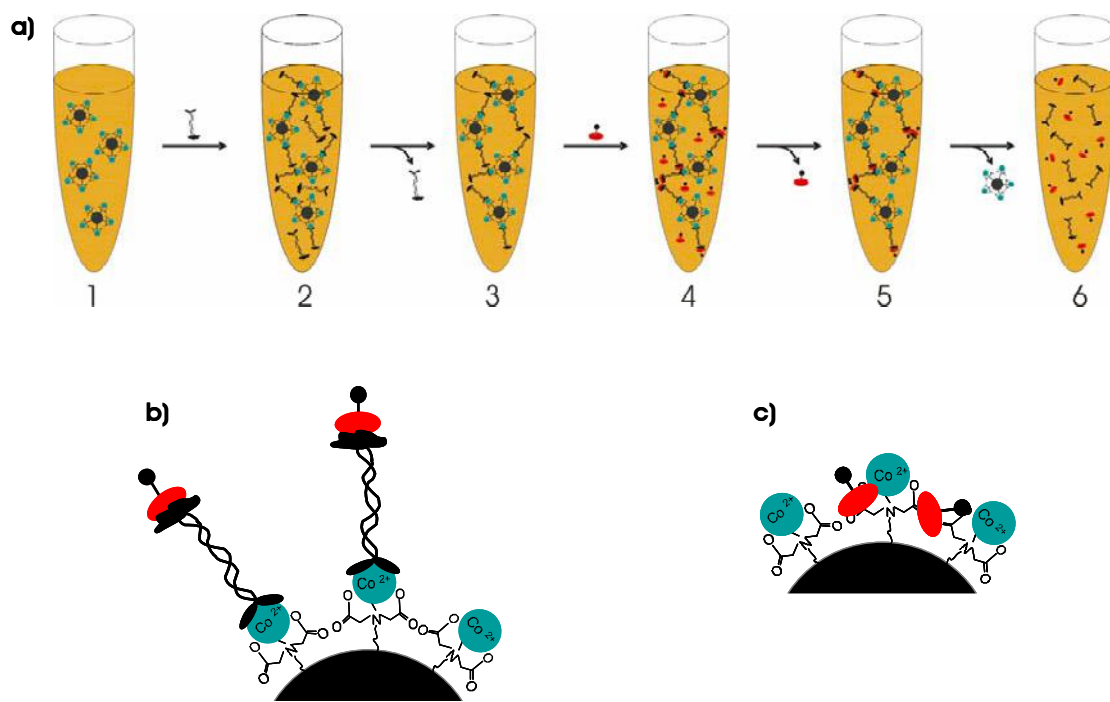


Abb. 6.16: **Schematische Darstellung der Überprüfung der Anbindung biotinylierten Tubulins an immobilisiertes Kinesin.** a) Die Suspension der Polystyrolpartikel (1) wurde mit dem Kinesin inkubiert (2), überschüssiges Kinesin entfernt (3), mit biotinyliertem Tubulin inkubiert (4), der Überschuss entfernt (5) und nach Freisetzung der Proteine und Entfernung der Polystyrolpartikel (6) wurde die Anbindung mittels Gelelektrophorese überprüft. b) Anbindung des Tubulins über das immobilisierte Kinesin, c) Anbindung über Physisorption.

Eine Suspension der Polystyrolpartikel (1) wird mit dem Kinesin inkubiert (2). Nach Entfernung des überschüssigen Kinesins (3), einem erneuten Inkubationsschritt mit biotinyliertem Tubulin (4) und Entfernung des Tubulinüberschusses werden Partikel erhalten, an die das Kinesin und das Tubulin gebunden sind (5). Die schematische Darstellung dieser Anbindung ist in Abbildung 6.16 b dargestellt. Um die Anbindung des biotinylierten Tubulins über das auf

den Partikeln immobilisierte Kinesin zu überprüfen, wurden die Proteine nach dem Experiment freigesetzt und die Partikel entfernt. Die erhaltene Lösung (6) wurde mittels Gelelektrophorese analysiert. Zusätzlich wurde ein Kontrollexperiment ohne Kinesin durchgeführt um das Ausmaß der Physisorption des biotinylierten Tubulins auf den funktionalisierten Partikeln zu überprüfen (Abb. 6.16 c).

Die Ergebnisse der durchgeführten Gelelektrophorese sind in Abbildung 6.17 abgebildet. Die vier verwendeten Taschen des Gels wurden mit der Lösung des in Abbildung 6.16 a dargestellten Experiments (1), der Lösung der Kontrolle ohne Kinesin (2) sowie einer Biotintubulin- (3) und Kinesinkontrolle (4) beladen. Der Vergleich der Banden der beiden zuletzt genannten Kontrollen mit dem Experiment zeigt, dass die oberste Bande bei ungefähr 49 kDa dem eingesetzten Biotintubulin und die vier Banden darunter dem Kinesin und seinen Fragmenten zugeordnet werden können. Es konnte eine gute Auftrennung des Tubulins, dessen monomere Untereinheiten jeweils ein Molekulargewicht von 55 kDa haben, und des verwendeten Kinesins, das eine molekulare Masse von 49 kDa hat, erzielt werden. Des Weiteren ist ein deutlicher Intensitätsunterschied zwischen der Biotinbande des Experiments und der Kontrolle erkennbar. Somit ist der Anteil an physisorbiertem Tubulin gering und die Anbindung von biotinyliertem Tubulin über das verwendete immobilisierte Kinesin funktioniert.

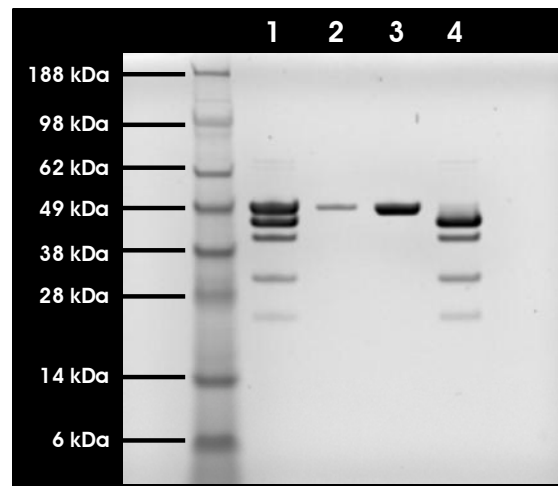


Abb. 6.17: **Ergebnisse der Gelelektrophorese.** 1) Lösung des Experiments, 2) Lösung des Kontrollexperiments ohne Kinesin, 3) Lösung von Biotintubulin in Puffer, 4) Lösung von Kinesin in Puffer. Der Vergleich der Banden zeigt, dass die Anbindung des biotinylierten Tubulins über immobilisiertes Kinesin funktioniert.

6.3.4 Funktionalitätsnachweis

Nach der Herstellung und Biotinylierung der kolloidalen Partikel sowie der Überprüfung der Biotinylierung und der Anbindung biotinylierten Tubulins an immobilisiertes Kinesin wurde der in Abbildung 6.10 schematisch dargestellte Nachweis der Funktionalität der orientiert auf Goldnanopartikeln angebundenen Kinesine durchgeführt. Abbildung 6.18 zeigt exemplarische rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberflächen nach der Anbindung des Kinesins (Abb. 6.18 a), nach der zusätzlichen Anbindung des biotinylierten Tubulins gefolgt von Streptavidin und biotinylierten kolloidalen Partikeln (Abb. 6.18 b) und nach weiterem waschen dieser Oberflächen mit ATP-haltigem Puffer (Abb. 6.18 c). Der Vergleich der Aufnahmen zeigt, dass die Anbindung der biotinylierten kolloidalen Goldpartikel erfolgreich war. Diese sind in Abbildung 6.18 b deutlich erkennbar. Auf Kontrollen ohne Motorprotein (nicht gezeigt) konnten keine kolloidalen Goldpartikel nachgewiesen werden. Aufgrund der nahezu identischen Größe der Goldpartikel, mit denen die Oberfläche dekoriert ist, und der Kolloide ist eine Unterscheidung nicht möglich. Aufgrund dessen und weil durch die vier Bindungstaschen des Streptavidins mehrere Goldkolloide pro Kinesin anbinden können, kann keine quantitative Aussage über die Anzahl der aktiven Motorproteine auf der Oberfläche getroffen werden. Es kann jedoch auf Basis der erhaltenen REM-Aufnahmen gefolgert werden, dass die Goldpartikel homogen mit orientiert angebundener Kinesin bedeckt sind, so dass die Tubulinbindungsdomänen frei zugänglich sind. Des Weiteren zeigt der Vergleich von Abbildung 6.18 b und c, dass die Funktionalität des Großteils der Motorproteine erhalten bleibt, so dass nach ATP-Zugabe Motilität möglich ist und angebundenes Tubulin wieder freigesetzt werden kann.

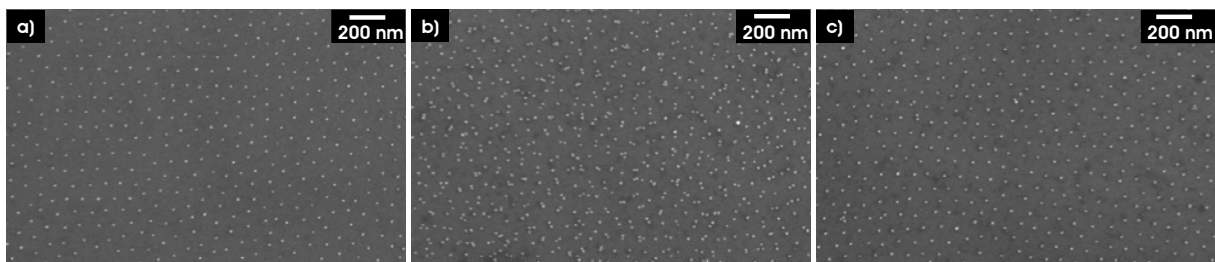


Abb. 6.18: **Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der Funktionalität angebundener Motorproteine.** a) nach der Anbindung des Kinesins, b) nach zusätzlicher Anbindung biotinylierten Tubulins gefolgt von Streptavidin und biotinylierten Goldpartikeln, c) nach Waschen mit ATP-haltigem Puffer. Der Vergleich zeigt die erfolgreiche Anbindung biotinylierter kolloidaler Goldpartikel und ihre Freisetzung durch funktionale Motorproteine in ATP-Gegenwart.

Dieser neuartige Nachweis der Funktionalität von Motorproteinen stellt eine wichtige Ergänzung des Gleitexperiments zur Überprüfung der Anbindung der Motorproteine auf molekularer Ebene dar. Die Untersuchung der Motilität im Gleitexperiment erlaubt es Informationen über kooperatives Verhalten immobilisierter Motorproteine unter definierten Bedingungen zu erhalten. Der Funktionalitätsnachweis im Rasterelektronenmikroskop ermöglicht es zusätzlich die Aktivität der Motorproteine auf molekularer Ebene unter den gewählten Bedingungen zu überprüfen und sicherzustellen. Die Kombination der beiden Methoden ermöglicht die zuverlässige Untersuchung von Motorproteinen, deren Verhalten und Funktion erforscht werden soll. Zusätzlich zur Ermittlung kinetischer Daten in Abhängigkeit der Dichte der Motorproteine sind auch die Analyse der Wechselwirkung des Motorproteins mit bestimmten chemischen Substanzen oder anderen Proteinen sowie seine Untersuchung im Zellextrakt unter definierten Bedingungen möglich. Ein Beispiel hierfür wäre die genaue Untersuchung des Kinesins Eg5 und seiner direkten Wechselwirkung mit dem Dynein-Dynactin-Komplex, die eine wichtige Rolle in der metaphasischen Spindel spielt [245].

6.4 Material und Methoden

Ethanol (zur Analyse) wurde von der Firma AppliChem (Darmstadt), Dimethylformamid (DMF, zur Analyse) und Essigsäure (zur Analyse) von der Firma Merck (Darmstadt) und Methanol (zur Analyse) von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Deionisiertes Wasser wurde mittels eines Millipore-Systems (Millipore, Eschborn) aufgereinigt. Alle weiteren Chemikalien wurden wie erhalten verwendet.

Das dimere Kinesinkonstrukt dk401, das mit einer Sequenz aus zehn Histidinen funktionalisiert war, wurde freundlicherweise von Dr. Peter Bieling (Arbeitsgruppe Surrey, EMBL Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationen der Stammlösung betrug $1,3 \text{ mg ml}^{-1}$ und wurde mittels eines Coomassie (Bradford) Protein Assay Kits (Thermo Scientific, Rockford, USA) überprüft. Tubulin, Alexa-568 markiertes Tubulin und Biotintubulin sowie Taxol, GTP und Mg-ATP wurden freundlicherweise von Mathias Utz (Arbeitsgruppe Surrey, EMBL Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Mikroskopische Untersuchungen wurden mittels des Zeiss AxioVision Cell Observers (Carl Zeiss AG, Oberkochen), der mit einem 63-fach Ölimmersionsobjektiv und einer AxioCam MRm Kamera ausgestattet war, durchgeführt. Die Aufnahmen der Gleitexperimente wurden in Intervallen von 2 s und mit einer Belichtungszeit von 100 ms gemacht.

UV/Vis-Spektroskopie wurde mittels des TECAN Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) durchgeführt. Hierzu wurden die verdünnten Proben in 96-Lochplatten (Greiner Bio One) pipettiert und die Absorption zwischen 300 und 700 nm gemessen.

Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden ein LEO1530 sowie ein Ultra 55 Mikroskop (beide Zeiss SMT, Oberkochen, Deutschland) verwendet. In beiden Geräten wird der Elektronenstrahl mittels eines Schottky Feldemitter erzeugt. Typische Beschleunigungsspannungen lagen zwischen 3 bis 15 kV, der Druck lag mindestens unterhalb $5 \cdot 10^{-6}$ mbar. Nichtleitende Glasoberflächen wurden vor ihrer Untersuchung mit einer ca. 5 nm dicken Graphitschicht beschichtet. Hierzu wurde der MED020 Sputter Coater (BAL-Tec AG Liechtenstein, jetzt Leica Microsystems, Wetzlar) verwendet.

6.4.1 Herstellung der Mikrotubuli

Je $500 \mu\text{l}$ der benötigten Puffer BRB80 und BRB80, das $20 \mu\text{M}$ Taxol enthielt, wurden zunächst über $0,1 \mu\text{m}$ Filter bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden $14 \mu\text{l}$ BRB80, $4,5 \mu\text{l}$ Tubulinlösung (25 mg ml^{-1}), $1 \mu\text{l}$ Alexa-568 markiertes Tubulin (20 mg ml^{-1}) sowie $2 \mu\text{l}$ 100 mM GTP-Lösung (pH 7) wurden in dieser Reihenfolge bei 0°C gemischt und 1 min bei 80000 rpm und bei 4°C zentrifugiert. $15 \mu\text{l}$ des Zentrifugats wurden zur Polymerisation des Tubulins 20 min bei 37°C unter Lichtausschluss gehalten, bei und im Anschluss

bei 14000 rpm in einer vorgewärmten Zentrifuge zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, der Niederschlag zweimal mit 40 μl BRB80, das 20 μM Taxol enthielt, gewaschen und in 40 μl BRB80, das 20 μM Taxol enthielt, resuspendiert. Diese Mikrotubulistammlösung wurden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gelagert.

6.4.2 Motilitätsuntersuchungen

Es wurden 30 μl PBS, das zusätzliche 200 mM NaCl enthielt (PBS 200), in die Flusszelle gespült und für 10 min bei Raumtemperatur equilibriert. Nach Austausch gegen 30 μl 100 mM NiCl_2 (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) in PBS 200 wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss dreimal mit 50 μl PBS 200 gewaschen. Nach Kühlen auf 0°C wurde eine Lösung des Kinesins in PBS 200 eingespült und für 20 min bei 0°C inkubiert. Hierzu wurde eine Lösung aus 1 μl der Stammlösung des Kinesins und 2 μl einer 100 mM Mg-ATP-Lösung in 57 μl PBS 200 eingesetzt. Dann wurde die Flusszelle dreimal mit 50 μl PBS 200, welches 1,25 mg ml^{-1} BSA (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) und 4 mM Mg-ATP enthielt, gespült und auf Raumtemperatur aufwärmen lassen. Nach einspülen von 30 μl der Mikrotubulilösung, wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mikrotubulilösung bestand aus 1 μl der Mikrotubulistammlösung in 50 μl BRB80, das 20 μM Taxol enthielt, sowie 5 μl einer 100 mM Mg-ATP-Lösung, 1,25 μl BSA-Lösung (50 mg ml^{-1} in PBS) und 5 μl Sauerstofffängerlösung. Die verwendete Sauerstofffängerlösung setzte sich aus BRB80, Glukose (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, 1 M in deionisiertem Wasser), Glucoseoxidase (Serva Electrophoresis, Heidelberg, 20 mg ml^{-1} in BRB80) und Katalase (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, 10 mg ml^{-1} in BRB80) im Verhältnis 6:2:1:1 zusammen. Schließlich wurden die ungebundenen Mikrotubuli mit 50 μl BRB80, das 20 μM Taxol sowie 5 μl einer 100 mM Mg-ATP-Lösung, 1,25 μl BSA (50 mg ml^{-1} in PBS) und 5 μl Oxygen Scavenger Lösung enthielt, ausgewaschen und die Oberfläche im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

6.4.3 Bestimmung der Mikrotubuligeschwindigkeit

Der Transport fluoreszenzmarkierter Mikrotubuli durch orientiert an die Oberfläche gebundene Kinesine wurde mit einer CCD-Kamera erfasst. Es wurde alle 2 s ein Bild aufgenommen. Die Geschwindigkeitsanalyse wurde im Anschluss mittels eines von Dr. Christian Böhm (Abteilung Spatz, Max-Planck Institut für Metallforschung Stuttgart) speziell geschriebenen Analyseprogramms (IDL 6.0; Interactive Data Language, Research System Inc., CO, USA) durchgeführt. Dabei wurden die Koordinaten (x|y) der Spitze eines Mikrotubulus bei jeder dritten Aufnahme (entspricht 9 s) manuell erfasst und über den Satz des Pythagoras die jeweilige Momentangeschwindigkeit des Mikrotubulus bestimmt. An die daraus resultierende Geschwindigkeitsverteilung wurde ein Gauß-Profil angepasst.

6.4.4 Synthese der kolloidalen Goldnanopartikel

Zur Synthese der kolloidalen Goldnanopartikel werden in einem 500 ml Dreihalskolben 100 ml einer 1 mM wässrigen Gold(III)-chlorid Lösung unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Unter starkem Rühren werden 10 ml einer 38,8 mM warmen Lösung aus Natriumzitrat in Wasser zu dieser Lösung gegeben. Die Lösung wird für 30 min bei 100°C gehalten und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die resultierende rote Lösung wird durch einen 0,2 μm Membranfilter filtriert und unter Ausschluss von Licht gelagert.

6.4.5 Biotinylierung und Stabilisierung der Goldkolloide

Zu 1 ml der kolloidalen Goldnanopartikel (ca. 5 nM) in NaHCO_3 -Puffer (40 mM, pH 8,5) wurden 100 μl einer Lösung von Biotin-HPDP (Thermo Scientific, Rockford, USA) und O-(2-Carboxyethyl)-O'-(2-mercaptoethyl)heptaethylenglykol (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) in NaHCO_3 -Puffer mit einem Molenbruch $x(\text{Biotinthiol}) = 0,2$ zugegeben, so dass die Endkonzentration 1 mM betrug. Nach Inkubation für 5 h bei Raumtemperatur wurden die Kolloide fünfmal mit NaHCO_3 -Puffer gewaschen. Das Lösungsmittel wurde jeweils mittels Ultrazentrifugation entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Partikel in 1 ml NaHCO_3 -Puffer resuspendiert.

6.4.6 Test der Biotinylierung der kolloidalen Goldnanopartikel

200 μl magnetische, mit Streptavidin beschichtete Partikel (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) wurden zunächst dreimal mit 100 μl NaHCO_3 -Puffer (40 mM, pH 8,5) gewaschen. Zum Austausch des Puffers wurde die Magnetisierbarkeit der Partikel ausgenutzt. Im Anschluss wurden 200 μl der biotinylierten Kolloide zugegeben und bei Raumtemperatur für 1 h geschüttelt. Im Anschluss wurden sie fünfmal mit NaHCO_3 -Puffer gewaschen und im Rasterelektronenmikroskop untersucht.

6.4.7 Überprüfung der Anbindung biotinylierten Tubulins an immobilisiertes Kinesin

25 μl magnetisierbare Partikel (Dynabeads TALON, Invitrogen, Karlsruhe, 40 mg ml^{-1}) wurden dreimal mit PBS, das 0,05% Tween20 enthielt, gewaschen und eine Lösung des Drosophilakinesins dk401 (80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in PBS zugegeben. Nach Schütteln bei 0°C für 1 h wurde zweimal mit 200 μl PBS, das 0,05% Tween20 enthielt und zweimal mit 200 μl BRB80, das 2 mM AMP-PNP (Roche Applied Science, Mannheim) enthielt, gewaschen. Es wurde eine Lösung des Biotintubulins (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in BRB80, das 2 mM AMP-PNP enthielt, zugegeben und erneut für 1 h bei 0°C geschüttelt. Die Partikel wurden fünfmal mit 200 μl BRB80, das 2 mM AMP-PNP (Roche, Mannheim) enthielt, gewaschen bevor sie in 20 μl SDS Puffer (10 μl deionisiertes Wasser, 7,5 μl 4-facher Nupage SDS Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)

und 2,5 μl Nupage Reduktionsmittel (Invitrogen, Karlsruhe)) für 10 min bei 85°C denaturiert wurden.

6.4.8 Gelelektrophorese und Anfärbung der Banden

10 μl der nach 6.3.7 hergestellten Lösungen der denaturierten Proteine in SDS Puffer wurden in die Taschen eines Bis-Tris Minigels (Invitrogen, Karlsruhe) geladen. Vorher wurden die Partikel unter Nutzung ihrer Magnetisierbarkeit entfernt. Für 35 min wurde eine Spannung von 200 V angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 1 h in einer Lösung aus 50% Ethanol und 10% Essigsäure in Wasser zur Fixierung der Proteine behandelt bevor es über Nacht mit einer Lösung aus 50% Methanol und 10% Essigsäure in Wasser gewaschen wurde. Im Anschluss wurden die Banden mit 0,1% Coomassieblau (GE Healthcare, München) in einer Lösung aus 20% Methanol und 10% Essigsäure in Wasser für 2 h angefärbt. Danach wurde das Gel mit einer Lösung aus 50% Methanol und 10% Essigsäure in Wasser gewaschen. Nach Equilibrierung des Gels in 3%iger Essigsäure für 2 h wurde das Gels mit dem LAS 300 Imager der Firma Fuji aufgenommen.

6.4.9 Funktionalitätsnachweis

Es wurden 30 μl PBS, das zusätzlich 200 mM NaCl enthielt (PBS 200), in die Flusszelle gespült und für 10 min bei Raumtemperatur equilibriert. Nach Austausch gegen 30 μl einer 100 mM NiCl_2 -Lösung in PBS 200 wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss dreimal mit 50 μl PBS 200 gewaschen. Nach Kühlen auf 0°C wurde eine Lösung des Kinesins in PBS 200 eingespült und für 20 min bei 0°C inkubiert. Hierzu wurde eine Lösung aus 1 μl der Stammlösung des Kinesins in 59 μl PBS 200 eingesetzt. Dann wurde die Flusszelle dreimal mit 50 μl PBS 200, welches 1,25 mg ml^{-1} BSA (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) enthielt, gespült. Nach Einspülen von 30 μl Tubulinlösung, die aus 1 μl Biotintubulin-stammlösung (20 mg ml^{-1}) in 125 μl BRB80, das 1,25 mg ml^{-1} BSA enthielt, bestand, wurde für 20 min bei 0°C inkubiert. Das ungebundene Tubulin wurde durch dreimaliges Waschen mit 50 μl BRB80, das 1,25 mg ml^{-1} BSA enthielt, entfernt. Im Anschluss wurde die Oberfläche mit einer Lösung aus 0,5 μl Streptavidin (5 mg ml^{-1} , Sigma-Aldrich, Schnelldorf) und 1,25 mg ml^{-1} BSA in 50 μl BRB80 für 20 min inkubiert und erneut dreimal mit 50 μl BRB80, das 1,25 mg ml^{-1} BSA enthielt, gewaschen. Es wurden 25 μl biotinylierte Goldkolloide in BRB80 eingespült, für 1 h inkubiert und dreimal mit BRB80 gewaschen. Schließlich wurde fünfmal mit 50 μl BRB80, das 5 μl 100 mM Mg-ATP-Lösung enthielt, gespült und die Oberfläche nach aufwärmen auf Raumtemperatur und Verdunstung des Lösungsmittels im Rasterelektronenmikroskop untersucht.

7. Mikronanostrukturen als Template molekularer Fließbänder

Ausgehend von den in Kapitel 4 vorgestellten, homogen mit Goldnanopartikeln beschichteten Oberflächen, die in Kapitel 6 zur Untersuchung von Motilität verwendet wurden, können mittels eines zusätzlichen Strukturierungsschrittes Mikronanostrukturen hergestellt werden. Bei diesen handelt es sich um hierarchische, aus Goldnanopartikeln aufgebaute Strukturen mit Durchmessern im Bereich einiger Mikrometer bis einiger hundert Nanometer. Dieses Kapitel befasst sich mit ihrer Herstellung und der Funktion dieser Strukturen als Template für so genannte molekulare Fließbänder.

