

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Andrea Seehuber
geboren in Altötting

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2011

Konformation und Aktivität von Glucose Oxidase auf homogen beschichteten und nanostrukturierten Oberflächen

Gutachter: Prof. (apl.) Dr. Reiner Dahint
Prof. Dr. Thomas Bürgi

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Kenntnisstand	3
2.1. Chemische Modifikation von Oberflächen	3
2.1.1. Selbstaggregierende Monolagen	3
2.1.2. Polyelektrolytbeschichtungen