7.1 Molekulare Transportsysteme und ihre *in vitro*-Anwendung

Vetreter der in Kapitel 6.1 vorgestellten Motorproteinklassen der Kinesine, Dyneine und Myosine sind unverzichtbare Komponenten des intra- und interzellulären Transports diverser Proteine [214,246]. Diese gerichteten Transportvorgänge sind in allen Zelltypen von großer Bedeutung. Ein Beispiel ist ihr Beitrag zur Funktion von Neuronen. Diese Zellen bestehen aus einem Zellkörper, einem Axon und Dendriten. Aufgrund der Tatsache, dass Proteinsynthese nur im Zellkörper stattfindet, müssen alle im Axon wie auch den Dendriten benötigten Proteine gerichtet transportiert werden. Hierzu bilden Neuronen polarisierte Strukturen aus und nutzen komplexe Mechanismen, wie das Zusammenspiel mehrerer Motorproteine und den Aufbau eines Filament-Filters [248].

Die Isolation natürlich vorkommender Motorproteine ermöglicht es sie in Kombination mit den zugehörigen Filamenten zum Aufbau von *in vitro* Transportsystemen zu verwenden. Diese Hybridsysteme verwenden Motorproteine in einer künstlichen Umgebung und sind darauf ausgerichtet die Transportrichtung, Geschwindigkeit und Be- und Entladung der Proteine zu kontrollieren. Dies dient der Erzeugung komplexer Nanotransportsysteme.

In vitro Systeme können bezüglich der Proteinanordnung in zwei Kategorien eingeteilt werden: Gleitexperimente, die auf immobilisierten Kinesinen, die beladene Mikrotubuli transportieren, beruhen [13,249] und Laufexperimente, in denen sich Kinesine gerichtet auf immobilisierten Mikrotubuli bewegen [250,251]. In beiden Fällen stellt die Kontrolle über die

Richtung der Bewegung eine große Herausforderung dar. Daher gibt es rege Forschung auf diesem Gebiet und es existieren diverse Lösungsansätze. In Gleitexperimenten führt die Nutzung von Oberflächentopografie und -chemie, die Verwendung elektrischer und magnetischer Felder sowie das Anlegen eines Flusses zum Erfolg [235]. Auch in Laufexperimenten konnte die Ausrichtung im Fluss und nachfolgende Immobilisierung zur erfolgreichen Herstellung isopolarer Systeme gezeigt werden [183,184].

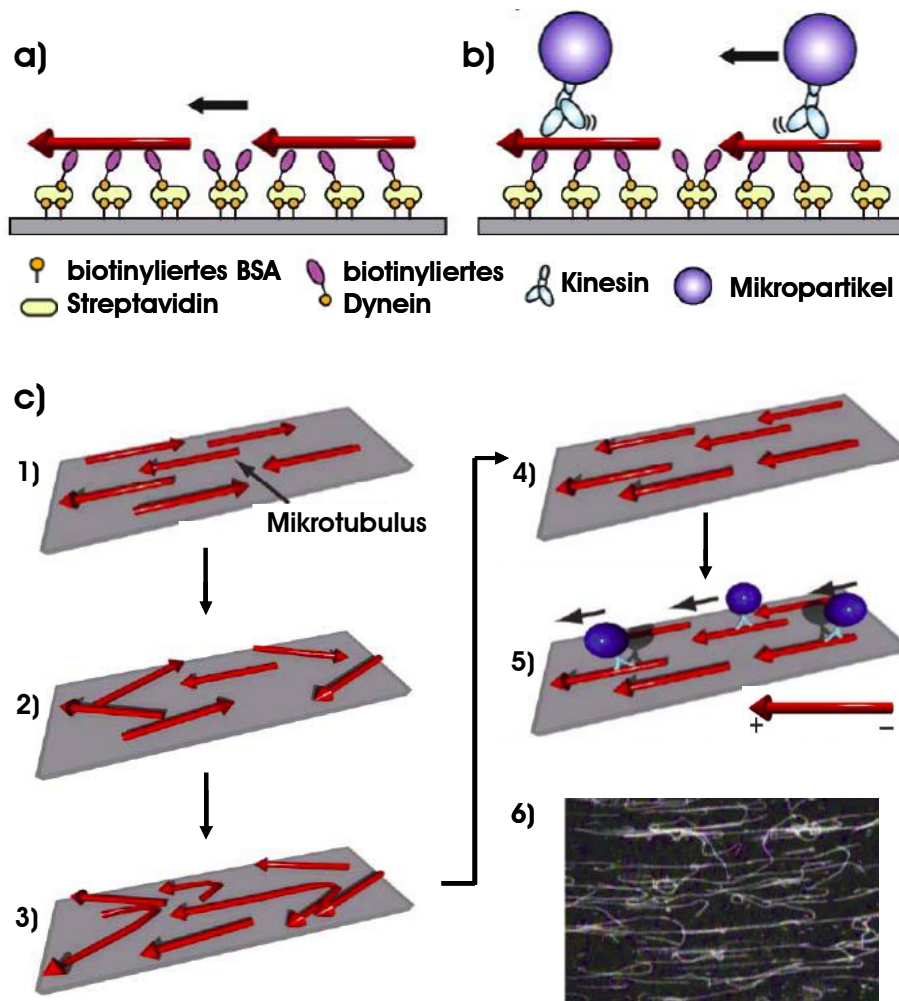


Abb. 7.1: **Polaritätsausrichtung von Mikrotubuli im Fluss auf Dynein-funktionalisierten Oberflächen.** a) Schema des Dynein-basierten Gleitens, b) Schema des Kinesinlaufexperiments, c) Ausrichtung und Anwendung polaritätsorientierter Mikrotubuli: 1) parallel zum Fluss angeordnete, nicht polaritätsorientierte Mikrotubuli nach Anbindung, 2) gleitende Mikrotubuli nach ATP-Zugabe, 3) Mikrotubuli orientieren sich parallel zum Fluss, 4) orientierte Mikrotubuli werden chemisch immobilisiert, 5) Kinesin-beschichtete Mikropartikel laufen auf polaritätsorientierten Mikrotubuli. Die schwarzen Pfeile geben die Richtung der Bewegung an. 6) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme polaritätsorientierter Mikrotubuli [254].

Yokokawa *et al.* richteten Mikrotubuli in PDMS-Kanäle mittels einer Dynein-basierten Immobilisierungsstrategie im Fluss aus und beobachteten gerichtete Bewegung von darauf laufenden Kinesinen (Abb. 7.1) [254]. Hierzu immobilisierten sie biotinyliertes Dynein über einen Komplex aus biotinyliertem BSA und Streptavidin auf der Oberfläche (Abb. 7.1 a). Die Polaritätsorientierung erfolgt, wie in Abbildung 7.1 c gezeigt, in mehreren Schritten. Das Einspülen der Mikrotubuli führt zunächst zu einer Anbindung nicht polaritätsorientierter Mikrotubuli parallel zur Flussrichtung (1). Nach Zugabe von ATP gleiten die Mikrotubuli durch Bewegung der Dyneine über die Oberfläche (2) und richten sich nach Anlegen des Flusses parallel zu diesem aus (3). Die polaritätsorientierten Mikrotubuli können dann durch Inaktivierung der Dyneine mittels Glutaraldehyd fixiert werden (4) und der Transport Kinesin-beschichteter Mikropartikel in Richtung des plus-Endes der Mikrotubuli beobachtet werden (5). Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme in Abbildung 7.1 c zeigt die polaritätsorientierten Mikrotubuli.

Die Verwendung selektiv an das minus-Ende bindender Antikörper bietet eine weitere Möglichkeit Mikrotubuli im Fluss auszurichten. Dies beruht auf der strukturellen Polarität des Mikrotubulus, die durch die Asymmetrie der Kopf-an-Schwanz assemblierten Tubulin- α , β -Heterodimere bedingt ist (Abb. 7.2 a). Limeris *et al.* verwendeten einen am C-Terminus Histidin-modifizierten Antikörper, der spezifisch an den nur am minus-Ende des Mikrotubulus zugänglichen N-Terminus des α -Tubulins bindet [255]. Durch Anbindung dieses Antikörpers über ein NTA-funktionalisiertes Tensid an eine hydrophobe Oberfläche konnten Mikrotubuli über ihr Minusende angebunden und im Fluss ausgerichtet werden. Mittels dieser Technik konnten 90% der analysierten Mikrotubuli polaritätsorientiert immobilisiert werden.

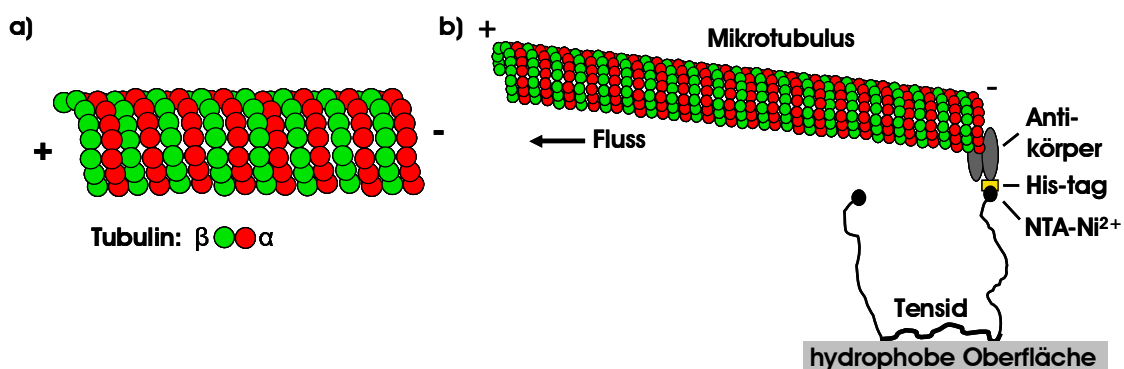


Abb. 7.2: **Polaritätsausgerichtete Mikrotubuli durch Antikörper-basierte Immobilisierung.** a) aus Heterodimeren aufgebaute, polare Mikrotubulusstruktur, b) Immobilisierung und Polaritätsorientierung eines Mikrotubulus über ein NTA-Tensid, das auf einer hydrophoben Oberfläche immobilisiert ist und einen Histidin-modifizierten Antikörper, der an das minus-Ende des Mikrotubulus gebunden ist [255].

Im Gegensatz zur Anbindung der Kinesine auf der Oberfläche weist die Anbindung der Mikrotubuli den Vorteil auf, dass die Proteinanordnung der *in vivo* Situation entspricht. Somit ist die Bindungsdomäne der Motorproteine für zu transportierende Objekte nicht blockiert. Dieser Aufbau ermöglicht somit einerseits die Untersuchung von Motorproteinen in einer der *in vivo* Situation entsprechenden Anordnung und ist zusätzlich zur Herstellung künstlicher Transportsysteme geeignet.

7.2 Template Molekularer Fließbänder

Die in 7.1 vorgestellten Techniken zur Mikrotubulianbindung ermöglichen ausschließlich die parallele Ausrichtung und Immobilisierung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun strukturierte Substrate entwickelt, die als Template zur polaritätsorientierten Anbindung und gerichteten Polymerisation der Mikrotubuli auf diesen Strukturen dienen. Abbildung 7.3 a zeigt die schematische Darstellung einer solchen Oberfläche. Die hierarchischen, aus Goldnanopartikeln aufgebauten Strukturen mit Durchmessern im Bereich einiger Mikrometer bis einiger hundert Nanometer werden als Mikronanostrukturen bezeichnet. Sie bieten die Möglichkeit Mikrotubuli so anzubinden, dass sie eine Verbindung zwischen zwei definierten Punkten herstellen. Die Geometrie der Struktur ist, begrenzt durch die Persistenzlänge des Mikrotubulus, frei wählbar.

Die Verwendung dieser Oberflächen dient der Herstellung so genannter molekularer Fließbänder. Als molekulare Fließbänder werden in dieser Arbeit, die in Abbildung 7.3 b schematisch dargestellten, an eine strukturierte Oberfläche polaritätsorientiert angebondenen Mikrotubuli (rot) bezeichnet, auf denen sich Motorproteine (schwarz) gerichtet bewegen können. Da die Bindungsdomäne der Motorproteine frei zugänglich ist, können die Motoren als Transporter benutzt werden. Somit stellt dieses Experiment eine Übertragung von Transportvorgängen, wie sie *in vivo* vorkommen, auf Oberflächen dar und dient dem Ziel gerichteten Transport zwischen zwei definierten Punkten zu ermöglichen. Eine vielversprechende Anwendung der molekularen Fließbänder findet sich z. B. im Bereich der medizinischen Analytik. Aufgrund des geringen Flächenbedarfs ließe sich diese Technik sogar in einem Hochdurchsatzverfahren nutzen.

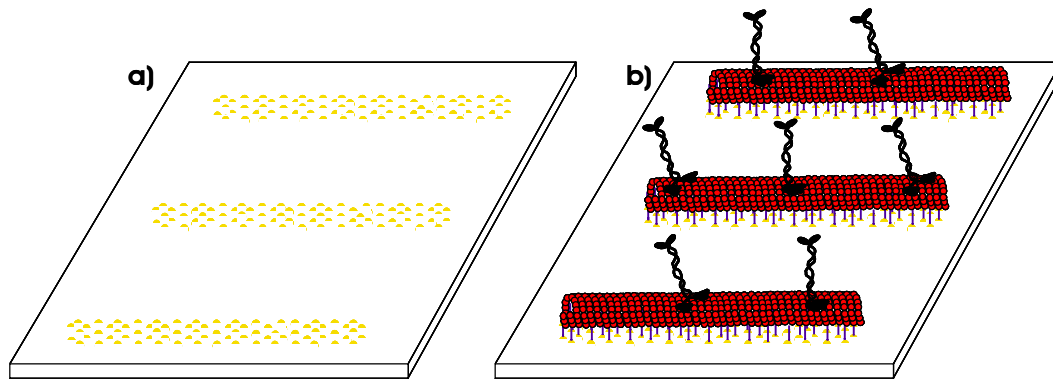


Abb. 7.3: **Mikronanostrukturen als Template Molekularer Fließbänder.** a) Schematische Darstellung der aus Goldpartikeln bestehenden Mikronanostruktur, b) auf der Mikronanostruktur immobilisierte Mikrotubuli, die als molekulare Fließbänder dienen.

In Kapitel 2 und 4 wurden Methoden zur Herstellung strukturierter Oberflächen vorgestellt. Da Mikrotubuli einen Durchmesser von 25 nm besitzen, sollten die Durchmesser der erzeugten Strukturen in der gleichen Größenordnung liegen. In dieser Arbeit wurde daher eine Kombination aus Blockcopolymer Mizellarer Lithografie und Elektronenstrahlithografie zur Erzeugung der Strukturen verwendet. Diese Kombination erlaubt es eine hohe Auflösung zu erzielen und definiert einzelne Proteine pro Goldpartikel anzubinden.

7.3 Mikronanostrukturierung

Durch Kombination der in Kapitel 4 vorgestellten BCML mit verschiedenen anderen Strukturierungsmethoden können Mikronanostrukturen erzeugt werden. Eine Möglichkeit ist die lokale Bestrahlung von Mizellmonolagen mit einem Elektronenstrahl, [16,256] einen fokussierten Ionenstrahl [257] oder UV-Licht. Des Weiteren ist es möglich strukturierte Oberflächen mit Mizellen zu dekorieren, Mizellen zu stempeln [258] oder durch Stempel zu entfernen [259]. Diese Kombination des Selbstorganisationsprozesses der BCML mit top-down-Methoden ermöglicht die gezielte Produktion mikronanostrukturierter Systeme zur Proteinimmobilisierung.

Die Kombination von Elektronenstrahlithografie und BCML ermöglicht die Herstellung hochauflöser Strukturen. Sie vereint die hohe Qualität der mittels BCML hergestellten hexagonalen Nanostrukturen mit der Flexibilität der ohne Masken auskommenden Elektronenstrahlithografie. Es existieren verschiedene Möglichkeiten Elektronenstrahlithografie und BCML zu kombinieren. Zum einen kann die mit einer Mizellmonolage beschichtete Oberfläche mit einem Elektronenstrahl belichtet werden. Abbildung 7.4 zeigt schematisch diesen Prozess, der als Mizellare Elektronenstrahlithografie bezeichneten

Technik. Die Mizellmonolage wird durch Bestrahlen mit einem fokussierten Elektronenstrahl lokal quervernetzt. Nicht bestrahlte Bereiche werden durch anschließende Behandlung mit organischen Lösungsmitteln im Ultraschall entfernt. Durch eine darauf folgende Plasmabehandlung wird das Polymer entfernt und Mikronanostrukturen erhalten. Aufgrund der im Lithografieprozess benötigten hohen Elektronendosen, ist diese Methode aber sehr langsam.

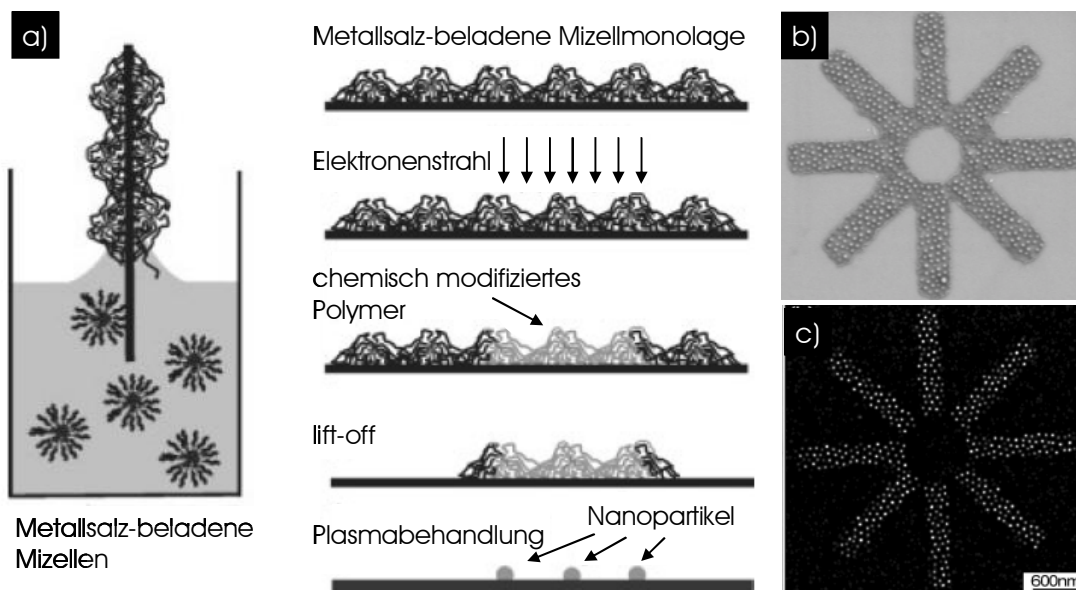


Abb. 7.4: **Mizellare Elektronenstrahlolithografie.** a) Schematische Darstellung des Prozesses, b) REM-Bild einer sternförmigen Mizellmonolage nach Entfernung des unbestrahlten Polymers, c) REM-Bild der sternförmigen Struktur nach Plasmabehandlung [16,256].

Eine weitere Möglichkeit der Kombination von BCML und Elektronenstrahlolithografie zur Herstellung von Mikronanostrukturen ist die Verwendung von mit Goldnanopartikeln beschichteten Oberflächen nach einer Beschichtung mit einem elektronensensitiven Lack. Im Vergleich mit der Mizellaren Elektronenstrahlolithografie ist der Durchsatz dieser Variante aufgrund von zwei Effekten deutlich höher. Einerseits ist die notwendige Elektronendosis um einen Faktor 50-100 geringer, andererseits ist die verwendete Beschleunigungsspannung der Elektronen um einen Faktor 15-20 höher. Somit wurde diese Kombination aufgrund ihrer deutlich höheren Geschwindigkeit in dieser Arbeit verwendet.

Der Prozess ist in Abbildung 7.5 schematisch dargestellt. Die Oberfläche wurde zunächst, wie in Kapitel 4 beschrieben, homogen mit Goldnanopartikeln dekoriert. Im nächsten Schritt erfolgten die Beschichtung mit einem elektronensensitiven Lack und die lokale Belichtung mit dem Elektronenstrahl zur lokalen Veränderung der Löslichkeit. Nach Entfer-

nung der löslichen Bereiche zwischen den Strukturen, die als Entwicklung bezeichnet wird, wurden die nicht durch den Lack bedeckten Nanopartikel durch Ultraschallbehandlung in einer wässrigen Cysteaminlösung entfernt. Im letzten Schritt wurde der die Struktur bedeckende Lack durch Behandlung mit einem organischen Lösungsmittel entfernt und die Oberfläche durch eine Plasmabehandlung gereinigt.

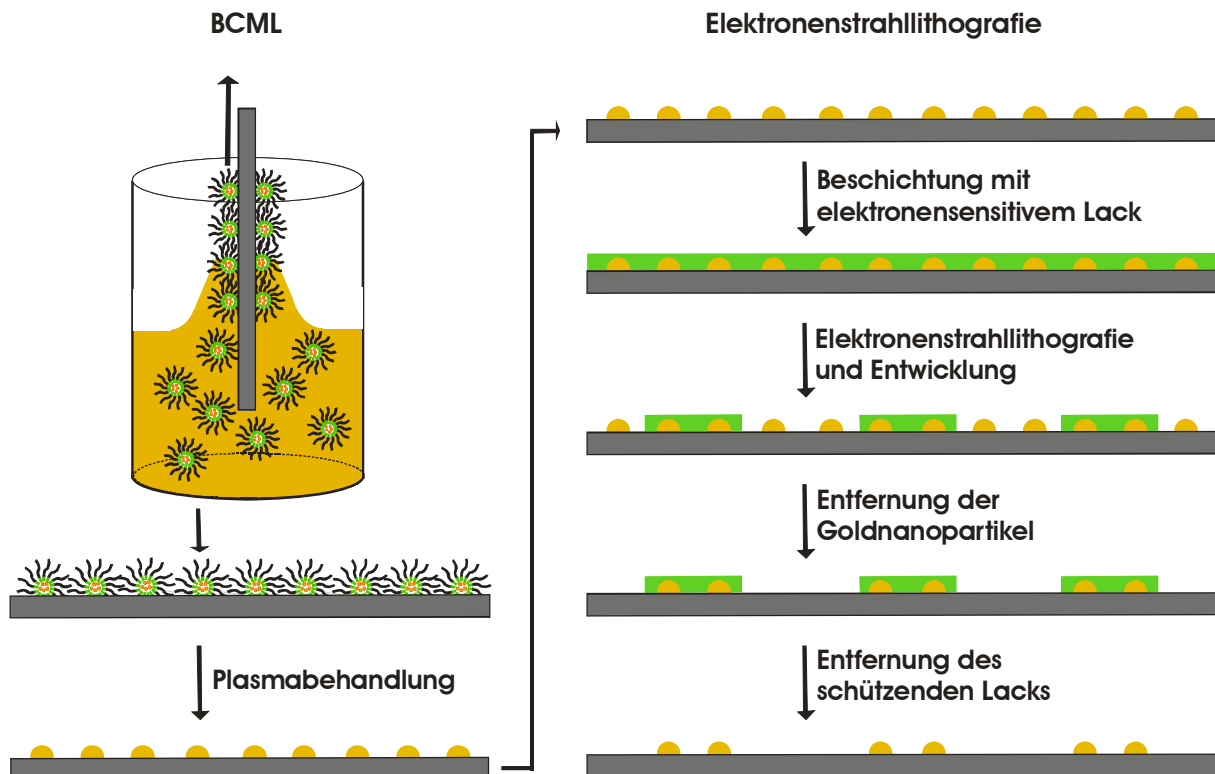


Abb. 7.5: **Schematische Darstellung der Mikronanostukturierung.** Nach Herstellung einer homogenen Goldnanopartikelbeschichtung mittels BCML, wird die Oberfläche mit einem elektronensensitiven Lack beschichtet. Im Anschluss wird dieser lokal mit dem Elektronenstrahl belichtet und entwickelt, so dass nach Entfernung der ungeschützten Nanopartikel und des schützenden Lacks Mikronanostrukturen erhalten werden.

Die Erzeugung der Struktur mittels Elektronenstrahl-Lithografie wurde im Rahmen dieser Arbeit auf leitfähigen, nicht-transparenten sowie leitfähigen, transparenten und nicht-leitfähigen, transparenten Oberflächen durchgeführt. Eine einfachere Variante, die homogene Goldstrukturen erzeugt, wurde ebenfalls ausgearbeitet.

7.3.1 Lacksystem

Es existieren verschiedene Lacktypen, die bezüglich ihrer Löslichkeitsveränderung bei der Belichtung unterschieden werden. Die Löslichkeit der Negativlacke nimmt durch Belichtung

ab, die der Positivlacke zu. Da somit die belichtete Fläche beim Negativlack nach der Entwicklung zurückbleibt, werden diese aufgrund der kleineren Fläche in der Elektronenstrahlithografie bevorzugt. Der Hauptbestandteil des in dieser Arbeit verwendeten Lacks ist Novolak. Zusätzlich enthält er Diazonaphthochinon (engl. diazonaphthoquinone, DNQ), radikalischen Initiator und Quervernetzer.

Novolake sind Phenolharze, die kombiniert mit fotosensitiven Substanzen wie DNQ als elektronensensitiver Lack eingesetzt werden können. Die belichtungssensitive Komponente des Lacks stellt nicht der Novolak selbst, sondern DNQ-Derivate dar. In Abwesenheit von Wasser bildet sich bei Bestrahlung des DNQ ein Indenylidenketen, das mit der Hydroxylgruppe des Novolaks zum Carbonsäureester reagiert (Abb. 7.6). Durch diese Reaktion wird die Löslichkeit in der alkalischen Entwicklerlösung reduziert. Hierzu muss die Belichtung jedoch unter Wasserausschluss erfolgen, da es sonst zu einer unerwünschten Deaktivierung des Ketens zur Carbonsäure kommt. Diese Bedingung wird durch die Arbeit im Hochvakuum erfüllt. Zusätzlich zur beschriebenen Ketten-Novolak-Reaktion kommt es aufgrund von durch die Bestrahlung erzeugten Elektronen zu einer Quervernetzung des Harzes.

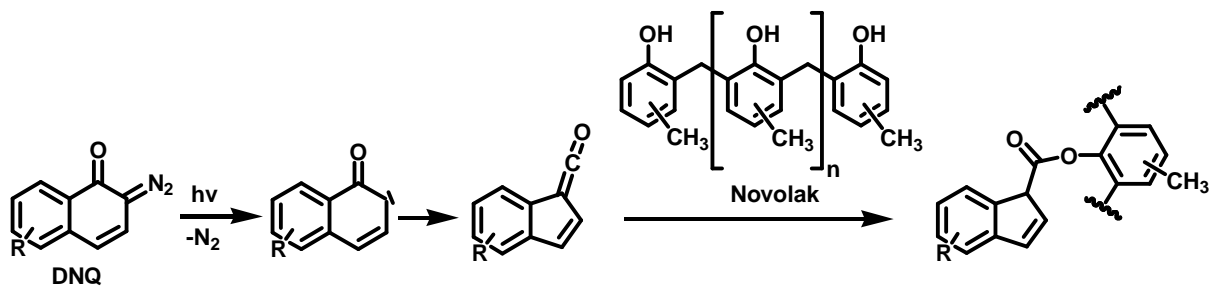


Abb. 7.6: **Quervernetzung des Novolak-Lacks nach Aktivierung des DNQ.** Bei Bestrahlung mit Elektronen spaltet DNQ Stickstoff ab und es kommt zur Bildung des Indenylidenketens, das in Abwesenheit von Wasser mit dem Novolak zum Carbonsäureester reagiert.

7.3.2 Leitfähige, nicht-transparente Oberflächen

Der elektronensensitive Novolak-Lack wurde auf homogen mit Goldnanostrukturen beschichtete Siliziumoberflächen mittels Schleuderbeschichtung aufgetragen. Vor dem Aufbringen des Lacks wurde die Oberfläche zur Förderung der Adhäsion gasförmigem Hexadimethyldisilazan (HDMS) ausgesetzt. Zur Erzeugung der Strukturen wurde die Probe in einem mit einem Lithographiesystem ausgestatteten Rasterelektronenmikroskop partiell belichtet. Die Strukturen wurden mittels der zugehörigen Software programmiert. Nach der Entwicklung in alkalischer Lösung sind die Lackstrukturen mit bloßem Auge sichtbar. Für eine genaue Untersuchung wurde ein Rasterelektronenmikroskop verwendet. Abbildung 7.7 a zeigt eine

exemplarische rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von 500 nm breiten Linienstrukturen nach der Entwicklung.

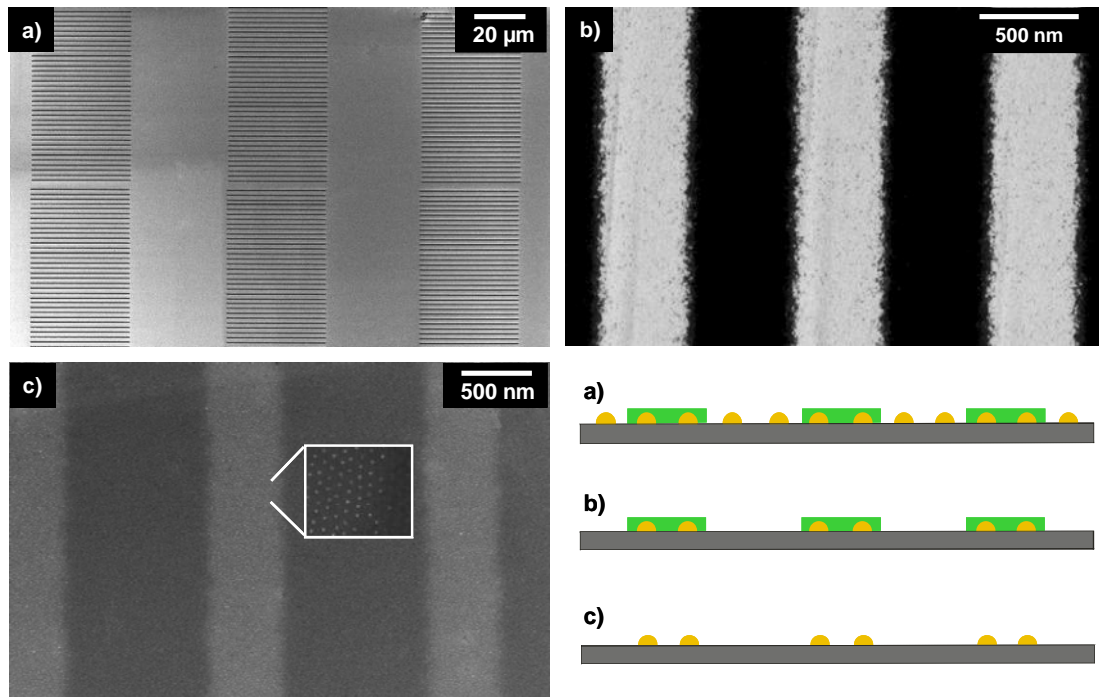


Abb. 7.7: **Rasterelektronenmikroskopische Bilder der Mikronanostukturierung auf Silizium.** a) Linienstrukturen nach der Entwicklung, b) Linienstrukturen nach der Entfernung ungeschützter Goldnanopartikel, c) Goldnanopartikel-Linienstrukturen nach Entfernung der Lackschicht.

Der nächste Schritt besteht in der Entfernung der nicht durch die Lackstrukturen geschützten Goldnanopartikel (Abb. 7.7 b). Hierzu wurde das Substrat in einer wässrigen Cysteaminlösung im Ultraschall behandelt. Die Unterstützung durch Ultraschall ist notwendig, da die Partikel sonst unvollständig entfernt werden. Bei einer Behandlungsdauer von länger als 2 min resultiert jedoch eine Schädigung der Struktur bis hin zur kompletten Ablösung [260]. Im letzten Schritt wurde die schützende Lackschicht durch Spülen mit Aceton oder Ethanol entfernt. Vor der weiteren Verwendung wurden die Oberflächen mittels einer Wasserstoffplasmabehandlung gereinigt. Die in Abbildung 7.7. c gezeigten, resultierenden Mikronanostrukturen haben definierte Kanten und die hexagonale Ordnung der Goldnanopartikel bleibt erhalten.

Die auf Siliziumoberflächen erzeugten Linienstrukturen können als Templat für molekulare Fließbänder und somit zur Immobilisierung und gerichteten Polymerisation von Mikrotubuli verwendet werden. Ein Nachteil von Siliziumoberflächen ist jedoch ihre Lichtundurchlässigkeit, die die Visualisierung der Oberfläche erschwert.

7.3.3 Aufladungseffekte auf nicht-leitenden Oberflächen

Die Verwendung leitfähiger Siliziumoberflächen ermöglicht den beschriebenen, etablierten Prozess. Für viele Anwendungen ist jedoch eine transparente Oberfläche wünschenswert. Eine transparente Oberfläche ermöglicht den Einsatz eines inversen Mikroskops zur Visualisierung und Analyse der Oberfläche. Standardmäßig für die Mikroskopie verwendetes Glas ist jedoch ein Isolator, so dass der Einsatz von Elektronenstrahlolithografie nur nach Beschichtung mit einer leitfähigen Schicht möglich ist. Beim Fehlen einer solchen Schicht kommt es, wie in Abbildung 7.8 zu erkennen, aufgrund von unkontrollierter Streuung der auf die Oberfläche auftreffenden Elektronen zu einer Verzerrung der Strukturen. Zur Verwendung der Technik auf transparenten Substraten unter Vermeidung von Aufladungseffekten wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Beschichtungen untersucht.

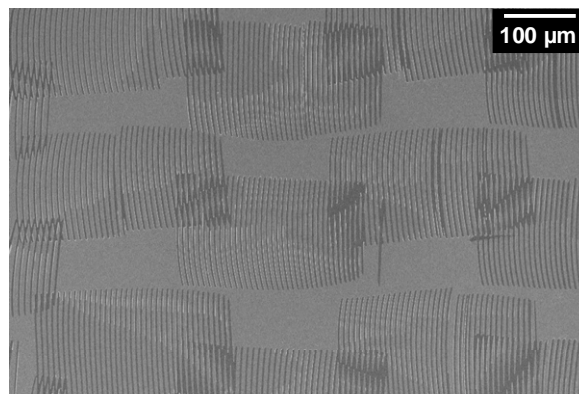


Abb. 7.8: **Aufladungseffekte auf Glas.** Aufgrund von unkontrollierter Streuung der auf die Oberfläche auftreffenden Elektronen kommt es zu einer Verzerrung der Strukturen.

Eine Variante ist die Verwendung einer aufgedampften Kohlenstoff-, Gold- oder Aluminiumschicht. Sowohl die Kohlenstoffbeschichtung der Goldnanostrukturen vor dem Aufbringen des Lacks als auch die Kohlenstoff-, Gold- oder Aluminiumbeschichtung des Lacks führen jedoch nicht zur erfolgreichen Herstellung mikronanostrukturierter Oberflächen auf Glas. Gründe hierfür sind die starke Stabilisierung der Goldnanopartikel durch Beschichtung mit Kohlenstoff sowie die Belichtung des Lacks beim Aufbringen der Schichten [260].

7.3.4 Leitfähige, transparente Oberflächen

Eine weitere Möglichkeit eine leitfähige Oberfläche zu verwenden, sind kommerziell erhältliche, mit Indiumzinnoxid (engl. indium tin oxide, ITO) beschichtete Oberflächen. Das ITO stellt eine permanente Beschichtung dar, die nicht nach der Herstellung der Mikrostruktur entfernt werden kann. Im Gegensatz zu Silizium- wie auch unbeschichteten Glas-

oberflächen, weisen ITO-Oberflächen zudem eine deutliche Oberflächenrauigkeit auf. Zusätzlich unterscheidet sich die Morphologie der Oberflächen verschiedener Anbieter. Dies beruht vermutlich auf Unterschieden im Herstellungsprozess. Abbildung 7.9 zeigt von Sigma-Aldrich bezogene Substrate im Vergleich mit solchen von SPI Supplies. Es ist deutlich zu erkennen, dass die ITO-Beschichtung der SPI Supplies-Oberflächen (Abb. 7.9 b) deutlich homogener ist. Beide Substrate konnten, wie die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 7.9 c und 7.9 d zeigen, mit Goldnanostrukturen dekoriert werden. Die hexagonale Ordnung ist jedoch in beiden Fällen aufgrund der unebenen Oberfläche geringer als auf Silizium oder Glas. Es konnten maximal Ordnungsparameter (siehe Kapitel 4.3) von 0,55 erhalten werden.

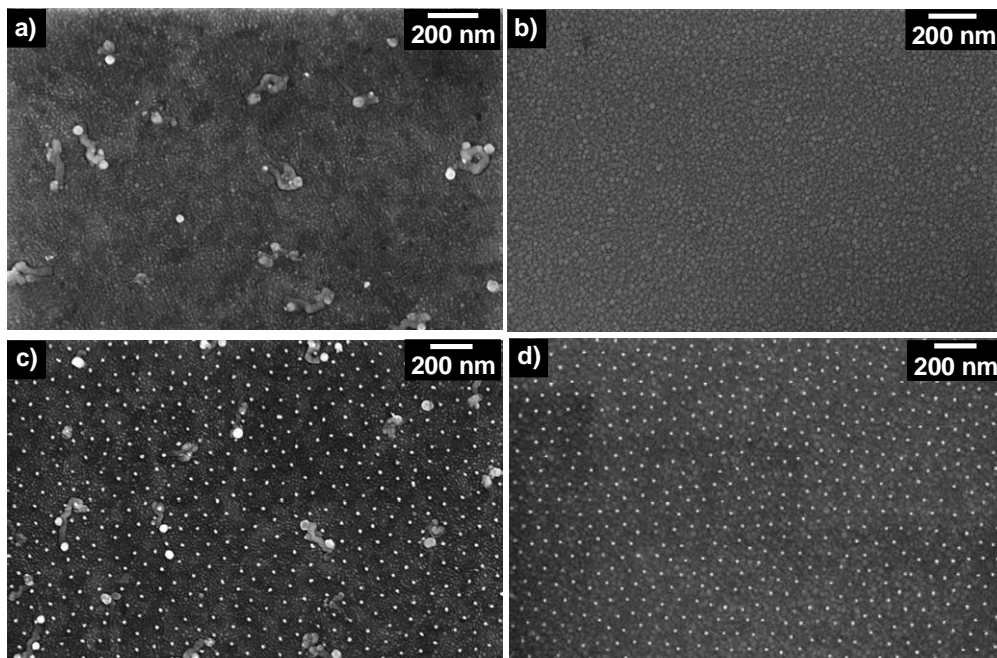


Abb. 7.9: **ITO-Oberflächen.** a) unstrukturierte ITO-beschichtete Oberfläche (Sigma-Aldrich), b) unstrukturierte ITO-beschichtete Oberfläche (SPI Supplies), c) nanostrukturierte ITO Oberfläche (Sigma-Aldrich), d) nanostrukturierte ITO Oberfläche (SPI Supplies).

Die mit ITO beschichteten Oberflächen wurden analog der oben für Silizium beschriebenen Technik mikronanostrukturiert. Unverzerrte Lackstrukturen verschiedener Geometrien wurden auf Oberflächen beider Anbieter in mit Silizium vergleichbarer Qualität erhalten. Abbildung 7.10 a zeigt auf Oberflächen des Anbieters Sigma-Aldrich hergestellte, quadratische Strukturen mit einer Kantenlänge von 500 nm in einem Abstand von 500 nm. Es wurden stabile Strukturen erzeugt, die klar definierte Kanten aufwiesen. Dies ist in Abbildung 7.10 b, die eine Vergrößerung einer der quadratischen Strukturen aus 7.10 a zeigt, gut erkennbar. Auf diesem Weg konnten reproduzierbar Strukturen mit einer Auflösung von bis zu

100 nm erhalten werden. Bei Strukturen dieser Größe kam es jedoch zu einer Abrundung an den Ecken der quadratischen Strukturen (Abb. 7.10 c). Die erzeugten Strukturen waren auch nach Entfernung der Goldpartikel stabil (Abb. 7.10 d) und nach Entfernung der schützenden Lackschicht und Reinigung im Plasma konnten die in Abbildung 7.10 e und 7.10 f gezeigten, definierten Mikronanostrukturen erhalten werden. Auf allen Oberflächen zeigten sich jedoch dunkle Veränderungen der ITO-Oberfläche an den Kanten und weniger ausgeprägt auch im inneren Bereich der Strukturen. Die Ursache hierfür konnte im Rahmen der Arbeit nicht geklärt werden.

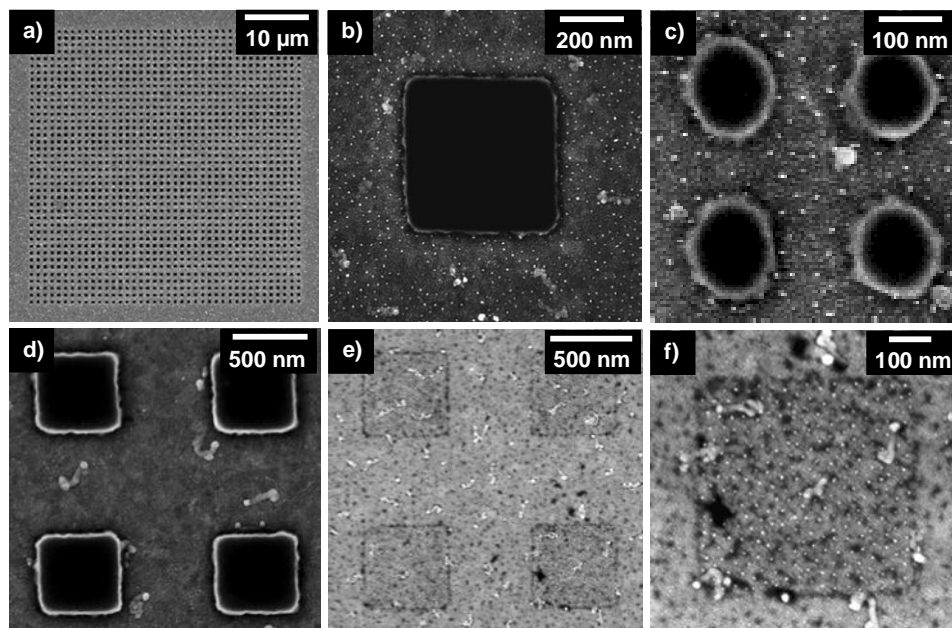


Abb. 7.10: **Mikronanostруктуриierung auf ITO-Oberflächen von Sigma-Aldrich.** a) Quadratische Lackstrukturen, b) Vergrößerung einer quadratischen Struktur aus a, c) Abrundung der Ecken bei einer Auflösung von 100 nm, d) quadratische Strukturen nach Entfernung der Goldnanopartikel, e) Mikronanostuktur, f) Vergrößerung der Mikronanostuktur aus e.

Zusätzlich zu den gezeigten quadratischen Strukturen wurden auf Oberflächen des Anbieters SPI Supplies die in Abbildung 7.11 gezeigten, linearen Strukturen hergestellt. Die linearen Strukturen sind generell sowohl gegen Entwicklung in alkalischer Lösung als auch gegen die nachfolgende Behandlung im Ultraschall weniger stabil als die oben vorgestellten, quadratischen Strukturen. Abbildung 7.11 a zeigt die Lackstrukturen nach der Entwicklung. Es konnten reproduzierbar Linienstrukturen mit definierten Kanten (siehe Abb. 7.11 b) und einer Auflösung von bis zu 500 nm bei einer Länge von 100 μm erzeugt werden. Die Strukturen waren nach der Entfernung der Goldpartikel stabil und es kam nicht zum Ausfransen der Struktur an den Kanten (siehe Abb. 7.11 c). Nach Entfernung der Lackschicht und Reinigung im Plasmagerät wurden die in Abbildung 7.11 d gezeigten Mikronano-

strukturen erhalten. Die Morphologie der ITO-Beschichtung weist jedoch im Bereich der Mikronanostruktur eine deutliche Veränderung auf. Die Ursache hierfür konnte im Rahmen der Arbeit nicht geklärt werden.

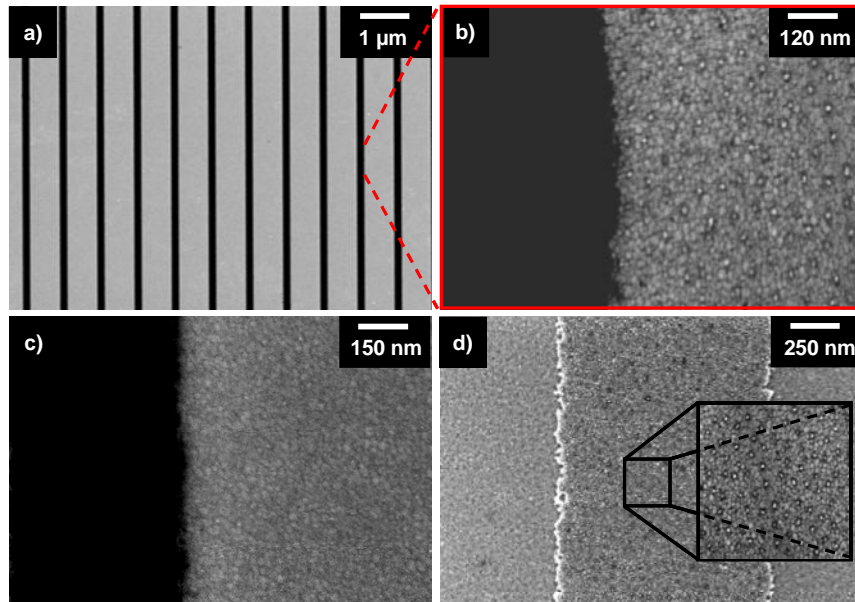


Abb. 7.11: **Mikronanostrukturierung auf ITO-Oberflächen von SPI Supplies.** a) Lineare Lackstrukturen, b) Vergrößerung im Bereich der Kante der linearen Struktur, c) Kante der Struktur nach Entfernung der Goldpartikel, d) lineare Mikronanostruktur.

Die hergestellten Strukturen auf ITO-beschichteten Oberflächen können als Templat für molekulare Fließbänder und somit zur Immobilisierung und gerichteten Polymerisation von Mikrotubuli verwendet werden. Ein Problem ist allerdings die beobachtete Veränderung der Oberfläche im Laufe des Mikronanostrukturierungsprozesses. Zusätzlich unterscheidet sich die Oberflächenchemie von der der Silizium- und Glasoberflächen. Somit ist eine temporär aufgebraute leitfähige Beschichtung, die nach der Erzeugung der Struktur entfernt werden kann, zu bevorzugen.

7.3.5 Nicht-leitfähige, transparente Oberflächen

Die Herstellung von Mikronanostrukturen auf Glasoberflächen hat im Vergleich zur Verwendung von ITO-beschichteten Substraten einige Vorteile. Zum einen ist Glas ein kostengünstiges Material, das leicht zugänglich ist und standardmäßig in Kombination mit inversen Mikroskopen verwendet wird. Zum anderen können die auf homogen mit Goldpartikeln dekorierten Oberflächen etablierten Protokolle zur Passivierung und Funktionalisierung verwendet werden.

Standardmäßig für die Mikroskopie verwendetes Glas ist jedoch ein Isolator, so dass der Einsatz von Elektronenstrahlithografie, wie in 7.4.2 gezeigt, nicht ohne Einführung einer leitfähigen Schicht möglich ist. Im Gegensatz zu permanenten Beschichtungen wie ITO bieten leitfähige Polymere die Möglichkeit diese Schicht temporär einzuführen. Es wurden verschiedene Polymerlacke getestet.

Zunächst wurde ein für die Erzeugung dünner, leitfähiger Schichten auf PMMA konzipierter, kommerziell erhältlicher Schutzlack verwendet, der zur Ableitung der bei der Elektronenbestrahlung entstehenden Aufladung dient. Dieser wurde unter den elektronensensitiven Lack aufgetragen, da er aufgrund seiner Zusammensetzung Novolak-basierte Lacke anläßt und anraut. Die nachfolgenden Schritte der Belichtung und Entwicklung wurden analog zur oben für Silizium beschriebenen Technik durchgeführt. Eine Herstellung von Mikronanstrukturen gelang unter Verwendung dieses Schutzlacks nicht. Trotz Variation verschiedener Parameter wie Beschleunigungsspannung, Elektronendosis, Verweilzeit und Schrittweite konnten nach der Entwicklung keine Lackstrukturen erhalten werden. Dies ist vermutlich durch die Löslichkeit des Schutzlacks in der alkalischen Entwicklerlösung bedingt, die zur Ablösung der quervernetzten Strukturen während der Entwicklung führt.

Des Weiteren wurde eine ebenfalls kommerziell erhältliche Dispersion von Poly(3,4-ethylendioxythiophen)-polystyrolsulfonat (PEDOT-PSS) in Wasser getestet. PEDOT-PSS ist ein Polymer, das aufgrund seiner Eigenschaft transparente, leitfähige Schichten zu bilden, zur Beschichtung von Oberflächen verwendet wird [261]. Im Bereich der Organischen Elektronik findet es als Material zur Herstellung elektronischer Bauteile wie Kondensatoren und OLEDs sowie als Elektrode in Solarzellen Anwendung [262]. PEDOT-PSS besteht aus der in Abbildung 7.12 dargestellten Mischung zweier Ionomere. Die beiden Komponenten sind Poly(3,4-ethylendioxythiophen) und Polystyrolsulfonat. Erstere liegt teilweise protoniert und teilweise anionisch vor, während Zweitere positive Ladungen trägt. Die beiden geladenen Makromoleküle bilden ein makromolekulares Salz, das als wässrige Dispersion verwendet werden kann.

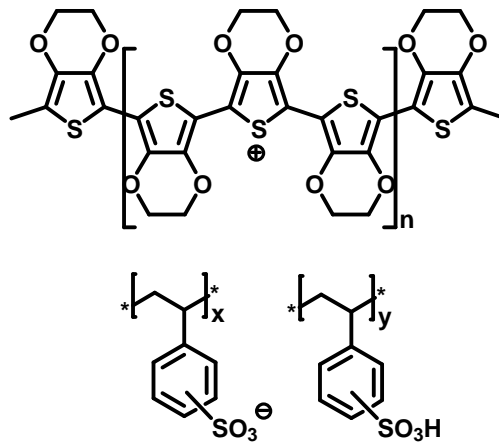


Abb. 7.12: **Strukturformel von PEDOT-PSS.** Das makromolekulare Salz besteht aus den beiden geladenen Makromolekülen Poly(3,4-ethylenedioxythiophen) und Polystyrolsulfonat.

PEDOT-PSS Schichten können auf elektronensensitive Lacke aufgebracht werden, vermeiden Aufladungseffekte und eignen sich zur Erzeugung dreidimensionaler Strukturen [263]. Aus diesen Gründen kann PEDOT-PSS zur Herstellung von Mikronanostrukturen auf Glas verwendet werden. Hierzu wurde es, wie in Abbildung 7.13 schematisch dargestellt, vor der Belichtung im Elektronenmikroskop mittels Schleuderbeschichtung auf den elektronensensitiven Lack aufgebracht. Da es sich um eine wässrige Dispersion handelt, greift diese den Lack nicht an. Des Weiteren löst sich die PEDOT-PSS Schicht während der Entwicklung ab, so dass kein zusätzlicher Schritt zu ihrer Entfernung notwendig ist. Die Entfernung der Goldnanopartikel zwischen den Strukturen sowie des Lacks im Bereich der Strukturen wird analog zum Prozess auf Siliziumoberflächen durchgeführt (siehe 7.4.2).

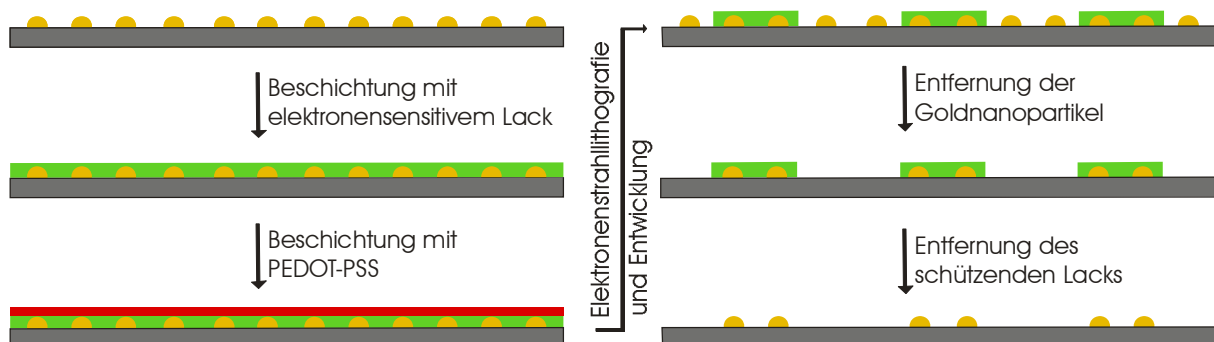


Abb. 7.13: **Elektronenstrahlithografie auf Glas.** Mit Goldpartikeln beschichtete Glasoberflächen werden mit elektronensensitivem Lack gefolgt von PEDOT-PSS beschichtet bevor sie partiell mit dem Elektronenstrahl belichtet werden. Die weiteren Schritte entsprechen dem Prozess auf Silizium.

Zur Beschichtung der Lackoberfläche mit leitfähigem PEDOT-PSS wurden Konzentrationen zwischen 0,05% und 1,3% verwendet. Die Dispersion ist als 1,3%ige Dispersion, die 0,5%

PEDOT und 0,8% PSS enthält, kommerziell erhältlich. Eine Verwendung in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,2% und 1,3% führte zu einer für die Elektronenstrahlithografie ausreichenden Leitfähigkeit. Unterhalb kam es zu Aufladungseffekten (Abb. 7.14 a). Der Vergleich der erzeugten Beschichtungen zeigte jedoch, dass bei hohen Konzentrationen eine Erhöhung der Elektronendosen und Verlängerung der Verweilzeiten notwendig ist, um den Lack ausreichend zu belichten. Dies führt zu einer längeren Belichtungszeit und somit Verlangsamung des Prozesses. Zusätzlich traten bei den hohen Konzentrationen Probleme bei der Entwicklung der Strukturen auf. Oberhalb von 0,3% wurden im Entwicklungsschritt teilweise die Lackstrukturen mit abgelöst. Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde standardmäßig eine 0,2%ige wässrige Dispersion zur Beschichtung verwendet. Sie ermöglicht ausreichende Leitfähigkeit (Abb. 7.14 b und c), verhindert einen langsamen Prozess und zeigt gute Entfernbarkeit während der Entwicklung.

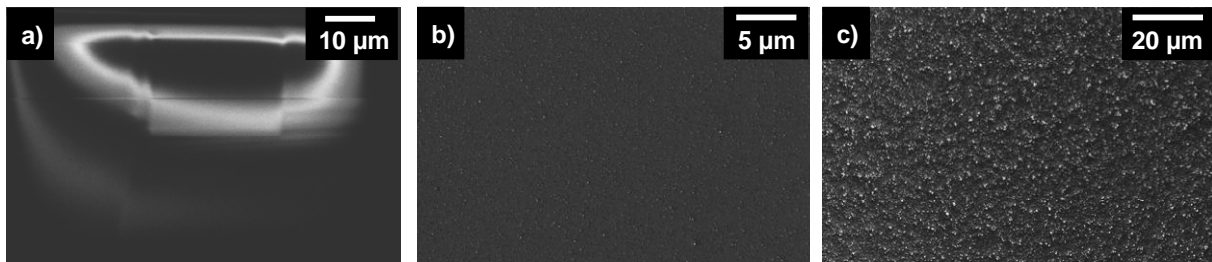


Abb. 7.14: **PEDOT-PSS Beschichtung.** a) Aufladungseffekte bei 0,05%iger Lösung, b, c) keine Aufladungseffekte bei 0,2%iger Lösung und gleichmäßige Beschichtung der Oberfläche.

Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, ist nach der Herstellung der Goldpartikel ein Tempersschritt zur Vermeidung der Ablösung der Goldnanopartikel in nachfolgenden Proteinexperimenten notwendig. Dieser wurde für homogen bedeckte Oberflächen, die in Gleitexperimenten (siehe Kapitel 6) verwendet wurden, für 24 h bei 300°C in einem Konvektionsofen durchgeführt.

Zur Herstellung der Mikronanostrukturen ist die Entfernung der Partikel zwischen den Strukturen notwendig. Diese gelingt auf den für 24 h bei 300°C getemperten Oberflächen nicht mehr. Somit musste ein Kompromiss, der ausreichende Stabilität der Partikel unterhalb der Struktur bei gleichzeitiger Entfernbarkeit der Partikel zwischen den Strukturen gewährleistet, gefunden werden. Daher wurde die Stabilität verschieden lange getempert Substrate gegenüber einer Behandlung in einer Cysteaminlösung im Ultraschallbad mit und ohne schützendem Lack miteinander verglichen. Hierzu wurden ungetemperte sowie für 30 min, 1 h, 3 h, 5 h, 10 h und 24 h bei 300°C getemperte Oberflächen untersucht. Abbildung 7.15 zeigt eine Auswahl der Ergebnisse.

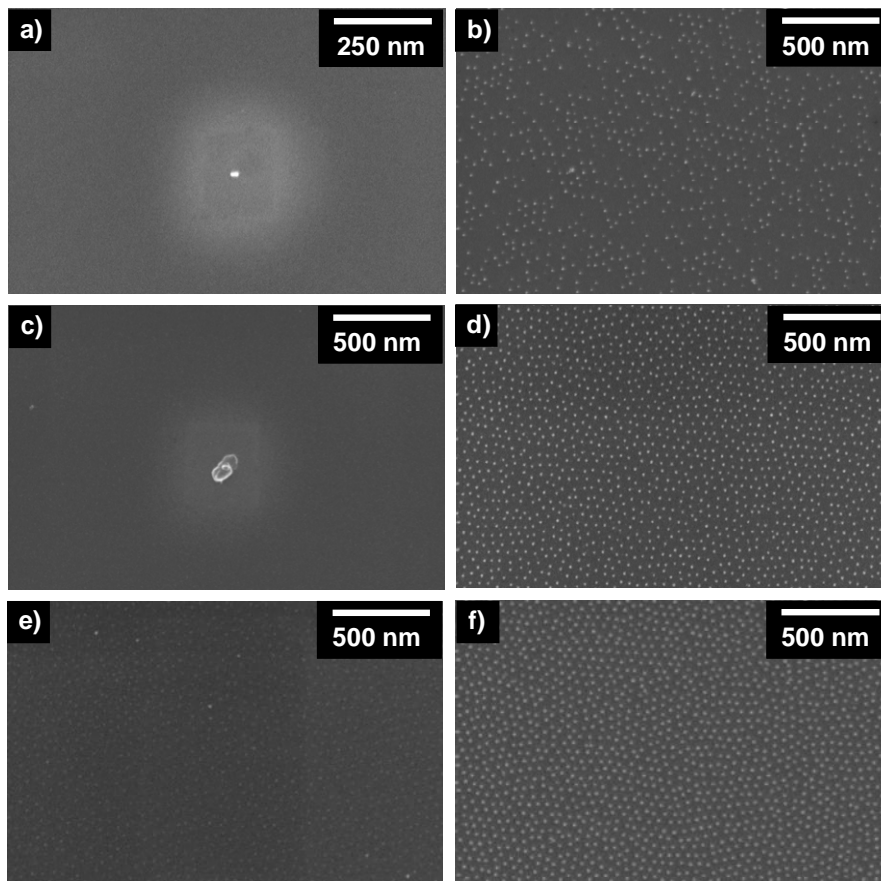


Abb. 7.15: **Stabilität der Goldnanopartikel.** a, c, e) ungetemperte, 1 h getemperte und 24 h getemperte Oberflächen nach 5 min Behandlung in Cysteaminlösung im Ultraschall, b, d, f) ungetemperte, 1 h getemperte und 24 h getemperte Oberflächen nach 15 min Behandlung in Cysteaminlösung im Ultraschall unter schützender Lackschicht.

Auf ungetemperten Oberflächen ließen sich die Partikel durch Cysteaminlösung entfernen (Abb. 7.15 a), die vom Lack geschützten Partikel waren aber ebenfalls instabil und lösten sich teilweise ab (Abb. 7.15 b). Vergleichbare Ergebnisse wurden nach 30 min bei 300°C erhalten. Eine Temperzeit von 1 h erwies sich als optimal, da sich die Partikel ohne Lack unter Standardbedingungen ablösen ließen (Abb. 7.15 c), unterhalb des Lacks jedoch ausreichende Stabilität gewährleistet war (Abb. 7.15 d). Im Fall von Proben, die 3 h oder länger getempert wurden, führte die Behandlung mit Cysteamin ohne schützenden Lack nicht reproduzierbar zur erfolgreichen Entfernung der Partikel. Auch eine Verlängerung der Behandlungszeit von 5 min auf 15 min führte nicht zum Erfolg. Abbildung 7.15 e zeigt, dass die Partikel auf einer 24 h getemperten Oberfläche nach 15 min nur teilweise gelöst wurden. Bis zu 15 min waren die Partikel unterhalb des Lacks stabil (Abb. 7.15 f). Eine weitere Verlängerung der Zeit löste auch Partikel unterhalb des schützenden Lacks. Als Ergebnis dieser Testreihe wurden Substrate nach der Behandlung im Plasma für 1 h bei

300°C im Konvektionsofen behandelt bevor sie mit dem elektronensensitiven Lack sowie PEDOT-PSS beschichtet wurden.

Die so vorbereiteten, leitfähigen Oberflächen wurden zur Herstellung linearer Mikronanstrukturen auf Glas verwendet. Abbildung 7.16 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Zwischenschritte.

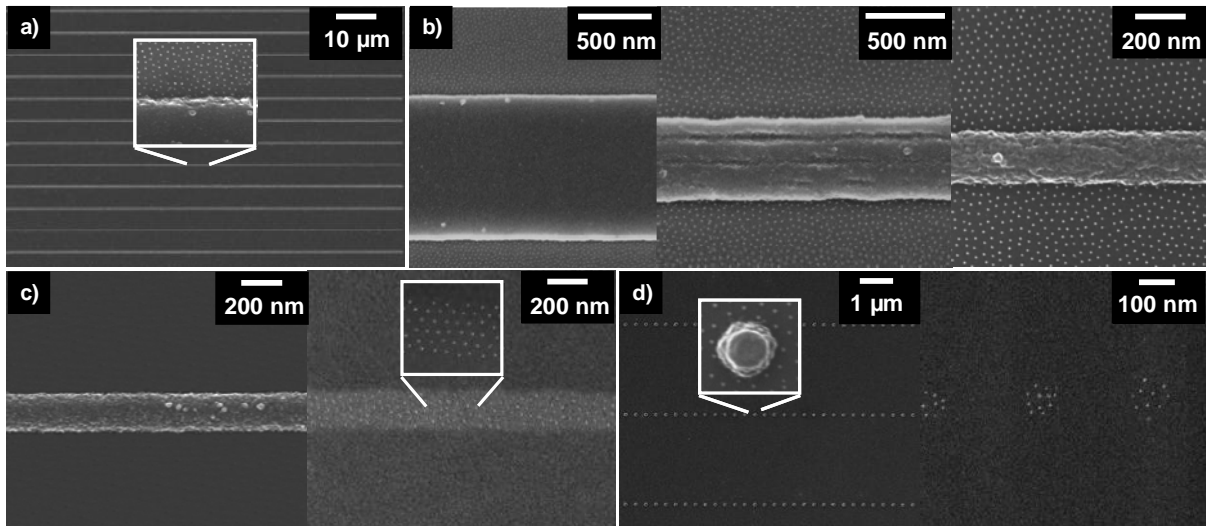


Abb. 7.16: **Elektronenstrahlithografie auf Glas.** a) Lackstrukturen mit einer Breite von 500 nm nach der Entwicklung, b) Lackstruktur mit einer Breite von 1 μm , 500 nm und 200 nm nach der Entwicklung. c) 200 nm Lackstruktur nach Entfernung der Partikel und fertige Mikronanstruktur, d) Lackstrukturen mit einem Durchmesser von 100 nm nach Entwicklung und fertige Mikronanstruktur.

Nach der partiellen Belichtung mittels des Elektronenstrahls gefolgt von der Entwicklung der Strukturen wurden lineare Strukturen verschiedenen Durchmessers erhalten. Im Vergleich mit Silizium- und ITO-Oberflächen verlängerte sich die Entwicklungszeit aufgrund der zusätzlichen PEDOT-PSS Schicht um ca. 30%. Abbildung 7.16 a zeigt exemplarisch eine Oberfläche mit 500 nm breiten Linien. Die Linienstrukturen waren stabil und wie in der Vergrößerung zu sehen wurden scharfe Kanten erzeugt. Es wurden Strukturen unterschiedlichen Durchmessers hergestellt. Abbildung 7.16 b zeigt Ausschnitte von Linienstrukturen mit einem Durchmesser von 1 μm , 500 nm und 200 nm nach der Entwicklung. Alle Strukturen lösten sich auch, wie im linken Teil von Abbildung 7.16 c am Beispiel einer 200 nm breiten Linie zu erkennen, nach der Entfernung der Goldpartikel nicht von der Oberfläche ab. Nach der Entfernung der schützenden Lackschicht wurden definierte Mikronanstrukturen (Abb. 7.16 c, rechts) erhalten. Im Fall linearer Strukturen war die Herstellung von Strukturen unter 200 nm nicht reproduzierbar möglich, da sich die Strukturen bei der Entwicklung oder Entfernung der Goldpartikel oftmals ablösten. Alternativ konnten aber, die in Abbildung 7.16

d gezeigten, unterbrochenen Linien, die aus Kreisen mit einem Durchmesser von 100 nm bestanden, erzeugt werden. Diese zeigen eine deutlich höhere Stabilität und konnten bis zur fertigen Mikronanostruktur durchprozessiert werden (7.16 d rechts).

Ziel der Mikronanostrukturherstellung ist ihre Anwendung zur polaritätsorientierten Mikrotubulianbindung und -polymerisation. Hierzu sollen die in 7.1 vorgestellten Anbindungsverfahren auf mikronanostrukturierte Oberflächen übertragen werden. Basis der beiden in 7.1 präsentierten Varianten ist die Funktionalisierung der Oberfläche mit Streptavidin bzw. NTA. Somit wurden nach Passivierung der freien Glasbereiche mit PEG2000 (siehe Kapitel 5) sowohl Streptavidin als auch NTA an aus Goldpartikeln bestehende Mikronanostrukturen angebunden und im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Hierzu wurden das in Abbildung 7.17 a dargestellte, kommerziell erhältliche Biotinthiol und FITC-Streptavidin sowie das in Abbildung 7.17 b gezeigte NTA-Thiol und His-GFP verwendet. Beide Thiole wurden kovalent an die Goldpartikel angebunden. Im zweiten Schritt konnte dann FITC-markiertes Streptavidin bzw. Histidin-funktionalisiertes GFP direkt bzw. über chelatisiertes Nickel angebunden werden (Abb. 7.17 c). His-GFP wurde verwendet, um das NTA im Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen. Um eine unspezifische Bindung der Proteine auszuschließen wurden Kontrollen ohne Biotinthiol und ohne Nickel durchgeführt.

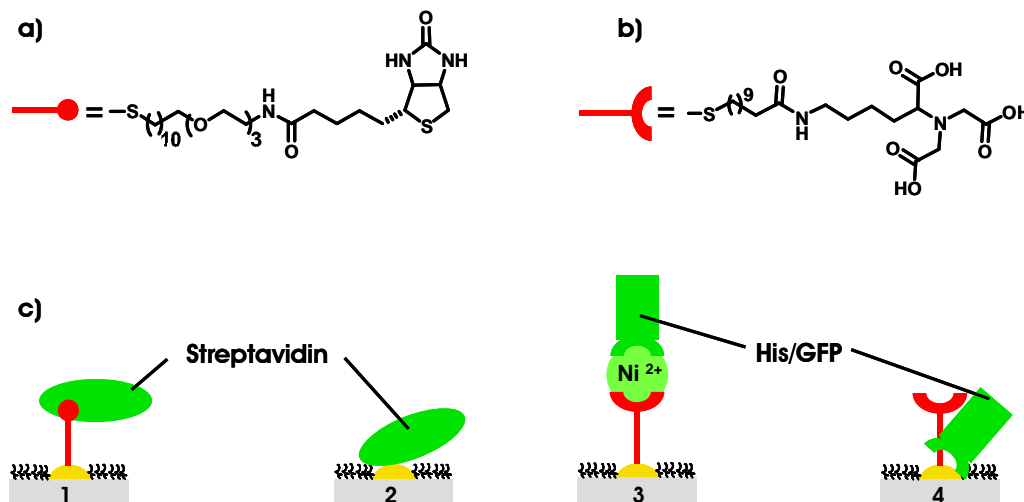


Abb. 7.17: **Schema der Proteinanbindung an Goldnanostrukturen.** a) verwendetes Biotinthiol, b) verwendetes NTA-Thiol, c) Streptavidinanbindung über Biotinthiol (1) und unspezifische Bindung ohne Biotinthiol (2) sowie His-GFP Anbindung über Nickel-NTA und unspezifische Bindung ohne Nickel.

Abbildung 7.18 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, die dem Schema aus Abbildung 7.17 entsprechen. Wird FITC-markiertes Streptavidin über Biotinthiol angebunden, sind die Linienstrukturen deutlich sichtbar (Abb. 7.18 a). Die Kontrolle ohne Biotinthiol zeigt hinge-

gen nur schwache Fluoreszenz der Linien (Abb. 7.18 b). Auch die Funktionalisierung der Goldpartikel mit NTA wurde über Anbindung des His-GFPs nachgewiesen (Abb. 7.18 c), während auf der Kontrolle ohne Nickel nur ein schwache Fluoreszenz detektiert wurde (Abb. 7.18 d).

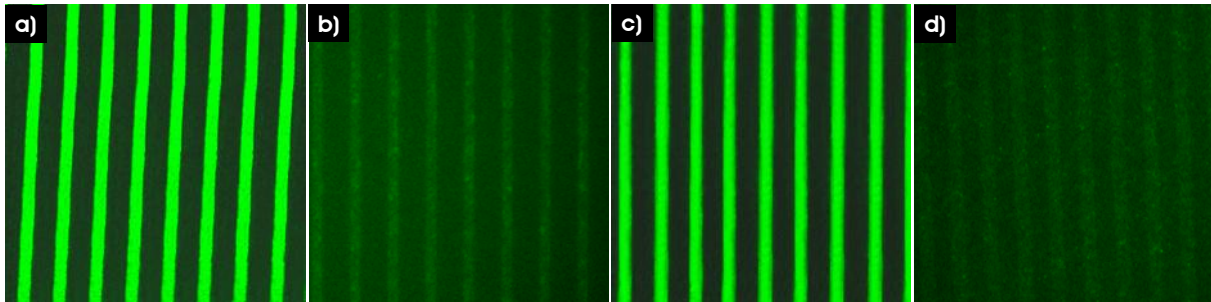


Abb. 7.18: **Nachweis der Proteinanbindung an Mikronanostrukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie.** a) über Biotinthiol an Goldpartikel angebundenes FITC-Streptavidin, b) Kontrolle ohne Biotinthiol, c) über NTA-Nickel an Goldpartikel angebundenes His-GFP, d) Kontrolle ohne Nickel.

Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit ein mikronanostrukturiertes Templat zur Anbindung verschiedener Moleküle, die der Immobilisierung von Mikrotubuli dienen, hergestellt. Im nächsten Schritt kann nun unter Verwendung einer der beiden in 7.1 vorgestellten Methoden die polaritätsorientierte Mikrotubulianbindung erfolgen. Des Weiteren kann das Substrat für gerichtete Mikrotubulipolymerisation genutzt werden. Hierzu könnten mit dem selektiven Antikörper funktionalisierte Mikrotubulikeime auf den Startpunkt von NTA-funktionalisierten Mikronanostrukturen gestempelt werden. Nach Anbindung von Motorproteinen an den Rest der funktionalisierten Struktur könnte die Polymerisation im Fluss erfolgen und polymerisierende Mikrotubuli durch die Motoren gebunden werden. Die Polymerisation der Mikrotubuli könnte dabei, wie von Riegler *et al.* gezeigt, durch Markierung der Tubulindimere mit lumineszenten Partikeln in Echtzeit verfolgt werden [264].

7.3.6 Homogene Goldstrukturen

Die gezeigten Methoden der Mikronanostrukturierung verschiedener Oberflächen dienen der Erzeugung von Templaten zur Herstellung molekularer Fließbänder. Diese Methoden beruhen auf der Kombination von BCML und Elektronenstrahlolithografie. Der gesamte Prozess besteht aus zahlreichen Schritten und ist somit relativ zeitaufwändig. Daher wurde zur Ergänzung dieses Portfolios zusätzlich eine Methode ausgearbeitet, die die schnelle Erzeugung von Mikrostrukturen aus homogenem Gold erlaubt. Hierzu wurden, wie in Abbildung 7.19 schematisch dargestellt, gereinigte Glasoberflächen zunächst mit einem

5 nm dicken Titanfilm gefolgt von einem 50 nm dicken Goldfilm im Hochvakuum beschichtet. Die Titanschicht dient als Haftvermittler. Die so vorbereiteten Proben wurden mit einem elektronensensitiven Lack beschichtet und partiell mit dem Elektronenstrahl eines Rasterelektronenmikroskops belichtet. Nach der Entwicklung der Lackstruktur wurde freiliegendes Gold durch Behandlung mit einer KI/I_2 -Ätzlösung entfernt und im letzten Schritt der schützende Lack von der Goldstruktur entfernt.

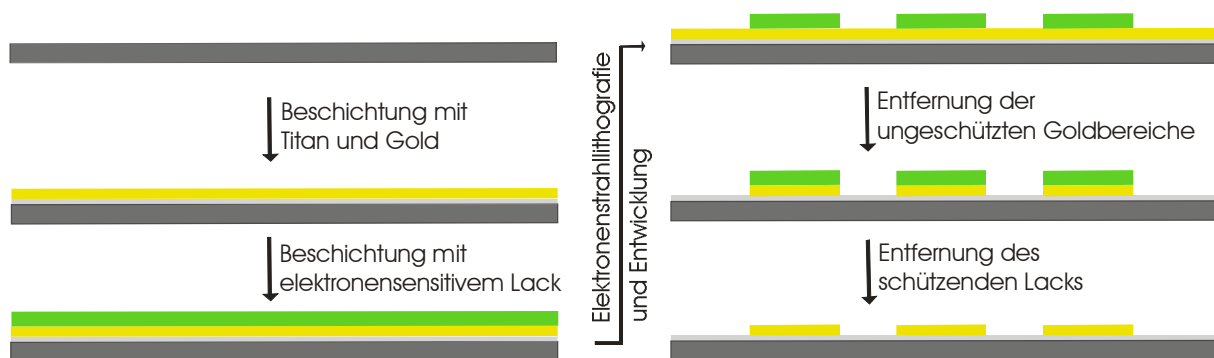


Abb. 7.19: **Prozess der Herstellung homogener Goldstrukturen.** Nach der Beschichtung einer Oberfläche mit Titan und Gold gefolgt von elektronensensitivem Lack wurde der Lack im Elektronenmikroskop partiell belichtet. Die Strukturen wurden entwickelt, dann das freiliegende Gold und im letzten Schritt der schützende Lack entfernt.

Abbildung 7.20 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mittels dieser Methode hergestellter Goldstreifen. Die Linienstrukturen haben eine Breite und einen Abstand von 500 nm sowie eine Länge von $100\ \mu\text{m}$. Die Methode ermöglicht die zuverlässige Herstellung von Strukturen mit einer Auflösung bis zu 500 nm. Wie in Abbildung 7.20 b zu sehen kam es jedoch durch die Entfernung des Golds zwischen den Strukturen zu einem starken Ausfransen an den Kanten der Strukturen. Aufgrund der Beschichtung der Glasoberfläche durch Aufdampfen im Hochvakuum zeigt der Goldstreifen zusätzlich eine gewisse Rauigkeit. Strukturen mit höherer Auflösung oder klarer definierten Kanten waren mit der verwendeten Ätzlösung nicht zugänglich. Entweder wurde das Gold in den Bereichen zwischen den Strukturen nicht vollständig entfernt oder die Struktur von der Ätzlösung stark angegriffen. Dieses Problem könnte durch die Verwendung alternativer Ätzlösungen wie beispielsweise Cyanidlösungen oder anderer kommerziell erhältlicher Ätzlösungen gelöst und somit die Auflösung und die Qualität der Strukturen erhöht werden. Trotz der genannten Probleme stellt die Methode eine wertvolle Ergänzung der Mikronanostukturierung dar, da sie schnellen Zugang zu Strukturen in gewünschter Geometrie liefert. Zusätzlich ermöglichen die homogenen Strukturen die Anbindung einer größeren Anzahl an Molekülen. Somit sind homogene Strukturen komplementär zu mikronanostrukturierten Systemen einsetzbar.

Nachteilig sind die bisher schlechtere Auflösung und die stärkere Fluoreszenzlöschung bei Untersuchung fluoreszierender Moleküle. Die resultierenden Strukturen weisen außerdem nicht den Vorteil der definierten Anbindung einzelner Proteine auf.

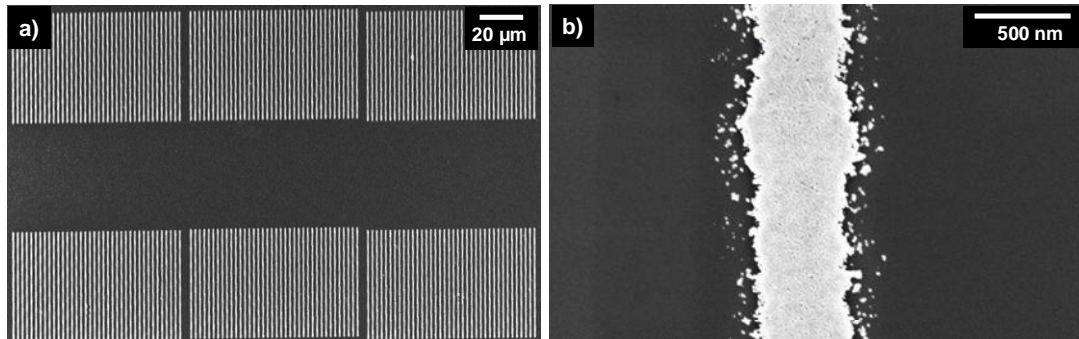


Abb. 7.20: **Homogene Goldstrukturen.** a) REM-Bild homogener Goldstreifen, b) Vergrößerung, die das Ausfransen der Struktur an den Kanten zeigt.

7.4 Material und Methoden

Alle für die Herstellung mikronanostrukturierter Oberflächen verwendeten Chemikalien waren entweder hochreine, zur Analyse geeignete, oder speziell für die Verwendung im Reinraum geeignete Chemikalien.

Mit Goldpartikeln dekorierte Oberflächen wurden, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, mittels BCML hergestellt und nach der Plasmabehandlung in saubere Plastikbehälter verpackt um Staubablagerung zu vermeiden. Die nachfolgende Beschichtung mit dem elektronensensitiven Lack sowie die Beschichtung mit PEDOT-PSS wurde unter Reinraumbedingungen mit staubgefilterter Luft, Temperatur- und Luftfeuchtigkeitskontrolle sowie unter Gelblicht durchgeführt.

Polykristalline Goldoberflächen wurden durch Beschichtung von Deckgläsern (Carl Roth, Darmstadt) mit einer ungefähr 5 nm dicken Titanschicht sowie einer 50 nm dicken Goldschicht beschichtet. Hierzu wurde der MED020 Sputter Coater (BAL-Tec AG Liechtenstein, jetzt Leica Microsystems, Wetzlar) bei 120 mA und $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar für 30 s bzw. bei 60 mA und $5 \cdot 10^{-2}$ mbar für 60 s verwendet. Die Deckgläser wurden zuvor mittels Behandlung im Ultraschall für 2 mal 5 min in einer 1:1-Mischung aus Methanol und Ethylacetat, gefolgt vom Abspülen der Oberflächen mit Methanol und Trocknung im Stickstoffstrom gereinigt.

Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden ein LEO1530 sowie ein Ultra 55 Mikroskop (beide Zeiss SMT, Oberkochen, Deutschland) verwendet. In beiden Geräten wird der Elektronenstrahl mittels eines Schottky Feldemitters erzeugt. Typische Beschleunigungsspannungen lagen zwischen 3 bis 15 kV, der Druck lag mindestens unterhalb $5 \cdot 10^{-6}$ mbar. Nicht-leitende Glasoberflächen wurden vor ihrer Untersuchung mit einer ungefähr 5 nm dicken Graphitschicht beschichtet. Hierzu wurde der MED020 Sputter Coater (BAL-Tec AG Liechtenstein, jetzt Leica Microsystems, Wetzlar) verwendet.

Mikroskopische Untersuchungen wurden mittels des Zeiss Axiovert220M (Carl Zeiss AG, Oberkochen) durchgeführt. Als Objektiv diente ein 40x/1.2 C-Apochromat Wasserimmersionsobjektiv (Carl Zeiss AG, Oberkochen).

7.4.1 Elektronenstrahlithografie auf Silizium

Zugeschnittene und nanostrukturierte Siliziumwafer (Si-Mat Silicon Materials, Landsberg am Lech) mit einer Größe von ca. 1 cm^2 wurden zunächst im Exsikkator gasförmigem Hexadimethyldisilazan (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) ausgesetzt. Dann wurden sie mit dem elektronensensitiven Lack (AR-N 7500.08, Allresist GmbH, Strausberg) bei 4000 rpm für 35 s

schleuderbeschichtet um eine Schichtdicke von 100 nm zu erzeugen und anschließend für 35 min bei 85°C im Konvektionsofen getempert. Die partielle Belichtung mittels Elektronenstrahl wurde im Anschluss unter Verwendung eines Zeiss Ultra 55 Feldemissions-Elektronenmikroskops, das mit einem Raith Elphy Plus System zur Strahlregelung ausgestattet war, durchgeführt. Die verwendete Elektronendosis betrug 100-200 $\mu\text{C cm}^{-2}$ bei einer Beschleunigungsspannung von 15 kV. Nach der Belichtung wurden die Proben für 90-110 s in einer 4:1 Mischung der empfohlenen alkalischen Entwicklerlösung (AR300-47, Allresist GmbH, Strausberg) in Wasser entwickelt. Dann wurden sie mit deionisiertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Zur Entfernung der Goldpartikel wurden die Oberflächen für 2 min mit einer 1%igen Lösung aus Cysteamin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) in deionisiertem Wasser im Ultraschall behandelt und im Anschluss mit deionisiertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die schützende Lackschicht wurde im letzten Schritt durch spülen mit Ethanol oder Aceton entfernt. Zur Reinigung von Rückständen wurden die Oberflächen für 10 min in einem isotropen Mikrowellenplasmagerät (PVA TePla AG, Wetzlar) behandelt. Hierfür wurden sowohl das TePla100-E bei einem Wasserstoffdruck von 0,4 mbar und einer Leistung von 150 W als auch das TePla PS210 System bei einem Wasserstoffdruck von 0,3 mbar und einer Leistung von 600 W verwendet.

7.4.2 Versuche der Strukturierung unter Verwendung eines leitfähigen Schutzlacks

Der sich noch im Experimentalmusterstadium befindende leitfähige Schutzlack (SX AR-PC 5000/90.I, Allresist GmbH, Strausberg) wurde bei 4000 rpm für 35 s mittels Schleuderbeschichtung auf die Oberflächen aufgebracht, um eine Schichtdicke von 50 nm zu erzeugen. Im Anschluss wurden die Oberflächen für 2 min bei 105°C auf der Heizplatte getempert und nach Abkühlen der elektronensensitive Lack (AR-N 7500.08, Allresist GmbH, Strausberg) bei 4000 rpm für 35 s aufgeschleudert. Die nachfolgenden Schritte der Belichtung und Entwicklung wurden analog zur oben für Silizium beschriebenen Technik durchgeführt.

7.4.3 Elektronenstrahlithografie auf ITO-beschichtetem Glas

ITO-beschichtete Deckgläser (30-60 Ω Widerstand, SPI Supplies[®], Westchester, USA) wurden mit dem elektronensensitiven Lack (AR-N 7500.08, Allresist GmbH, Strausberg) bei 4000 rpm für 35 s schleuderbeschichtet um eine Schichtdicke von 100 nm zu erzeugen und für 35 min bei 85°C im Konvektionsofen getempert. Die nachfolgenden Schritte der Belichtung und Entwicklung wurden analog zur oben für Silizium beschriebenen Technik durchgeführt. Zur Reinigung von Rückständen wurden die Oberflächen für 10 min in einem isotropen Mikrowellenplasmagerät (PVA TePla AG, Wetzlar) behandelt. Hierfür wurde das

TePla100-E bei einem Sauerstoffdruck von 0,4 mbar und einer Leistung von 150 W verwendet.

7.4.4 Elektronenstrahlithografie homogenen Goldoberflächen

Unter Verwendung eines Hochvakuum Beschichtungssystems (MED020 Sputter Coater, BAL-Tec AG Liechtenstein, jetzt Leica Microsystems, Wetzlar) wurde zunächst ein 5 nm dicker Titanfilm ($1,3 \cdot 10^{-2}$ mbar Argondruck, 120 mA, 30 s) gefolgt von einem 50 nm dicken Goldfilm ($5 \cdot 10^{-2}$ mbar Argondruck, 60 mA, 60 s) auf gereinigte Glasoberflächen (Carl Roth & Co GmbH, Karlsruhe) aufgebracht. Dann wurden sie mit dem elektronensensitiven Lack (AR-N 7500.08, Allresist GmbH, Strausberg) bei 4000 rpm für 35 s schleuderbeschichtet um eine Schichtdicke von 100 nm zu erzielen und anschließend für 35 min bei 85°C im Konvektionsofen getempert. Die partielle Belichtung mittels Elektronenstrahl erfolgte analog dem oben für Silizium beschriebenen Prozess. Nach der Belichtung wurden die Proben für 60 s in einer 4:1 Mischung der empfohlenen alkalischen Entwicklerlösung (AR300-47, Allresist GmbH, Strausberg) in Wasser entwickelt. Dann wurden sie mit deionisiertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Zur Entfernung des Golds zwischen den Strukturen wurden die Oberflächen für 40 s in einer aus 1 g KI plus 4 g I_2 in 80 ml Wasser bestehenden KI/I_2 -Ätzlösung behandelt. Im Anschluss wurden sie mit deionisiertem Wasser gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und die schützende Lackschicht im letzten Schritt durch Abspülen mit Ethanol oder Aceton entfernt. Zur Reinigung von Rückständen wurden die Oberflächen für 10 min in einem isotropen Mikrowellenplasmagerät (PVA TePla AG, Wettenberg) behandelt. Hierfür wurde das TePla100-E bei einem Wasserstoffdruck von 0,4 mbar und einer Leistung von 150 W verwendet.

7.4.5 Elektronenstrahlithografie auf Glas

Nanostrukturierte Deckgläser (Carl Roth & Co GmbH, Karlsruhe) wurden nach ihrer Herstellung zunächst 1 h bei 300°C getempert. Die folgende Schleuderbeschichtung mit dem elektronensensitiven Lack (AR-N 7500.08, Allresist GmbH, Strausberg) bei 4000 rpm für 35 s erzeugte einen 100 nm dicken Lackfilm, der für 35 min bei 85°C im Konvektionsofen getempert wurde. Nachfolgend wurde eine 0,2%ige wässrige PEDOT-PSS Dispersion (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) durch Schleuderbeschichtung bei 5000 rpm für 35 s aufgetragen. Die partielle Belichtung mittels Elektronenstrahl wurde im Anschluss unter Verwendung eines Zeiss Ultra 55 Feldemissions-Elektronenmikroskops, das mit einem Raith Elphy Plus System zur Strahlregelung ausgestattet war, durchgeführt. Die verwendete Elektronendosis betrug $200\text{-}300 \mu\text{C cm}^{-2}$ bei einer Beschleunigungsspannung von 15-20 kV. Nach der Belichtung wurden die Proben für 90-150 s in einer 4:1 Mischung der empfohlenen alkalischen

Entwicklerlösung (AR300-47, Allresist GmbH, Strausberg) in Wasser entwickelt. Dann wurden sie mit deionisiertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Zur Entfernung der Goldpartikel wurden die Oberflächen für 5 min in einer 1%igen Lösung aus Cysteamin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) in deionisiertem Wasser im Ultraschall behandelt und im Anschluss mit deionisiertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die schützende Lackschicht wurde im letzten Schritt durch Abspülen mit Ethanol oder Aceton entfernt. Zur Reinigung von Rückständen wurden die Oberflächen für 10 min in einem isotropen Mikrowellenplasmagerät (PVA TePla AG, Wettenberg) behandelt. Hierfür wurde das TePla PS210 System bei einem Wasserstoffdruck von 0,3 mbar und einer Leistung von 600 W verwendet.

7.4.6 Funktionalisierung der Mikronanostrukturen mit Biotin und FITC-Streptavidin

Vor der Funktionalisierung der Mikronanostruktur wurden mikronanostrukturierte Glasoberflächen, wie in Kapitel 5.3 beschrieben, mit PEG2000 passiviert. Zur kovalenten Anbindung des Biotinthiols wurden sie im Anschluss für 1 h in einer 1 mM Lösung des Biotinthiols (Pro Chimia, Polen) in PBS inkubiert. Anschließend wurden sie mit PBS gespült, 2 min im Ultraschall behandelt, wiederum mit PBS gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die nachfolgende Anbindung des FITC-markierten Streptavidins (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) erfolgte mittels Inkubation in einer 2 mM Lösung des Proteins in PBS für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Spülen der Oberflächen mit PBS und dreimaligem Waschen für 5 min wurden sie im Mikroskop untersucht. Die Kontrolloberflächen wurden bis auf das Fehlen des Biotinthiols in der Inkubationslösung ebenso behandelt.

7.4.7 Funktionalisierung der Mikronanostrukturen mit NTA und His-GFP

Nach der in Kapitel 5.3 beschriebenen Passivierung der Glasbereiche zwischen den Goldpartikeln wurden die Oberflächen unter Stickstoffatmosphäre für 5 h in einer 0,5 mM Lösung des Aktivesters in DMF bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit DMF gespült, 2 min im Ultraschall behandelt, wiederum mit DMF und darauf mit Methanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die getrockneten Oberflächen wurden erneut unter Stickstoffatmosphäre für 5 h in einer 0,2 mM Lösung des N_α, N_α -Bis(carboxymethyl)-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) in DMF und Gegenwart von 2,5 μ M Triethylamin (Fluka, Neu-Ulm) bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden sie mit DMF gespült, 2 min im Ultraschall behandelt und dreimal 30 min in DMF gewaschen. Nach Spülen der Oberflächen mit DMF gefolgt von Methanol wurden sie im Stickstoffstrom getrocknet. Zur Beladung des Chelators wurden die Oberflächen zunächst in PBS, das zusätzliche 200 mM NaCl enthielt (PBS200) bei Raumtemperatur equilibriert. Nach der Equilibrierung wurden sie

in einer 100 mM NiCl₂-Lösung in PBS200 für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, im Anschluss gespült und dreimal für 10 min mit PBS200 gewaschen. Die nachfolgende Anbindung des His-GFP (Cellsciences, Canton, USA) erfolgte durch Inkubation einer Lösung des fluoreszierenden Proteins (10 µg ml⁻¹) in PBS für 30 min bei Raumtemperatur. Nach Spülen der Oberflächen mit PBS und dreimaligem Waschen für 5 min wurden sie im Mikroskop untersucht. Die Kontrolloberflächen wurden bis auf das Fehlen des Nickels in der Inkubationslösung zur Beladung des NTA ebenso behandelt.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit befasst sich zum einen mit der Entwicklung eines Gleitexperiments zur Untersuchung von Motorproteinen, zum anderen mit der Entwicklung eines Templates zur polaritätsorientierten Anbindung und gerichteten Polymerisation von Filamenten auf der Oberfläche. Das Gleitexperiment dient der Untersuchung der Funktion von Motorproteinen und ihrer Wechselwirkung mit anderen Proteinen und Chemikalien. Zusätzlich kann mittels eines neuartigen Funktionalitätsnachweises die Aktivität einzelner Motorproteine unter den im Gleitexperiment verwendeten Bedingungen überprüft werden. Das Template zur Anbindung und Polymerisation von Filamenten dient der Erzeugung so genannter molekularer Fließbänder, die ein nanotechnologisches System zum gerichteten Transport auf Basis von Motorproteinen darstellen.

8.1 Nanostrukturierte Goldpartikeloberflächen

Basis dieser Arbeit sind mit Goldnanopartikeln in hexagonaler Ordnung strukturierte Oberflächen, deren Partikelabstände über einen weiten Bereich kontrollierbar sind. Diese wurden mittels Blockcopolymer Mizellarer Lithografie (BCML) hergestellt. Die literaturbekannte Methode der BCML beruht auf der Verwendung amphiphiler Diblockcopolymerer. In unpolaren Lösungsmitteln kommt es unter geeigneten Bedingungen zur Selbstorganisation dieser Polymere zu inversen Mizellen [152], die nach Komplexierung eines Goldsalzes im hydrophilen Kern zur Dekoration von Oberflächen mit hexagonal angeordneten Mizellen verwendet werden können [159]. Das strukturgebende Polymer kann im Anschluss durch Behandlung der Oberfläche in einem Plasmasystem oxidiert und damit vollständig entfernt werden ohne die zuvor erzielte hexagonale Ordnung zu zerstören. Die Plasmabehandlung führt auch zur Reduktion des Metallsalzes und es entstehen definierte, stabile Partikel auf der Oberfläche [17].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Parameter für die Verwendung des TePla PS210 Plasmasystems zur Erzeugung von Goldnanopartikeln auf Oberflächen optimiert. Hierzu wurden Wasserstoffdrücke von 0,3 sowie 0,5 und 1 mbar und Leistungen von 300 und 600 W

verwendet und die Stabilität der resultierenden Partikel auf der Oberfläche verglichen. Alle getesteten Kombinationen führten nicht zur Herstellung ausreichend stabiler Partikel. Bei einem Wasserstoffdruck von 0,3 mbar und einer Leistung von 600 W lösten sich prozentual die wenigsten Partikel ab. Durch eine auf den Plasmaschritt folgende Behandlung für 24 h bei 300 °C in einem Konvektionsofen konnte eine ausreichende Stabilität der Partikel auf der Oberfläche erzielt werden. Eine Verkürzung der Temperzeit in Kombination mit der Verwendung eines Konvektionsofens bei 500 °C führte nicht zum Erfolg. Unter diesen Bedingungen wurde die hexagonale Ordnung zerstört.

Somit wurden für das TePla PS210 System 0,3 mbar und 600 W als die Parameter ermittelt, unter deren Verwendung die stabilsten Goldnanopartikel erzeugt werden können. Die so behandelten Proben wurden im Anschluss für 24 h bei 300 °C im Konvektionsofen getempert um eine Ablösung der Partikel in nachfolgenden Experimenten zu vermeiden. Es wurden Goldpartikel in Abständen von $45 \text{ nm} \pm 7 \text{ nm}$, $85 \text{ nm} \pm 12 \text{ nm}$, $150 \text{ nm} \pm 23 \text{ nm}$ und $230 \text{ nm} \pm 46 \text{ nm}$ hergestellt und verschiedene Oberflächen beschichtet. Die Verwendung von Glas und Silizium führte zu bezüglich der Monodispersität der Partikel wie auch des Ordnungsparameters vergleichbaren Oberflächen. Im Gegensatz dazu zeigten ITO-Oberflächen eine höhere Rauigkeit sowie eine schlechtere hexagonale Ordnung. Hier konnten im Gegensatz zu den auf Silizium und Glas erzielten Ordnungsparametern zwischen 0,56 und 0,75 nur maximal Werte von 0,55 erzielt werden.

8.2 Passivierung und Funktionalisierung

Um die Oberflächen für die Untersuchung und Anwendung von Motorproteinen verwenden zu können, müssen die Bereiche zwischen den Goldnanopartikeln gegen unspezifische Proteinadsorption passiviert werden. Hierzu wurde ein literaturbekanntes Polyethylenglykol verwendet [181]. Die Passivierung der freien Oberfläche ermöglicht die selektive Funktionalisierung der Goldstrukturen im darauf folgenden Schritt, die ihrerseits der gerichteten Proteinanbindung dient. Es wurden drei Moleküle zur Goldpartikelfunktionalisierung verwendet: 1) Nitrilotriacetat (NTA), das die Anbindung von Proteinen über Chelatisierung ermöglicht [189], 2) Coenzym A, das durch Nutzung der enzymatischen Aktivität einer Phosphopantetheinyltransferase zur kovalenten Proteinanbindung geeignet ist [206] und 3) Biotin, das durch die spezifische Wechselwirkung mit dem tetrameren Protein Streptavidin zur Anbindung biotinylierter Proteine verwendet werden kann [187].

Der Chelator Nitrilotriacetat wurde zur orientierten Anbindung von Motorproteinen auf den Goldnanopartikeln über eine rekombinant ins Protein eingeführte Histidinsequenz verwen-

det. Dies stellt die freie Zugänglichkeit der Motordomänen sicher, die Voraussetzung für ihre Aktivität ist.

Die Anbindung des NTAs auf den Goldnanopartikeln wurde ausgehend vom Aktivester der 11-Mercaptoundecansäure in zwei Schritten durchgeführt. Die erfolgreiche Funktionalisierung wurde im Röntgenphotoelektronenmikroskop überprüft. Das an die Oberfläche angebundene NTA wurde im Anschluss mit Nickelionen beladen und die Motorproteine über eine rekombinant eingeführte Histidinfunktionalisierung angebunden. Der Nachweis der erfolgreichen Anbindung über diese Chelatoren gelang durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen.

Ein Alternativkonzept zur Anbindung über NTA und Nickelionen ist die kovalente Anbindung von Proteinen unter Ausnutzung der enzymatischen Aktivität einer Phosphopantetheinyltransferase (PPTase). Dieses Konzept ermöglicht die sehr stabile Anbindung von Proteinen in gewünschter Orientierung. Die PPTase überträgt hierzu die Phosphopantetheinylgruppe von Coenzym A (CoA) auf einen spezifischen Serinrest innerhalb einer ins Protein eingeführten Sequenz (ybbR-Sequenz) [206].

Um dieses Konzept zu untersuchen wurde mit einer N-terminalen ybbR-Sequenz funktionalisierte Leuchtkäfer-Luciferase mit Hilfe der PPTase an auf Goldoberflächen immobilisiertes CoA gekoppelt. Die Anbindung des Coenzym A auf der Goldoberfläche wurde mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie nachgewiesen. Des Weiteren wurde zudem mit Hilfe der Schwingquarzmikrowaage (QCM) auch die nachfolgende Übertragung der Phosphopantetheinylgruppe des CoA auf ybbR-Luciferase durch die PPTase gezeigt. Die Anwendbarkeit dieser Methode zur Proteinanbindung auf Gold wurde somit im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen.

Die Strategien der Immobilisierung von Proteinen mittels Chelatisierung oder Nutzung enzymatischer PPTase-Aktivität ergänzen sich. Die Chelatisierung weist den Vorteil der Reversibilität auf, so dass die Oberflächen mehrfach verwendet werden können. Die enzymatische Anbindung knüpft eine kovalente Bindung und ist somit deutlich stabiler. Somit ist sie besser für Langzeituntersuchungen geeignet. Der für die Immobilisierung notwendige experimentelle Aufwand ist vergleichbar. Allerdings ist die Einführung der Histidinsequenz deutlich etablierter als die Einführung der ybbR-Sequenz und sie kann auch zur Aufreinigung verwendet werden. Daher muss im Einzelfall entschieden werden, welche Methode verwendet wird.

Auch Biotin wurde zur Funktionalisierung von Goldnanopartikeln verwendet. Die Wechselwirkung des tetrameren Proteins Streptavidin mit dem organischen Molekül Biotin ist aufgrund ihrer annähernden Irreversibilität und hohen Spezifität das am häufigsten eingesetzte binäre Affinitätssystem zur Proteinanbindung auf Oberflächen [187]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Biotinthiol an Mikronanostrukturen angebunden und zur spezifischen Immobilisierung von Streptavidin genutzt. Die erfolgreiche Funktionalisierung mit Biotinthiol wurde im Röntgenphotoelektronenmikroskop überprüft. Im Anschluss wurde die Anbindung fluoreszenzmarkierten Streptavidins im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Die so funktionalisierten Mikronanostrukturen dienen als Templat molekularer Fließbänder zur polaritätsorientierten Anbindung und Polymerisation von Mikrotubuli.

8.3 Motilität und Funktionalität molekularer Motoren

Das Verständnis der Funktion molekularer Motoren stellt die Basis dar um sie in der Nanotechnologie zu verwenden sowie Krankheiten, die auf defekten Motorproteinen beruhen, zu verstehen und zu behandeln. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Methoden zur Untersuchung der Motilität und Funktionalität molekularer Motoren ausgearbeitet, die es erlauben diese unter hochdefinierten Bedingungen zu untersuchen. Die beiden ausgearbeiteten, als Gleitexperiment und Funktionalitätsnachweis bezeichneten Methoden beruhen auf der Verwendung Goldnanopartikel-beschichteter Oberflächen.

Für die Untersuchung Histidin-funktionalisierter Motorproteine exemplarische Gleitexperimente wurden unter Verwendung des gut erforschten prozessiven Kinesin-1 [217] durchgeführt. Hierzu wurde das sehr kurze, dimere Drosophilakinesin dk401, eingesetzt. Das Motorprotein wurde über eine Histidinsequenz an NTA-Nickel-funktionalisierte Goldnanopartikel angebunden. Zugegebene Mikrotubuli wurden dann in ATP-Anwesenheit durch die immobilisierten Kinesine transportiert. Die Bewegung der Mikrotubuli wurde im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Aus den Aufnahmen konnte die Geschwindigkeit transportierter Mikrotubuli auf Goldpartikelabständen zwischen 45 und 230 nm ermittelt werden. Wie in der Literatur für die verwendeten kurzen Konstrukte beschrieben [236], stieg die Geschwindigkeit mit abnehmender Dichte des Kinesins auf der Oberfläche an. Es wurden Abstände von 45 nm, 85 nm, 150 nm und 230 nm verwendet und die ermittelten durchschnittlichen Geschwindigkeiten betragen $0,51 \pm 0,02 \mu\text{m s}^{-1}$, $0,53 \pm 0,02 \mu\text{m s}^{-1}$, $0,55 \pm 0,03 \mu\text{m s}^{-1}$ und $0,62 \pm 0,05 \mu\text{m s}^{-1}$. Die beobachtete Dichteabhängigkeit der Geschwindigkeit beruht darauf, dass prozessive Motorproteine im Verbund nicht synchron zusammenarbeiten. Aufgrund dieses statistischen Verhaltens tritt bei hohen Dichten ein Bremsseffekt auf, da jeder Motor der gerade nicht aktiv am Transport beteiligt ist, eine zusätzliche Last für die aktiven molekularen

Motoren darstellt [236]. Da die ermittelten Daten in Übereinstimmung mit den in der Literatur bekannten Daten stehen, liefert das entwickelte, optimierte Gleitexperiment zuverlässige Daten und kann in Zukunft für die Untersuchung der Eigenschaften und Wechselwirkungen Histidin-funktionalisierter molekularer Motoren genutzt werden. Im Gegensatz zu bisher bekannten Systemen handelt es sich um ein hochdefiniertes System, das sowohl die Immobilisierung einzelner Motorproteine auf den Goldpartikeln ermöglicht, als auch den Verlust ihrer Aktivität durch unspezifische Anbindung verhindert.

Um die Aktivität der Motorproteine unter den im Gleitexperiment gewählten Bedingungen auf molekularer Ebene zu überprüfen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein als Funktionalitätsnachweis bezeichnetes Experiment entwickelt. Hierzu wurden kolloidale Goldnanopartikel über biotinyliertes Tubulin an die Motorproteine angebunden und ihre Freisetzung in ATP-Gegenwart im Rasterelektronenmikroskop kontrolliert. Die Kombination dieses Nachweises mit dem Gleitexperiment ermöglicht die zuverlässige *in vitro* Untersuchung des Verhaltens von Motorproteinen unter Sicherstellung des Erhalts ihrer Aktivität.

8.4 Mikronanostrukturen als Template molekularer Fließbänder

Molekulare Motoren zählen *in vivo* zu den Hauptbestandteilen molekularer Transportsysteme [214,246]. Dies prädestiniert sie für eine Verwendung zum Aufbau effizienter Nanotransportsysteme, die unter anderem in der medizinischen Analytik genutzt werden könnten.

Für diese nanotechnologische Anwendung wurden im Rahmen dieser Arbeit Template, auf denen Mikrotubuli polaritätsorientiert angebunden oder polymerisiert werden können, hergestellt. Diese als molekulare Fließbänder bezeichneten orientierten Mikrotubuli sollen *in vitro* gerichteten Transport mittels Motorproteinen ermöglichen.

Bei den hergestellten Templaten handelt es sich um Oberflächen auf denen nanostrukturierte Bereiche in der Dimension einiger Mikrometer bis einiger hundert Nanometer von unstrukturierten Bereichen umgeben sind. Diese als Mikronanostrukturen bezeichneten Strukturen wurden mittels einer Kombination aus Blockcopolymer Mizellarer Lithografie und Elektronenstrahlithografie hergestellt. Der für nicht transparente Siliziumoberflächen etablierte Prozess wurde auf transparente Indiumzinnoxid- und Glasoberflächen übertragen um eine einfache mikroskopische Beobachtung des Systems zu ermöglichen. Durch Funktionalisierung der hierarchisch strukturierten Goldnanopartikel mit NTA und Streptavidin stellen die hergestellten Oberflächen Template zur Erzeugung molekularer Fließbänder dar.

Im nächsten Schritt kann nun die polaritätsorientierte Mikrotubulianbindung über Motorproteine an diese Strukturen erfolgen [254]. Des Weiteren kann das Substrat für gerichtete Mikrotubulipolymerisation genutzt werden. Hierzu könnten Mikrotubulikeime selektiv über ihr minus-Ende an die Startpunkte der erzeugten Strukturen angebunden werden [255], so Mikrotubuli entlang der Strukturen polymerisieren. Die Polymerisation könnte dabei, wie von Riegler *et al.* gezeigt, durch Markierung der Tubulindimere mit lumineszenten Partikeln in Echtzeit verfolgt werden [255]. Mögliche Anwendungen der molekularen Fließbänder sind Wirkstoffsuche, Proteinanalyse und medizinische Diagnostik [19,20].

9. Literaturverzeichnis

- [1] R.P. Feynman, "There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to enter a new Field of Physics," *Eng. Sci.*, vol. 23, 1960, pp. 140-143.
- [2] P. Avouris, "Molecular Electronics with Carbon Nanotubes," *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, 2002, pp. 1026-1034.
- [3] L. Peng, Z.L. Zhang, Z.Q. Xue, Q.D. Wu, Z.N. Gu, and D.G. Pettifor, "Stability of Carbon Nanotubes : How Small Can They Be?," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 85, 2000, pp. 3249-3252.
- [4] D.S. Fryer, R.D. Peters, E.J. Kim, J.E. Tomaszewski, J.J. Pablo, P.F. Nealey, C.C. White, and W. Wu, "Dependence of the Glass Transition Temperature of Polymer Films on Interfacial Energy and Thickness," *Macromolecules*, vol. 34, 2001, pp. 5627-5634.
- [5] L. Singh, P.J. Ludovice, and C.L. Henderson, "Influence of molecular weight and film thickness on the glass transition temperature and coefficient of thermal expansion of supported ultrathin polymer films," *Thin Solid Films*, vol. 449, 2004, pp. 231-241.
- [6] A. Marmur, "The Lotus Effect: Superhydrophobicity and Metastability," *Langmuir*, vol. 20, 2004, pp. 3517-3519.
- [7] T. Lohmüller, M. Helgert, M. Sundermann, R. Brunner, and J.P. Spatz, "Biomimetic Interfaces for High-Performance Optics in the Deep-UV Light Range 2008," *Nano Letters*, vol. 8, 2008, pp. 1429-1433.
- [8] M. Caldorera-Moore and N.A. Peppas, "Micro- and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems," *Adv. Drug Del. Rev.*, vol. 61, 2009, pp. 1391-1401.
- [9] M. Schliwa and G. Woehlke, "Molecular motors," *Nature*, vol. 422, 2003, pp. 759-765.
- [10] S. Sack, F.J. Kull, and E. Mandelkow, "Motor proteins of the kinesin family," *Eur. J. Biochem.*, vol. 262, 1999, pp. 1-11.
- [11] M.T. Valentine, P.M. Fordyce, T.C. Krzysiak, S.P. Gilbert, and S.M. Block, "Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro," *Nat. Cell Biol*, vol. 8, 2006, pp. 470-476.

-
- [12] R.D. Vale and R.A. Milligan, "The Way Things Move: Looking Under the Hood of Molecular Motor Proteins," *Science*, vol. 288, 2000, pp. 88-95.
- [13] J. Howard, A.J. Hudspeth, and R.D. Vale, "Movement of microtubules by single kinesin molecules," *Nature*, vol. 342, 1989, pp. 154-158.
- [14] S.J. Kron and J.A. Spudich, "Fluorescent actin filaments move on myosin fixed to a glass surface," *PNAS*, vol. 83, 1986, pp. 6272-6276.
- [15] M. Mazumdar, A. Mikami, M.A. Gee, and R.D. Vale, "In vitro motility from recombinant dynein heavy chain," *PNAS*, vol. 93, 1996, pp. 6552-6556.
- [16] R. Glass, M. Möller, and J.P. Spatz, "Block copolymer micelle nanolithography," *Nanotechnology*, 2003, pp. 1153-1160.
- [17] J.P. Spatz, S. Mößmer, C. Hartmann, M. Möller, T. Herzog, M. Krieger, H. Boyen, P. Ziemann, and B. Kabius, "Ordered Deposition of Inorganic Clusters from Micellar Block Copolymer Films," *Langmuir*, 2000, pp. 407-415.
- [18] D. Aydin, M. Schwieder, I. Louban, S. Knoppe, J. Ulmer, T.L. Haas, H. Walczak, and J.P. Spatz, "Micro-Nanostructured Protein Arrays: A Tool for Geometrically Controlled Ligand Presentation," *Small*, vol. 5, 2009, pp. 1014-1018.
- [19] G. Walter, K. Büssow, A. Lueking, and J. Glökler, "High-throughput protein arrays: prospects for molecular diagnostics," *Trends Mol. Med.*, vol. 8, 2002, pp. 250-253.
- [20] M.J. Schulz, V.N. Shanov, and Y. Yun, *Nanomedicine Design of Particles, Sensors, Motors, Implants, Robots, and Devices*, Artech House Inc., 2009.
- [21] J.V. Barth, G. Costantini, and K. Kern, "Engineering atomic and molecular nanostructures at surfaces," *Nature*, vol. 437, 2005, pp. 671-679.
- [22] B.D. Gates, Q. Xu, M. Stewart, D. Ryan, C.G. Willson, and G.M. Whitesides, "New Approaches to Nanofabrication: Molding, Printing, and Other Techniques," *Chem. Rev.*, vol. 105, 2005, pp. 1171-1196.
- [23] A.E. Grigorescu and C.W. Hagen, "Resists for sub-20-nm electron beam lithography with a focus on HSQ: state of the art," *Nanotechnology*, vol. 20, 2009, p. 292001.
- [24] D.M. Tennant, "Limits of Conventional Lithography," *Nanotechnology*, G. Timp, New York: AIP-Press, 1999.
- [25] G. Wiederrecht, *Handbook of Nanofabrication*, Amsterdam: Elsevier, 2010.
- [26] U. Hilleringmann, *Silizium-Halbleiter-Technologie*, Wiesbaden: Vieweg-Teubner, 2008.
- [27] A.N. Broers, A.C. Hoole, and J.M. Ryan, "Electron beam lithography - Resolution limits," *Microelectronic Engineering*, vol. 32, 1996, pp. 131-142.
- [28] K.W. Lee, S.M. Yoon, S.C. Lee, W. Lee, I.M. Kim, C.E. Lee, and D.H. Kim, "Secondary Electron Generation in Electron-beam-irradiated Solids: Resolution Limits to Nanolithography," *J. Kor. Phys. Soc.*, vol. 55, 2009, pp. 1720-1723.

-
- [29] A. Misaka, K. Harafuji, and N. Nomura, "Determination of proximity effect parameters in electron-beam lithography," *J. Appl. Phys.*, vol. 68, 1990, pp. 6472-6479.
- [30] M.A. McCord and M.J. Rooks, *Handbook of Microlithography, Micromachining and Microfabrication*, SPIE Publications: 1997.
- [31] D.R. Cumming, S. Thorns, J.M. Weaver, and S.P. Beaumont, "3 nm NiCr wires made using electron beam lithography and PMMA resist," *Microelectronic Engineering*, vol. 30, 1996, pp. 423-425.
- [32] M.J. Lercel, C.S. Whelan, H.G. Craighead, K. Seshadri, and D.L. Allara, "High-resolution silicon patterning with self-assembled monolayer resists," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 14, 1996, pp. 4085-4090.
- [33] M. Ishida, J. Fujita, T. Ogura, Y. Ichiai, E. Ohshima, and J. Momoda, "Sub-10-nm-Scale Lithography Using p-chloromethyl-methoxy-calix[4]arene Resist," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 42, 2003, pp. 3913-3916.
- [34] H. Namatsu, Y. Takahashi, K. Yamazaki, T. Yamaguchi, M. Nagase, and K. Kurihara, "Three-dimensional siloxane resist for the formation of nanopatterns with minimum linewidth fluctuations," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 15, 1998, pp. 69-76.
- [35] H. Yang, A. Jin, Q. Luo, C. Gu, Z. Cui, and Y. Chen, "Low-energy electron-beam lithography of hydrogen silsesquioxane," *Microelectronic Engineering*, vol. 83, 2006, pp. 788-791.
- [36] K. Yamazaki and H. Namatsu, "5-nm-Order Electron-Beam Lithography for Nanodevice Fabrication," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 43, 2004, pp. 3767-3771.
- [37] I. Kostic, R. Andok, V. Barak, I. Caplovic, A. Konecnikova, L. Matay, P. Hrkut, and A. Ritomsky, "Advanced patterning techniques for nanodevice fabrication," *J. Mater. Sci. -Mater. Electron.*, vol. 14, 2003, pp. 645-648.
- [38] S.D. Golladay, P.F. Petric, H.C. Pfeiffer, and W. Stickel, "Electron Beam Projection Lithography Systems," 2000.
- [39] M. Yamabe, "Status and issues of electron projection lithography," *J. Microlith., Microfab., Microsyst.*, vol. 4, 2005, pp. 1-10.
- [40] C. Mack, *Fundamental Principles of Optical Lithography*, West Sussex, England: Wiley, 2008.
- [41] T. Ito and S. Okazaki, "Pushing the limits of lithography," *Nature*, vol. 406, 2000, pp. 1027-1031.
- [42] A.A. Talin, G.F. Cardinale, T.I. Wallow, P. Dentinger, S. Pathak, D. Chinn, and D.R. Folk, "Extreme ultraviolet lithography based nanofabrication using a bilevel photoresist," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 22, 2004, pp. 781-784.
- [43] M. Toriumi, T. Ishikawa, T. Kodani, M. Koh, T. Moriya, T. Yamashita, T. Araki, and H. Aoyama, "Fluoropolymers for 157 nm single-layer resists," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 22, 2004, pp. 27-30.

-
- [44] W.J. Trybula, "Status of 157-nm optical lithography," *J. Microlith., Microfab., Microsyst.*, vol. 4, 2005, p. 011007.
- [45] B. Wu and A. Kumar, "Extreme ultraviolet lithography : A review," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 25, 2007, pp. 1743-1761.
- [46] Intel, "Intel schließt 32nm- Prozessentwicklung erfolgreich ab," <http://www.intel.com/cd/corporate/pressroom/emea/deu/410929.htm>, 2010.
- [47] D.P. Sanders, "Advances in Patterning Materials for 193 nm Immersion Lithography," *Chem. Rev.*, vol. 110, 2010, pp. 321-360.
- [48] A. Kumar and G.M. Whitesides, "Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol "ink" followed by chemical etching," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 63, 1993, pp. 2002-2004.
- [49] Y. Xia and G.M. Whitesides, "Use of Controlled Reactive Spreading of Liquid Alkanethiol on the Surface of Gold To Modify the Size of Features Produced by Microcontact Printing," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, 1995, pp. 3214-3215.
- [50] H.A. Biebuyck, N.B. Larsen, E. Delamarche, and B. Michel, "Lithography beyond light : Microcontact printing with monolayer resists," *IBM J. Res. Develop.*, vol. 41, 1997, pp. 159-170.
- [51] G.M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, and D.E. Ingber, "Soft Lithography in Biology and Biochemistry," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 3, 2001, pp. 335-373.
- [52] Y. Xia and G.M. Whitesides, "Soft Lithography," *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, 1998, pp. 153-184.
- [53] E. Delamarche, H. Schmid, A. Bietsch, N.B. Larsen, H. Rothuizen, B. Michel, and H. Biebuyck, "Transport Mechanisms of Alkanethiols during Microcontact Printing on Gold," *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, 1998, pp. 3324-3334.
- [54] H.A. Biebuyck and G.M. Whitesides, "Autophobic Pinning of Drops of Alkanethiols on Gold," *Langmuir*, vol. 10, 1994, pp. 4581-4587.
- [55] N.B. Larsen, H. Biebuyck, E. Delamarche, and B. Michel, "Order in Microcontact Printed Self-Assembled Monolayers," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, 1997, pp. 3017-3026.
- [56] H. Li, B.V. Muir, G. Fichet, and W.T. Huck, "Nanocontact Printing : A Route to Sub-50-nm-Scale Chemical and Biological Patterning," *Langmuir*, vol. 19, 2003, pp. 1963-1965.
- [57] P.W. Snyder, M.S. Johannes, B.N. Vogen, R.L. Clark, and E.J. Toone, "Biocatalytic Microcontact Printing," *J. Org. Chem.*, vol. 72, 2007, pp. 7459-7461.
- [58] A.A. Shestopalov, R.L. Clark, and E.J. Toone, "Inkless Microcontact Printing on Self-Assembled Monolayers of Fmoc-Protected Aminoethiols," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, 2007, pp. 13818-13819.

-
- [59] A.A. Shestopalov, R.L. Clark, and E.J. Toone, "Inkless Microcontact Printing on SAMs of Boc- and TBS-Protected Thiols," *Nano Letters*, vol. 10, 2010, pp. 43-46.
- [60] C.Y. Hui, A. Jagota, Y.Y. Lin, and E.J. Kramer, "Constraints on Microcontact Printing Imposed by Stamp Deformation," *Langmuir*, vol. 18, 2002, pp. 1394-1407.
- [61] H. Schmid and B. Michel, "Siloxane Polymers for High-Resolution, High-Accuracy Soft Lithography," *Macromolecules*, vol. 33, 2000, pp. 3042-3049.
- [62] R. Jackman, J.L. Wilbur, and G.M. Whitesides, "Fabrication of Submicrometer Features on Curved Substrates by Microcontact Printing," *Science*, vol. 269, 1995, pp. 664-666.
- [63] Y. Xia, D. Qin, and G.M. Whitesides, "Microcontact Printing with a Cylindrical Rolling Stamp: A Practical Step Toward Automatic Manufacturing of Patterns with Submicrometer Sized Features," *Advanced Materials*, vol. 8, 1996, pp. 1015-1017.
- [64] J.L. Guo, "Nanoimprint Lithography: Methods and Material Requirements," *Advanced Materials*, vol. 19, 2007, pp. 495-513.
- [65] S.Y. Chou, P.R. Krauss, W. Zhang, L. Guo, and L. Zhuang, "Sub-10 nm imprint lithography and applications," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 15, 1997, pp. 2897-2904.
- [66] M.D. Austin, H. Ge, W. Wu, M. Li, Z. Yu, D. Wasserman, S.A. Lyon, and S.Y. Chou, "Fabrication of 5 nm linewidth and 14 nm pitch features by nanoimprint lithography," *Applied Physics Letters*, vol. 84, 2004, pp. 5299-5301.
- [67] F. Hua, Y. Sun, A. Gaur, M.A. Meitl, L. Bilhaut, L. Rotkina, J. Wang, P. Geil, M. Shim, J.A. Rogers, and A. Shim, "Polymer Imprint Lithography with Molecular-Scale Resolution," *Nano Letters*, vol. 4, 2004, pp. 2467-2471.
- [68] M. Meier, C. Nauenheim, M. Prömpers, D. Mayer, C. Kügeler, and R. Waser, "Nanoimprint Lithography for Crossbar Arrays," <http://www.iwe.rwth-aachen.de/emrl>, 2010.
- [69] C. Jinkui, M. Fantao, H. Zhitao, and G. Qing, "Large area mold fabrication for the nanoimprint lithography using electron beam lithography," *Sci. China, Ser. E Eng. Mater. Sci.*, vol. 53, 2010, pp. 248-252.
- [70] A.M. Saleem, J. Berg, V. Desmaris, and M.S. Kabir, "Nanoimprint lithography using vertically aligned carbon nanostructures as stamps," *Nanotechnology*, vol. 20, 2009, pp. 375302-375307.
- [71] M. Häffner, A. Heeren, M. Fleischer, D.P. Kern, G. Schmidt, and L.W. Molenkamp, "Simple high resolution nanoimprint-lithography," *Microelectronic Engineering*, vol. 84, 2007, pp. 937-939.
- [72] S.Y. Chou, C. Keimel, and J. Gu, "Ultrafast and direct imprint of nanostructures in silicon," *Nature*, vol. 417, 2002, pp. 835-837.
- [73] B. Cui, C. Keimel, and S.Y. Chou, "Ultrafast direct imprinting of nanostructures in metals by pulsed laser melting," *Nanotechnology*, vol. 21, 2010, pp. 4-9.

-
- [74] G. Kreindl, T. Glinser, and R. Miller, "Next-Generation Lithography: Making a good impression," *Nat. Photonics*, vol. 4, 2010, pp. 27-28.
- [75] D. Li and L.J. Guo, "Micron-scale organic thin film transistors with conducting polymer electrodes patterned by polymer inking and stamping," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 88, 2006, pp. 1-3.
- [76] D. Qi, N. Lu, H. Xu, B. Yang, C. Huang, M. Xu, L. Gao, Z. Wang, and L. Chi, "Simple Approach to Wafer-Scale Self-Cleaning Antireflective Silicon Surfaces," *Langmuir*, vol. 25, 2009, pp. 7769-7772.
- [77] H. Cao, Z. Yu, J. Wang, J.O. Tegenfeldt, R.H. Austin, E. Chen, W. Wu, and S.Y. Chou, "Fabrication of 10 nm enclosed nanofluidic channels," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 81, 2002, pp. 174-176.
- [78] L.J. Guo, X. Cheng, and C. Chou, "Fabrication of Size-Controllable Nanofluidic Channels by Nanoimprinting and Its Application for DNA Stretching," *Nano Letters*, vol. 4, 2004, pp. 69-73.
- [79] D. Falconnet, A. Koenig, F. Assi, and M. Textor, "A Combined Photolithographic and Molecular-Assembly Approach to Produce Functional Micropatterns for Applications in the Biosciences," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 14, 2004, pp. 749-756.
- [80] J.D. Hoff, L. Cheng, E. Meyho, L.J. Guo, and A.J. Hunt, "Nanoscale Protein Patterning by Imprint Lithography," *Nano Letters*, vol. 4, 2004, pp. 853-857.
- [81] P. Maury, M. Escalante, D.N. Reinhoudt, V. Subramaniam, and J. Huskens, "Creating Nanopatterns of His-Tagged Proteins on Surfaces by Nanoimprint Lithography Using Specific NiNTA-Histidine Interactions," *Small*, vol. 3, 2007, pp. 1584-1592.
- [82] W. Hu, E.K. Yim, R.M. Reano, K.W. Leong, and S.W. Pang, "Effects of nanoimprinted patterns in tissue-culture polystyrene on cell behavior," *J. Vac. Sci. Technol. B*, vol. 23, 2005, pp. 2984-2989.
- [83] N.J. Fredin, A.H. Broderick, M.E. Buck, and D.M. Lynn, "Nanoimprinted Thin Films of Reactive, Azlactone-Containing Polymers: Combining Methods for the Topographic Patterning of Cell Substrates with Opportunities for Facile Post-Fabrication Chemical Functionalization," *Biomacromolecules*, vol. 10, 2009, pp. 994-1003.
- [84] G. Liu, S. Xu, and Y. Qian, "Nanofabrication of Self-Assembled Monolayers Using Scanning Probe Lithography," *Acc. Chem. Res.*, vol. 33, 2000, pp. 457-466.
- [85] Q. Tang, S. Shi, and L. Zhou, "Nanofabrication with Atomic Force Microscopy," *J. Nanosci. Nanotech.*, vol. 4, 2004, pp. 948-963.
- [86] J. Liu, J.R. Von Ehr, C. Baur, R. Stallcup, J. Randall, and K. Bray, "Fabrication of high-density nanostructures with an atomic force microscope," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 84, 2004, pp. 1359-1361.
- [87] S. Cruchon-Dupeyrat, S. Porthun, and G. Liu, "Nanofabrication using computer-assisted design and automated vector-scanning probe lithography," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 175, 2001, pp. 636-642.

-
- [88] C. Stali, D.W. Wood, and G. Scoles, "Verification of Biochemical Activity for Proteins Nanografted on Gold Surfaces," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, 2008, pp. 640-646.
- [89] M. Liu, N.A. Amro, and G. Liu, "Nanografting for Surface Physical Chemistry," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 59, 2008, pp. 367-386.
- [90] Y. Hu, A. Das, M.H. Hecht, and G. Scoles, "Nanografting De Novo Proteins onto Gold Surfaces," *Langmuir*, vol. 21, 2005, pp. 9103-9109.
- [91] J.R. Kenseth, J.A. Harnisch, V.W. Jones, and M.D. Porter, "Investigation of Approaches for the Fabrication of Protein Patterns by Scanning Probe Lithography," *Langmuir*, vol. 17, 2001, pp. 4105-4112.
- [92] F. Bano, L. Fruk, B. Sanavio, M. Glettenberg, L. Casalis, C.M. Niemeyer, and G. Scoles, "Toward Multiprotein Nanoarrays Using Nanografting and DNA Directed Immobilization of Proteins," *Nano Letters*, vol. 9, 2009, pp. 2614-2618.
- [93] R.D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, and C.A. Mirkin, "'Dip-Pen' Nanolithography," *Science*, vol. 283, 1999, pp. 661-663.
- [94] S. Hong, J. Zuh, and C.A. Mirkin, "Multiple Ink Nanolithography: Toward a Multiple-Pen Nano-Plotter," *Science*, vol. 286, 1999, pp. 523-525.
- [95] K. Salaita, Y. Wang, and C.A. Mirkin, "Applications of dip-pen nanolithography," *Nature Nanotechnology*, vol. 2, 2007, pp. 145-155.
- [96] B.L. Weeks and J.J. Deyoreo, "Dynamic Meniscus Growth at a Scanning Probe Tip in Contact with a Gold Substrate," *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, 2006, pp. 10231-10233.
- [97] B. Basnar and I. Willner, "Dip-Pen-Nanolithographic Patterning of Metallic, Semiconductor, and Metal Oxide Nanostructures on Surfaces," *Small*, vol. 5, 2009, pp. 28-44.
- [98] E. Bellido, R. de Miguel, D. Ruiz-Molina, A. Lostao, and D. Maspoch, "Controlling the Number of Proteins with Dip-Pen Nanolithography," *Adv. Mater.*, vol. 22, 2010, pp. 352-355.
- [99] K. Salaita, Y. Wang, J. Fragala, R.A. Vega, C. Liu, and C.A. Mirkin, "Massively parallel Dip-Pen Nanolithography with 55000-Pen Two-Dimensional Arrays," *Angew. Chem. Int. Edn*, vol. 45, 2006, pp. 7220-7223.
- [100] S. Lenhert, P. Sun, Y. Wang, H. Fuchs, and C.A. Mirkin, "Massively Parallel Dip-Pen Nanolithography of Heterogeneous Supported Phospholipid Multilayer Patterns," *Small*, vol. 3, 2007, pp. 71-75.
- [101] Huo, Z. Zheng, G. Zheng, L.R. Giam, H. Zhang, and C.A. Mirkin, "Polymer Pen Lithography," *Science*, vol. 321, 2008, pp. 1658-1660.
- [102] Y. Wang, L.R. Giam, M. Park, S. Lenhert, H. Fuchs, and C.A. Mirkin, "A Self-Correcting Inking Strategy for Cantilever Arrays Addressed by an Inkjet Printer and Used for Dip-Pen Nanolithography," *Small*, vol. 4, 2008, pp. 1666-1670.

-
- [103] K. Lee, S. Park, C.A. Mirkin, J.C. Smith, and M. Mrksich, "Protein Nanoarrays Generated By Dip-Pen Nanolithography," *Science*, vol. 295, 2002, pp. 1702-1705.
- [104] J. Hyun, S.J. Ahn, W.K. Lee, A. Chilkoti, and S. Zauscher, "Molecular Recognition-Mediated Fabrication of Protein Nanostructures by Dip-Pen Lithography," *Nano Letters*, vol. 2, 2002, pp. 1203-1207.
- [105] T. Rakickas, M. Gavutis, A. Reichel, J. Piehler, B. Liedberg, and R. Valiokas, "Protein-Protein Interactions in Reversibly Assembled Nanopatterns," *Nano Letters*, vol. 8, 2008, pp. 3369-3375.
- [106] C. Wu, D.N. Reinhoudt, C. Otto, A.H. Velders, and V. Subramaniam, "Protein Immobilization on Ni(II) Ion Patterns Prepared by Microcontact Printing and Dip-Pen Nanolithography," *ACS Nano*, vol. 4, 2010, pp. 1083-1091.
- [107] K. Lee, J. Lim, and C.A. Mirkin, "Protein Nanostructures Formed via Direct-Write Dip-Pen Nanolithography," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, 2003, pp. 5588-5589.
- [108] J. Lim, D.S. Ginger, K. Lee, J. Heo, J. Nam, and C.A. Mirkin, "Direct-Write Dip-Pen Nanolithography of Proteins on Modified Silicon Oxide Surfaces," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 42, 2003, pp. 2309 - 2312.
- [109] S.W. Lee, B. Oh, R.G. Sanedrin, K. Salaita, T. Fujigaya, and C.A. Mirkin, "Biologically Active Protein Nanoarrays Generated Using Parallel Dip-Pen Nanolithography," *Adv. Mater.*, vol. 18, 2006, pp. 1133-1136.
- [110] A.J. Senesi, D.I. Rozkiewicz, D.N. Reinhoudt, and C.A. Mirkin, "Agarose-Assisted Dip-Pen Nanolithography of Oligonucleotides and Proteins," *ACS Nano*, vol. 3, 2009, pp. 2394-2402.
- [111] T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*, New York: W H Freeman & Co, 1993.
- [112] W. Sanger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, New York: Springer Verlag, 1986.
- [113] H. Ringsdorf, B. Schlarb, and J. Venzmer, "Molecular Architecture and Function of Polymeric Oriented Systems: Models for the Study of Organization, Surface Recognition, and Dynamics of Biomembranes," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 27, 1988, pp. 113-158.
- [114] G.M. Whitesides and B. Grzybowski, "Self-Assembly at All Scales," *Science*, vol. 295, 2002, pp. 2418-2421.
- [115] A. Ulman, "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers," *Chem. Rev.*, vol. 96, 1996, pp. 1533-1554.
- [116] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, and G.M. Whitesides, "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology," *Chem. Rev.*, vol. 105, 2005, pp. 1103-1169.
- [117] S. Foerster and T. Plantenberg, "Functional structural hierarchies from self-organising polymers," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 41, 2002, pp. 688-714.

-
- [118] C. Park, J. Yoon, and E.L. Thomas, "Enabling nanotechnology with self assembled block copolymer patterns," *Polymer*, vol. 44, 2003, pp. 6725-6760.
- [119] I.W. Hamley, "Nanostructure fabrication using block copolymers," *Nanotechnology*, vol. 14, 2003, pp. R39-R54.
- [120] P.W. Rothmund, "Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns," *Nature*, vol. 440, 2006, pp. 297-302.
- [121] C. Steinhauer, R. Jungmann, T.L. Sobey, F.C. Simmel, and P. Tinnefeld, "DNA Origami as a Nanoscopic Ruler for Super- Resolution Microscopy," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 48, 2009, pp. 8870 -8873.
- [122] E.S. Andersen, M. Dong, M.M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M.M. Golas, B. Sander, H. Stark, C.L. Oliveira, J.S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K.V. Gothelf, and J. Kjems, "Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid," *Nature*, vol. 459, 2009, pp. 73-76.
- [123] R.J. Kershner, L.D. Bozano, C.M. Micheel, A.M. Hung, A.R. Fornof, J.N. Cha, C.T. Rettner, M. Bersani, J. Frommer, P.W. Rothmund, and G.M. Wallraff, "Placement and orientation of individual DNA shapes on lithographically patterned surfaces," *Nature Nanotechnology*, vol. 4, 2009, pp. 557-561.
- [124] N. Ma, E.H. Sargent, and S.O. Kelley, "One-step DNA-programmed growth of luminescent and biofunctionalized nanocrystals," *Nature Nanotechnology*, vol. 4, 2009, pp. 121-125.
- [125] K. Sanderson, "What to make with DNA origami," *Nature*, vol. 464, 2010, pp. 158-159.
- [126] J. Cho and D.H. Gracias, "Self-Assembly of Lithographically Patterned Nanoparticles," *Nano Letters*, vol. 9, 2009, pp. 4049-4052.
- [127] J. Goldstein, D. Newbury, D. Joy, C. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer, and J. Michael, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Springer Verlag, 2003.
- [128] "Encyclopædia Britannica: Scanning Electron Microscope."
- [129] H. Seiler, "Secondary electron emission in the scanning electron microscope," *J. Appl. Phys.*, vol. 54, 1983, p. R1.
- [130] S.L. Flegler, J.W. Heckman, and K.L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie - Grundlagen, Methoden, Anwendungen*, Spektrum Akademischer Verlag, 1995.
- [131] K. Levsen, "Physikalische Methoden in der Chemie: ESCA," *Chem. Unserer Zeit*, vol. 10, 1976, pp. 48-53.
- [132] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, Wiley-VCH, 1997.
- [133] J.F. Moulder, W.F. Stickle, and P.E. Sobol, *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, Perkin-Elmer, Physical Electronics Division, 1993.

-
- [134] A. Klein, T. Mayer, A. Thissen, and W. Jaegermann, "Photoelectron Spectroscopy in Materials Science and Physical Chemistry: Analysis of Composition, Chemical Bonding and Electronic Structure of Surfaces and Interfaces," *Bunsenmagazin*, vol. 10, 2008, pp. 124-139.
- [135] W.F. Egelhoff, "Core-Level Binding-Energy Shifts at Surfaces and in Solids," *Surf. Sci. Rep.*, vol. 6, 1987, pp. 253-415.
- [136] B. Ratner and D. Castner, "Electron Spectroscopy for Chemical Analysis," *Surface Analysis - The Principle Techniques*, J.C. Vickerman, Wiley-VCH, 1997, pp. 43-92.
- [137] M. Rodahl, P. Dahlquist, F. Höök, and B. Kasemo, "The quartz crystal microbalance with dissipation monitoring," *Biomolecular Sensors*, E. Gizeli and C.R. Lowe, London: CRC Press, 2002, pp. 304-314.
- [138] M. Rodahl, F. Höök, A. Krozer, P. Brzezinski, and B. Kasemo, "Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 66, 1995, pp. 3924-3930.
- [139] M. Rodahl, F. Höök, A. Krozer, and B. Kasemo, *Piezoelectric crystal microbalance device*, US006006589A, 1995.
- [140] M. Rodahl, F. Höök, and B. Kasemo, "QCM Operation in Liquids : An Explanation of Measured Variations in Frequency and Q Factor with Liquid Conductivity," *Anal. Chem.*, vol. 68, 1996, pp. 2219-2227.
- [141] F. Höök, M. Rodahl, P. Brzezinski, and B. Kasemo, "Energy Dissipation Kinetics for Protein and Antibody-Antigen Adsorption under Shear Oscillation on a Quartz Crystal Microbalance," *Langmuir*, vol. 14, 1998, pp. 729-734.
- [142] F. Höök, J. Vörös, M. Rodahl, R. Kurrat, P. Böni, J.J. Ramsden, M. Textor, N.D. Spencer, P. Tengvall, J. Gold, and B. Kasemo, "A comparative study of protein adsorption on titanium oxide surfaces using in situ ellipsometry, optical waveguide lightmode spectroscopy, and quartz crystal microbalance/dissipation," *Colloids Surf., B*, vol. 24, 2002, pp. 155- 170.
- [143] M.V. Voinova, M. Rodahl, M. Jonson, and B. Kasemo, "Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach," *Physica Scripta*, vol. 59, 1999, pp. 391-396.
- [144] G. Kästle, H. Boyen, F. Weigl, G. Lengl, T. Herzog, P. Ziemann, S. Riethmüller, O. Mayer, C. Hartmann, J.P. Spatz, M. Möller, M. Ozawa, F. Banhart, M.G. Garnier, and P. Oelhafen, "Micellar Nanoreactors-Preparation and Characterization of Hexagonally Ordered Arrays of Metallic Nanodots," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 11, 2003, pp. 853-861.
- [145] I.W. Hamley, *The Physics of Block Copolymers*, Oxford: Oxford University Press, 1998.
- [146] H. Klok and S. Lecommandoux, "Supramolecular Materials via Block Copolymer Self-Assembly," *Advanced Materials*, vol. 13, 2001, pp. 1217-1229.
- [147] N. Kang, B. Kang, H. Koh, M. Changez, and J. Lee, "Block copolymers containing pyridine moieties: Precise synthesis and applications," *Reactive & Functional Polymers*, vol. 69, 2009, pp. 470-479.

-
- [148] F.S. Bates and G.H. Frederickson, "Block Copolymer Thermodynamics: Theory and Experiment," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 41, 1990, pp. 525-557.
- [149] F.S. Bates, "Polymer-Polymer Phase Behavior," *Science*, vol. 251, 1991, pp. 898-905.
- [150] J.P. Spatz, S. Möbmer, and M. Möller, "Metastabile inverse Kugelmicellen und micellare Drähte aus Blockcopolymeren," *Angewandte Chemie*, vol. 13/14, 1996, pp. 1673-1676.
- [151] D. Izzo and C.M. Marques, "Formation of Micelles of Diblock and Triblock Copolymers in a Selective Solvent," *Macromolecules*, vol. 26, 1993, pp. 7189-7194.
- [152] Z. Gao and A. Eisenberg, "A Model of Micellisation for Block Copolymers in Solutions," *Macromolecules*, vol. 26, 1993, pp. 7353-7360.
- [153] Z. Li, W. Zhao, Y. Liu, M.H. Rafailovich, J. Sokolov, K. Khougaz, A. Eisenberg, R.B. Lennox, and G. Krausch, "Self-Ordering of Diblock Copolymers from Solution," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 118, 1996, pp. 10892-10893.
- [154] S. Möbmer, J.P. Spatz, M. Möller, T. Aberle, and W. Schmidt, JürgenBurchard, "Solution Behavior of Poly(styrene)-block-poly(2-vinylpyridine) Micelles Containing Gold Nanoparticles," *Macromolecules*, 2000, pp. 4791-4798.
- [155] J.P. Spatz, S. Sheiko, and M. Möller, "Ion-Stabilized Block Copolymer Micelles: Film Formation and Intermicellar Interaction," *Macromolecules*, 1996, pp. 3220-3226.
- [156] J. Spatz, S. Möbmer, M. Möller, M. Kocher, D. Neher, and G. Wegner, "Controlled Mineralization and Assembly of Hydrolysis-Based Nanoparticles in Organic Solvents Combining Polymer Micelles and Microwave Techniques," *Advanced Materials*, vol. 6, 1998, pp. 473-475.
- [157] S.T. Selvan, J.P. Spatz, H. Klok, and M. Möller, "Gold-Polypyrrole Core-Shell Particles in Diblock Copolymer Micelles," *Advanced Materials*, vol. 2, 1998, pp. 132-134.
- [158] J.P. Spatz, A. Roescher, S. Sheiko, G. Krausch, and M. Möller, "Noble Metal Loaded Block Ionomers: Micelle Organization, Adsorption of Free Chains and Formation of Thin Films," *Advanced Materials*, vol. 7, 1995, pp. 731-735.
- [159] J.P. Spatz, T. Herzog, S. Möbmer, P. Ziemann, and M. Möller, "Micellar Inorganic-Polymer Hybrid Systems - A Tool for Nanolithography," *Advanced Materials*, vol. 2, 1999, pp. 149-153.
- [160] J.P. Spatz, S. Möbmer, and M. Möller, "Mineralization of Gold Nanoparticles in a Block Copolymer Microemulsion," *Chem. Eur. J.*, vol. 12, 1996, pp. 1552-1555.
- [161] M. Arnold, V.C. Hirschfeld-Warneken, T. Lohmüller, P. Heil, J. Blümmel, E.A. Cavalcanti-Adam, M. López-García, P. Wallther, H. Kessler, B. Geiger, and J.P. Spatz, "Induction of Cell Polarization and Migration by a Gradient of Nanoscale Variations in Adhesive Ligand Spacing," *Nano Letters*, vol. 8, 2008, pp. 2063-2069.
- [162] V.C. Hirschfeld-Warneken, M. Arnold, A. Cavalcanti-Adam, M. López-García, H. Kessler, and J.P. Spatz, "Cell adhesion and polarisation on molecularly defined

- spacing gradient surfaces of cyclic RGDfK peptide patches," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 87, 2008, pp. 743-750.
- [163] A.R. Kansal, T.M. Truskett, and S. Torquato, "Nonequilibrium hard-disk packings with controlled orientational order," *J. Chem. Phys.*, vol. 113, 2000, pp. 4844-4851.
- [164] S. Zalipsky and J.M. Harris, "Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol)," *ACS Symposium Series*, vol. 680, 1997, pp. 1-13.
- [165] B. Zdyrko, V. Klep, and I. Luzinov, "Synthesis and Surface Morphology of High-Density Poly(ethylene glycol) Grafted Layers," *Langmuir*, vol. 19, 2003, pp. 10179-10187.
- [166] B. Zdyrko, S.K. Varshney, and I. Luzinov, "Effect of Molecular Weight on Synthesis and Surface Morphology of High-Density Poly(ethylene glycol) Grafted Layers," *Langmuir*, vol. 20, 2004, pp. 10179-10187.
- [167] J.H. Lee and J.D. Andrade, "Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 20, 1995, pp. 1043-1079.
- [168] E. Ostuni, R.G. Chapman, R.E. Holmlin, S. Takayama, and G.M. Whitesides, "A Survey of Structure-Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein," *Langmuir*, vol. 17, 2001, pp. 5605-5620.
- [169] E. Ostuni, R.G. Chapman, M.N. Liang, G. Meluleni, G. Pier, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides, "Self-Assembled Monolayers That Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacterial and Mammalian Cells," *Langmuir*, vol. 17, 2001, pp. 6336-6343.
- [170] M.J. Roberts, M.D. Bentley, and J.M. Harris, "Chemistry for peptide and protein PEGylation," *Adv. Drug Delivery Rev.*, vol. 54, 2002, pp. 459-476.
- [171] K. Tasaki, "Poly(oxyethylene)-cation interactions in aqueous solution: a molecular dynamics study," *Comput. Theor. Polym. Sci.*, vol. 9, 1999, pp. 271-284.
- [172] X. Zhu, Y. Jun, D.R. Staarup, R.C. Major, S. Danielson, V. Boiadjev, W.L. Gladfelter, B.C. Bunker, and A. Guo, "Grafting of High-Density Poly(Ethylene Glycol) Monolayers on Si(111)," *Langmuir*, vol. 17, 2001, pp. 7798-7803.
- [173] J. Fick, R. Steitz, V. Leiner, S. Tokumitsu, M. Himmelhaus, and M. Grunze, "Swelling Behavior of Self-Assembled Monolayers of Alkanethiol-Terminated Poly(ethylene glycol): A Neutron Reflectometry Study," *Langmuir*, vol. 20, 2004, pp. 3848-3853.
- [174] S. Herrwerth, T. Rosendahl, C. Feng, J. Fick, W. Eck, M. Himmelhaus, R. Dahint, and M. Grunze, "Covalent Coupling of Antibodies to Self-Assembled Monolayers of Carboxy-Functionalized Poly(ethylene glycol): Protein Resistance and Specific Binding of," *Langmuir*, vol. 19, 2003, pp. 1880-1887.
- [175] S. Tokumitsu, A. Liebich, S. Herrwerth, W. Eck, M. Himmelhaus, and M. Grunze, "Grafting of Alkanethiol-Terminated Poly(ethylene glycol) on Gold," *Langmuir*, vol. 18, 2002, pp. 8862-8870.

-
- [176] Z. Yang, J.A. Galloway, and H. Yu, "Protein Interactions with Poly(ethylene glycol) Self-Assembled Monolayers on Glass Substrates: Diffusion and Adsorption," *Langmuir*, vol. 15, 1999, pp. 8405-8411.
- [177] J. Groll, E.V. Amirgoulova, T. Ameringer, C.D. Heyes, C. Röcker, G.U. Nienhaus, and M. Möller, "Biofunctionalized, Ultrathin Coatings of Cross-Linked Star-Shaped Poly(ethylene oxide) Allow Reversible Folding of Immobilized Proteins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, 2004, pp. 4234-4239.
- [178] K. Mougín, M.B. Lawrence, E.J. Fernandez, and A.C. Hillier, "Construction of Cell-Resistant Surfaces by Immobilization of Poly(ethylene glycol) on Gold," *Langmuir*, vol. 20, 2004, pp. 4302-4305.
- [179] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, and G. Gauglitz, "A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 15, 2000, pp. 473 - 481.
- [180] J.W. Lussi, D. Falconnet, J.A. Hubbell, M. Textor, and G. Csucs, "Pattern stability under cell culture conditions — A comparative study of patterning methods based on PLL-g-PEG background passivation," *Biomaterials*, vol. 27, 2006, pp. 2534-2541.
- [181] J. Blümmel, N. Perschmann, D. Aydin, J. Drinjakovic, T. Surrey, M. Lopez-garcia, H. Kessler, and J.P. Spatz, "Protein repellent properties of covalently attached PEG coatings on nanostructured SiO₂-based interfaces," *Biomaterials*, vol. 28, 2007, pp. 4739-4747.
- [182] J. Blümmel, *Entwicklung biofunktionalisierter Nanostrukturen an Grenzflächen zur Untersuchung der Kinetik des molekularen Motorproteins Eg5*, Dissertation, Universität Heidelberg, 2005.
- [183] F. Rusmini, Z. Zhong, and J. Feijen, "Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips," *Biomacromolecules*, vol. 8, 2007, pp. 1775-1789.
- [184] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, London: Academic Press, 2008.
- [185] C.D. Heyes, A.Y. Kobitski, E.V. Amirgoulova, and G.U. Nienhaus, "Biocompatible Surfaces for Specific Tethering of Individual Protein Molecules," *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, 2004, pp. 13387-13394.
- [186] Y. Lee, E.K. Lee, Y.W. Cho, T. Matsui, I. Kang, T. Kim, and M.H. Han, "ProteoChip: A highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies," *Proteomics*, vol. 3, 2003, pp. 2289-2304.
- [187] C. You, M. Bhagawati, A. Brecht, and J. Piehler, "Affinity capturing for targeting proteins into micro and nanostructures," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 393, 2009, pp. 1563-1570.
- [188] S. Chattopadhyaya, L.P. Tan, and S.Q. Yao, "Strategies for site-specific protein biotinylation using in vitro, in vivo and cell-free systems: toward functional protein arrays," *Nat. Protoc.*, vol. 1, 2006, pp. 2386-2398.

-
- [189] A. Tinazli, J. Tang, R. Valiokas, S. Picuric, S. Lata, J. Piehler, B. Liedberg, and R. Tampé, "High-Affinity Chelator Thiols for Switchable and Oriented Immobilization of Histidine-Tagged Proteins: A Generic Platform for Protein Chip Technologies," *Chem. Eur. J.*, 2005, pp. 5249 - 5259.
- [190] M. Conti, G. Falini, and B. Samori, "How Strong Is the Coordination Bond between a Histidine Tag and Ni - Nitrilotriacetate? An Experiment of Mechanochemistry on Single Molecules," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 39, 2000, pp. 215-218.
- [191] F.H. Arnold, "Metal-Affinity Separations: A New Dimension In Protein Processing," *Biotechnology*, vol. 2, 1991, pp. 151-156.
- [192] J. Crowe, H. Döbeli, R. Gentz, E. Hochuli, D. Stüber, and K. Henco, "6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification," *Methods Mol Biol*, vol. 31, 1994, pp. 371-387.
- [193] S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampe, and J. Piehler, "High-Affinity Adaptors for Switchable Recognition of Histidine-Tagged Proteins," *ChemBioChem*, 2005, pp. 10205-10215.
- [194] T. André, A. Reichel, K. Wiesmüller, R. Tampé, J. Piehler, and R. Brock, "Selectivity of Competitive Multivalent Interactions at Interfaces," *ChemBioChem*, 2009, pp. 1878 - 1887.
- [195] L. Schmitt, M. Ludwig, H.E. Gaub, and R. Tampe, "A Metal-Chelating Microscopy Tip as a New Toolbox for Single-Molecule Experiments by Atomic Force Microscopy," *Biophysical Journal*, 2000, pp. 3275-3285.
- [196] E. Florin, V.T. Moy, and H.E. Gaub, "Adhesion Forces Between Individual Ligand-Receptor Pairs," *Science*, vol. 264, 1994, pp. 415-417.
- [197] S. Lata and J. Piehler, "Stable and functional immobilization of histidine-tagged proteins via multivalent chelator headgroups on a molecular poly(ethylene glycol) brush," *Anal. Chem*, 2005, pp. 1096-1105.
- [198] R. Valiokas, G. Klenkar, A. Tinazli, R. Tampé, B. Liedberg, and J. Piehler, "Differential Protein Assembly on Micropatterned Surfaces with Tailored Molecular and Surface Multivalency," *ChemBioChem*, 2006, pp. 1325 - 1329.
- [199] R. Valiokas, G. Klenkar, A. Tinazli, A. Reichel, R. Tampe, J. Piehler, and B. Liedberg, "Self-Assembled Monolayers Containing Terminal Mono-, Bis-, and Tris-nitrilotriacetic Acid Groups: Characterization and Application," *Langmuir*, 2008, pp. 4959-4967.
- [200] L. Schmitt, C. Dietrich, and R. Tampé, "Synthesis and Characterization of Chelator-Lipids for Reversible Immobilization of Engineered Proteins at Self-Assembled Lipid Interfaces," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 116, 1994, pp. 8485-8491.
- [201] N. Charvet, P. Reiss, A. Roget, A. Dupuis, D. Grünwald, S. Carayon, F. Chandezon, and T. Livache, "Biotinylated CdSe/ZnSe nanocrystals for specific fluorescent labeling," *J. Mater. Chem.*, vol. 14, 2004, pp. 2638-2642.
- [202] G.U. Lee, D.A. Kidwell, and R.J. Colton, "Sensing Discrete Streptavidin-Biotin Interactions with Atomic Force Microscopy," *Langmuir*, vol. 2, 1994, pp. 354-357.

-
- [203] V.T. Moy, E. Florin, and H.E. Gaub, "Intermolecular Forces and Energies Between Ligands and Receptors," *Science*, vol. 266, 1994, pp. 257-259.
- [204] O. Livnah, E.A. Bayer, M. Wilchek, and J.L. Sussman, "The structure of the complex between avidin and the dye, 2-(4'-hydroxyazobenzene) benzoic acid (HABA)," *FEBS Letters*, vol. 328, 1993, pp. 165-168.
- [205] E. Ferrari, F. Darios, F. Zhang, D. Niranjana, J. Bailes, M. Soloviev, and B. Davletov, "Binary polypeptide system for permanent and oriented protein immobilization," *J. Nanobiotechnol.*, vol. 8, 2010, pp. 1-14.
- [206] R.H. Lambalot, A.M. Gehring, R.S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M.A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, and C.T. Walsh, "A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases," *Chem. Biol.*, vol. 3, 1996, pp. 923-936.
- [207] J. Yin, P.D. Straight, S.M. McLoughlin, Z. Zhou, A.J. Lin, D.E. Golan, N.L. Kelleher, R. Kolter, and C.T. Walsh, "Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase," *PNAS*, vol. 102, 2005, pp. 15815-15820.
- [208] J. Yin, F. Liu, X. Li, and C.T. Walsh, "Labeling Proteins with Small Molecules by Site-Specific Posttranslational Modification," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, 2004, pp. 7754-7755.
- [209] F.C. Geiger, "Tabakmosaikvirus-Hüllproteinvarianten als Bausteine für die Nano- und Arraytechnologie," *Methods*, 2009.
- [210] L.S. Wong, J. Thirlway, and J. Micklefield, "Direct Site-Selective Covalent Protein Immobilization Catalyzed by a Phosphopantetheinyl Transferase," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, 2008, pp. 12456-12464.
- [211] V. Stadler, *Dissertation*, Universität Heidelberg, 2001.
- [212] J.J. Yeh and I. Lindau, "Atomic Subshell Photoionization Cross Sections and Asymmetry Parameters," *At. Data Nucl. Data Tables*, vol. 32, 1985, pp. 1-155.
- [213] D.A. Shirley, "High-Resolution X-Ray Photoemission Spectrum of the Valence Bands of Gold," *Phys. Rev. B*, vol. 5, 1972, pp. 4709-4714.
- [214] N. Hirokawa, "Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport," *Science*, vol. 279, 1998, pp. 519-526.
- [215] J.R. Sellers, "Myosins: a diverse superfamily," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1496, 2000, pp. 3-22.
- [216] D.A. Skoufias and M. Scholey, "Cytoplasmic microtubule-based motor proteins," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 5, 1993, pp. 95-104.
- [217] A. Yildiz and P.R. Selvin, "Kinesin: walking, crawling or sliding along?," *Trends Cell Biol.*, vol. 15, 2005, pp. 112-120.
- [218] S.A. Endow, "Determinants of molecular motor directionality," *Nature Cell Biol.*, vol. 1, 1999, pp. E163-E167.

-
- [219] S.A. Endow and H. Higuchi, "A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules," *Nature*, vol. 406, 2000, pp. 913-916.
- [220] S. Lakämper and E. Meyhöfer, "Back on track – On the role of the microtubule for kinesin motility and cellular function," *J. Muscle Res. Cell Motil.*, vol. 27, 2006, pp. 161-171.
- [221] R.G. Burns, "Tubulins: Sequence Comparisons and Structural Constraints," *Cell Motil. Cytoskelet.*, vol. 20, 1991, pp. 181-189.
- [222] R.H. Wade and D. Chrétien, "Cryoelectron Microscopy of Microtubules," *J. Struct. Biol.*, vol. 110, 1993, pp. 1-27.
- [223] N. Kumar, "Taxol-induced Polymerization of Purified Tubulin," *J. Biol. Chem.*, vol. 256, 1981, pp. 10435-10441.
- [224] A. Desai and T.J. Mitchison, "Microtubule Polymerization Dynamics," *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, vol. 13, 1997, pp. 83-117.
- [225] B. Lewin, *Lewin's Cells*, London: Jones & Bartlett Publishers, 2006.
- [226] W.O. Hancock and J. Howard, "Processivity of the Motor Protein Kinesin Requires Two Heads," *J. Cell Biol.*, vol. 140, 1998, pp. 1395-1406.
- [227] D.L. Coy, M. Wagenbach, and J. Howard, "Kinesin Takes One 8-nm Step for Each ATP That It Hydrolyzes," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, 1999, pp. 3667-3671.
- [228] K. Kawaguchi, "Nucleotide-Dependent Single- to Double-Headed Binding of Kinesin," *Science*, vol. 667, 2001, pp. 667-669.
- [229] S. Uemura, K. Kawaguchi, J. Yajima, M. Edamatsu, Y.Y. Toyoshima, and S. Ishiwata, "Kinesin-microtubule binding depends on both nucleotide state and loading direction," *PNAS*, vol. 99, 2002, pp. 5977-5981.
- [230] Q. Shao and Y.Q. Gao, "On the hand-over-hand mechanism of kinesin," *PNAS*, vol. 103, 2006, pp. 8072-8077.
- [231] K.S. Thorn, J.A. Ubersax, and R.D. Vale, "Engineering the Processive Run Length of the Kinesin Motor," *J. Cell Biol.*, vol. 151, 2000, pp. 1093-1100.
- [232] D.W. Pierce, N. Hom-Booher, and R.D. Vale, "Imaging individual green fluorescent proteins," *Nature*, vol. 388, 1997, pp. 388-388.
- [233] R.D. Vale, T. Funatsu, D.W. Pierce, L. Romber, Y. Harada, and T. Yanagida, "Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules," *Nature*, vol. 380, 1996, pp. 451-453.
- [234] S. Diez, T. Korten, and A. Mansson, "Towards the application of cytoskeletal motor proteins in molecular detection and diagnostic devices," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 21, 2010, pp. 1-12.
- [235] H. Hess and V. Vogel, "Molecular shuttles based on motor proteins: active transport in synthetic environments," *Rev. Mol. Biotechnol.*, vol. 82, 2001, pp. 67-85.

-
- [236] P. Bieling, I.A. Telley, J. Piehler, and T. Surrey, "Processive kinesins require loose mechanical coupling for efficient collectivismotility," *EMBO Rep.*, vol. 9, 2008, pp. 1121-1127.
- [237] J. Howard, *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2001.
- [238] J. Blümmel, J. Cahu, L. Sandblad, C. Schmitz, T. Surrey, and J.P. Spatz, "Motor protein driven microtubule transport on gold particle nanopatterns," *Biophys. Rev. Lett.*, vol. 4, 2009, pp. 153-162.
- [239] B. Nitzsche, V. Bormuth, C. Bräuer, L. Ionov, J. Kerssemakers, T. Korten, C. Leduc, F. Ruhnaw, and S. Diez, "Studying Kinesin Motors by Optical 3D-Nanometry in Gliding Motility Assays," *Meth. Cell Biol.*, vol. 95, 2010, pp. 247-271.
- [240] C. Biology, "Allele-specific activators and inhibitors for kinesin," *PNAS*, vol. 96, 1999, pp. 9106-9111.
- [241] K.C. Grabar, R.G. Freeman, M.B. Hommer, and M.J. Natan, "Preparation and Characterization of Au Colloid Monolayers," *Anal. Chem.*, vol. 67, 1995, pp. 735-743.
- [242] G. Frens, "Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions," *Nat. Phys. Sci.*, vol. 241, 1973, pp. 20-22.
- [243] J. Turkevich, P.C. Stevenson, and J. Hillier, "A Study Of The Nucleation And Growth Processes In The Synthesis Of Colloidal Gold," *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, 1951, pp. 55-75.
- [244] W. Haiss, N.T. Thanh, J. Aveyard, and D.G. Fernig, "Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV-Vis Spectra," *Anal. Chem.*, vol. 79, 2007, pp. 4215-4221.
- [245] M. Uteng, C. Hentrich, K. Miura, P. Bieling, and T. Surrey, "Poleward transport of Eg5 by dynein – dynactin in *Xenopus laevis* egg extract spindles," *J. Cell Biol.*, vol. 182, 2008, pp. 715-726.
- [246] A. Rustom, R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, and H. Gerdes, "Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport," *Science*, vol. 303, 2004, pp. 1007-1010.
- [247] N. Hirokawa, "Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport," *Science*, vol. 279, 1998, pp. 519-526.
- [248] D.B. Arnold, "Actin and Microtubule-Based Cytoskeletal Cues Direct Polarized Targeting of Proteins in Neurons," *Science Signal.*, vol. 2, 2009, pp. 2-5.
- [249] C. Brunner, C. Wahnes, and V. Vogel, "Cargo pick-up from engineered loading stations by kinesin driven molecular," *Lab Chip*, vol. 7, 2007, pp. 1263-1271.
- [250] S.M. Block, L.S. Goldstein, and B.J. Schnapp, "bead Movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers," *Nature*, vol. 348, 1990, pp. 348-352.

-
- [251] A. Seitz and T. Surrey, "Processive movement of single kinesins on crowded microtubules visualized using quantum dots," *EMBO Journal*, vol. 25, 2006, pp. 267-277.
- [252] K.J. Böhm, R. Stracke, P. Mühling, and E. Unger, "Motor protein-driven unidirectional transport of micrometer-sized cargoes across isopolar microtubule arrays," *Nanotechnol.*, vol. 12, 2001, pp. 238-244.
- [253] R. Yokokawa, Y. Yoshida, S. Takeuchi, T. Kon, and H. Fujita, "Unidirectional transport of a bead on a single microtubule immobilized in a submicrometre channel," *Nanotechnol.*, vol. 17, 2006, pp. 289-294.
- [254] R. Yokokawa, T. Murakami, T. Sugie, and T. Kon, "Polarity orientation of microtubules utilizing a dynein-based gliding assay," *Nanotechnology*, vol. 19, 2008, p. 125505.
- [255] L. Limberis, J.J. Magda, and R.J. Stewart, "Polarized alignment and surface immobilization of microtubules for kinesin-powered nanodevices," *Nano. Lett.*, vol. 1, 2001, pp. 277-280.
- [256] R. Glass, M. Arnold, J. Blümmel, A. Küller, M. Möller, and J.P. Spatz, "Micro-Nanostructured Interfaces Fabricated by the Use of Inorganic Block Copolymer Micellar Monolayers as Negative Resist for Electron-Beam Lithography," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 13, 2003, pp. 569-575.
- [257] P. Mela, B. Gorzolnik, M. Bückins, A. Mourran, J. Mayer, and M. Möller, "Low-Ion-Dose FIB Modification of Monomicellar Layers for the Creation of Highly Ordered Metal Nanodot Arrays," *Small*, vol. 3, 2007, pp. 1368-1373.
- [258] S. Yun, B. Sohn, J.C. Jung, W. Zin, M. Ree, and J.W. Park, "Micropatterning of a single layer of nanoparticles by lithographical methods with diblock copolymer micelles," *Nanotechnology*, vol. 17, 2006, pp. 450-454.
- [259] J. Chen, P. Mela, M. Möller, and M.C. Lensen, "Microcontact Deprinting: A Technique to Pattern Gold Nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 3, 2009, pp. 1451-1456.
- [260] D. Aydin, "Fabrication and Application of Microstructured Protein-Nanoarrays," 2009.
- [261] J. Friedrich, U. Guntermann, K. Lerch, A. Böhnke, H. Basten, and P. Thometzek, *Process for electrostatically coating non-conductive surfaces*, EP0767009, 2002.
- [262] Y. Wang, "Research progress on a novel conductive polymer - poly (3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT)," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 152, 2009, p. 012023.
- [263] K. Mohamed, M.M. Alkaisi, and R.J. Blaikie, "Surface charging suppression using PEDOT/PSS in the fabrication of three dimensional structures on a quartz substrate," *Microelectron. Eng.*, vol. 86, 2009, pp. 535-538.
- [264] J. Riegler, P. Nick, U. Kielmann, and T. Nann, "Visualizing the Self-Assembly of Tubulin with Luminescent Nanorods," *J. Nanosci. Nanotech.*, vol. 3, 2003, pp. 380-385.

10. Anhang

10.1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
AFM	atomic force microscope / microscopy
AMP-PNP	Adenosin-5'-(β,γ -imido)-triphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCML	Blockcopolymer Mizellare Lithografie
Biotin-HPDP	N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2-pyridyldithio)propionamid
Boc	(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)
BRB80	80 mM PIPES (pH 6.8) + 1 mM MgCl ₂ + 1 mM EGTA
BSA	bovine serum albumin
CAR	chemically amplified resist
CCD	charge coupled device
CMC	critical micelle concentration
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DNQ	Diazonaphthochinon
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPN	Dip-Pen Nanolithografie
EBL	electron beam lithography
EUV	Extremes Ultraviolett
eV	Elektronenvolt
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	green fluorescent protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HDMS	Hexadimethyldisilazan
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

His	Histidin
HSAB	hard and soft acids and bases
IgG	Immunglobulin G
ITO	indium tin oxide
kV	Kilovolt
λ	Abschwächungslänge
mA	Milliampere
Mg-ATP	Mg ²⁺ und ATP im Verhältnis 1:1
μ CP	micro contact printing
μ m	Mikrometer
MHz	Megahertz
min	Minute/n
mM	millimolar
ng	Nanogramm
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIL	nano imprint lithography
nm	Nanometer
NTA	Nitrilotriacetat
ODS	Octadecylsiloxan
PBS	2,63mM KCl; 1,47mM KH ₂ PO ₄ ; 8,10mM Na ₂ HPO ₄ ; 136,91mM NaCl
PEG	Polyethylenglykol
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEDOT-PSS	Poly(3,4-ethylendioxythiophen)- polystyrenesulfonat
PLL	Poly- <i>L</i> -Lysin
PMMA	Polymethylmethacrylat
pN	Piconewton
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
P2VP	Poly-(2-vinylpyridin)
PS	Polystyrol
QCM-D	Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring
REM	Rasterelektronenmikroskopie/Rasterelektronenmikroskop
rpm	rounds per minute
σ	Wirkungsquerschnitt
SAM	self assembled monolayer
SDS	sodium dodecyl sulfate
TBS	(<i>tert</i> -Butyldimethylsilylether)
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der der Arbeit zugrunde liegenden Strategie.

Abb. 2.1: Konventioneller Lithografieprozess.

Abb. 2.2: Auflösung und Durchsatz.

Abb. 2.3: Auflösung verschiedener Lacke.

Abb. 2.4: Wasserstoff-Silsesquioxanlack.

Abb. 2.5: Tintenfreies Mikrokontaktstempeln.

Abb. 2.6: Nanoprägelithografie.

Abb. 2.7: Hochaufgelöste Strukturen.

Abb. 2.8: Prinzip des Nanoshaving und Nanografting.

Abb. 2.9: Durchsatz und Auflösung.

Abb. 2.10: Prinzip der Dip-Pen Nanolithografie.

Abb. 2.11: Zweikomponenten-Proteinstrukturen.

Abb. 2.12: DNS-Origami.

Abb. 2.13: Kombination von EBL und Selbstorganisation.

Abb. 3.1: Rasterelektronenmikroskopie.

Abb. 3.2: Röntgenphotoelektronenspektroskopie.

Abb. 3.3: Kohlenstoffsignal von Ethylenfluoroacetat.

Abb. 3.4: Fluoreszenz.

Abb. 3.5: Prinzip der QCM-D.

Abb. 4.1: Diblockcopolymer Strukturen.

Abb. 4.2: Strukturformel des PS-*b*-P2VP Diblock Copolymers und Prinzip der Bildung inverser Mizellen.

Abb. 4.3: Kritische Mizellkonzentration.

Abb. 4.4: Prinzip der Beladung inverser Mizellen.

Abb. 4.5: Stabilisierung der Mizelle.

Abb. 4.6: Prinzip der Blockcopolymer Mizellaren Lithografie.

Abb. 4.7: Instabilität der Goldnanopartikel.

Abb. 4.8: Stabilitätstests 1.

Abb. 4.9: Stabilitätstests 2.

Abb. 4.10: XP-Spektren einer Oberfläche nach Beschichtung mit Mizellen (rot) und nach Plasmabehandlung (schwarz).

Abb. 4.11: Goldnanopartikel dekorierte Glasoberflächen mit verschiedenen Partikelabständen.

Abb. 5.1: Mechanismen der Proteinresistenz von PEG-Oberflächen.

Abb. 5.2: PEG2000-Synthese.

Abb. 5.3: Passivierung der Oberfläche.

Abb. 5.4: Kontrolle der Passivierung.

Abb. 5.5: Proteinanbindung.

Abb. 5.6: Strukturformeln der an der Anbindung beteiligten Moleküle.

Abb. 5.7: Schema der Funktionalisierung der Goldpartikel mit NTA.

Abb. 5.8: XP-Detailspektren der Aktivester-funktionalisierten Oberfläche.

Abb. 5.9: C1s XP-Detailspektren des Aktivesters.

Abb. 5.10: N1s XP-Detailspektren des Aktivesters sowie des NTAs.

Abb. 5.11: Schema der Physisorption und orientierten Anbindung der Motorproteine auf NTA-funktionalisierten Oberflächen.

Abb. 5.12: Physisorption des Rattenkinesins rk555 bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

Abb. 5.13: Orientierte Anbindung des Rattenkinesins rk555.

Abb. 5.14: Physisorption des Drosophilakinesins dkin401 bei verschiedenen Salzkonzentrationen.

Abb. 5.15: Orientierte Anbindung des Drosophilakinesins dkin401.

Abb. 5.16: Biotinthiol.

Abb. 5.17: XP-Detailspektren der Biotin-funktionalisierten Oberfläche und der Kontrolle ohne Biotin.

Abb. 5.18: C1s XP-Detailspektrum des angebondenen Biotins.

Abb. 5.19: Gerichtete Anbindung mittels einer PPTase.

Abb. 5.20: Schema der kovalenten Luciferaseanbindung an einen Goldpartikel.

Abb. 5.21: XP-Detailspektren des angebondenen CoA.

Abb. 5.22: C1s XP-Detailspektrum des angebondenen CoA.

Abb. 5.23: QCM-Messungen der Anbindung von CoA und ybbR-Luciferase auf Gold.

Abb. 5.24: Flusszelle zur Verwendung in Proteinanbindungsexperimenten.

Abb. 6.1: Struktur und Bewegung von konventionellem Kinesin.

Abb. 6.2: Schematische Darstellung eines Gleitexperiments zur Motilitätsuntersuchung.

Abb. 6.3: Schema der Probenpräparation des von Dichte und Abstand abhängigen Gleitexperiments zur Untersuchung der Motilität von Eg5.

Abb. 6.4: Schema der Gleitexperimente auf orientiert an Goldnanopartikel angebondenen Motorproteinen.

Abb. 6.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Anbindung Alexa-568 markierter Mikrotubuli.

Abb. 6.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Mikrotubuliablösung im Grenzbereich zwischen mit Goldnanopartikeln dekoriertem und passiviertem Bereich.

Abb. 6.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Anbindung Alexa-568 markierter Mikrotubuli auf mit Goldnanopartikeln unterschiedlichen Abstandes dekorierten Oberflächen.

Abb. 6.8: Abfolge fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen des Transports Alexa-568 markierter Mikrotubuli auf mit Kinesin funktionalisierten Goldnanopartikeln.

Abb. 6.9: Geschwindigkeitsverteilungen des Transports Alexa-568 markierter Mikrotubuli auf verschiedenen Goldpartikelabständen.

Abb. 6.10: Schematische Darstellung des Funktionalitätsnachweises über Anbindung von Goldnanopartikeln.

Abb. 6.11: Synthetisierte 12 nm Kolloide.

Abb. 6.12: Einstufiges Verfahren zur Stabilisierung und Biotinylierung kolloidaler Goldnanopartikel.

Abb. 6.13: Nachweis der Biotinylierung der kolloidalen Goldpartikel über Streptavidin-beschichtete magnetisierbare Partikel.

Abb. 6.16: Schematische Darstellung der Überprüfung der Anbindung biotinylierten Tubulins an immobilisiertes Kinesin.

Abb. 6.17: Ergebnisse der Gelelektrophorese.

Abb. 6.18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der Funktionalität angebundener Motorproteine.

Abb. 7.1: Polaritätsausrichtung von Mikrotubuli im Fluss auf mit Dynein funktionalisierten Oberflächen.

Abb. 7.2: Polaritätsausgerichtete Mikrotubuli durch Antikörper-basierte Immobilisierung.

Abb. 7.3: Mikronanostrukturen als Template Molekularer Fließbänder.

Abb. 7.4: Mizellare Elektronenstrahlolithografie.

Abb. 7.5: Schematische Darstellung der Mikronanostrukturierung.

Abb. 7.6: Quervernetzung des Novolak-Lacks nach Aktivierung des DNQ.

Abb. 7.7: Rasterelektronenmikroskopische Bilder der Mikronanostrukturierung auf Silizium.

Abb. 7.8: Aufladungseffekte auf Glas.

Abb. 7.9: ITO-Oberflächen.

Abb. 7.10: Mikronanostrukturierung auf ITO-Oberflächen von Sigma-Aldrich.

Abb. 7.11: Mikronanostrukturierung auf ITO-Oberflächen von SPI Supplies.

Abb. 7.12: Strukturformel von PEDOT-PSS.

Abb. 7.13: Elektronenstrahlolithografie auf Glas.

Abb. 7.14: PEDOT-PSS Beschichtung.

Abb. 7.15: Stabilität der Goldnanopartikel.

Abb. 7.16: Elektronenstrahlolithografie auf Glas.

Abb. 7.17: Schema der Proteinanbindung an Goldnanostrukturen.

Abb. 7.18: Nachweis der Proteinanbindung an Mikronanostrukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Abb. 7.19: Prozess der Erzeugung homogener Goldstrukturen.

Abb. 7.20: Homogene Goldstrukturen.

11. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Joachim P. Spatz für die Möglichkeit der Durchführung dieser spannenden, interdisziplinären Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Ich hatte alle Freiheiten in der Behandlung des Themas und konnte die in der Gruppe vorhandenen, hervorragenden Arbeitsbedingungen nutzen.

Apl. Prof. Dr. Reiner Dahint danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Die Arbeit mit Motorproteinen wäre ohne die Unterstützung von Dr. Thomas Surrey und seiner Arbeitsgruppe nicht möglich gewesen. Daher danke ich Thomas und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung des Projekts, die zur Verfügung gestellten Proteine und die Möglichkeit Teile des Labors für meine Experimente in Beschlag zu nehmen. Neben Thomas möchte ich mich insbesondere bei Dr. Ivo Telley, Dr. Peter Bieling und Mathias Utz für die Bereitstellung der Proteine sowie viele hilfreiche Ratschläge und Tipps bedanken.

Weiterhin danke ich Dr. Jacques Blümmel für die Einführung in das Projekt, die Methode der BCML, die Synthese des PEGs sowie die XPS-Messtechnik und für zahlreiche konstruktive Diskussionen.

Für die gute und sehr angenehme Zusammenarbeit auf dem Gebiet der kovalenten Proteinanbindung möchte ich mich bei Dr. Fania Geiger bedanken.

Dr. Daniel Aydin hat mich in die Technik der Elektronenstrahlithografie eingeführt und so die Herstellung der Mikronanostrukturen ermöglicht. Danke für diese wichtige Hilfestellung.

Vielen Dank auch an Janis Grigoridis in Stuttgart und Thomas Wolf am KIP, die für eine gut funktionierende Arbeitsumgebung gesorgt haben, sowie an Renate Ulshöfer, Elisabeth Pfeilmeier und Jutta Hess für die Hilfe bei der Überwindung bürokratischer Hürden.

Bei Nadine Perschmann, Theresa Pohl, Vera-Hirschfeld-Warneken, Julia Ranzinger und Mark-Oliver Diesner möchte ich mich für die vielen gemeinsamen Mittagessen in der Institutsküche bedanken und für die Freundschaft über die letzten Jahre.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. Lisa Maus für ihre ständige Unterstützung während der gesamten Zeit. Zusätzlich möchte ich mich dafür bedanken, dass Lisa mich immer aufgenommen hat, wenn ich für Experimente in Stuttgart war und ein Bett brauchte.

Dem ganzen Rest der Spatzgruppe sei für die gute gemeinsame Zeit gedankt, die wir während der Arbeitszeit wie auch auf den verschiedenen Seminaren hatten.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich ganz herzlich bei Dr. Lisa Maus, Theresa Pohl und Dr. Vera Hirschfeld-Warneken. Danke vor allem an Lisa und Theresa, dass ihr so viel Zeit investiert und viele gute Ratschläge eingebracht habt.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, meinen Freunden und Max für die Geduld und Unterstützung durch all die Jahre des Studiums und der Doktorarbeit danken. Vielen Dank!

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Heidelberg, den

.....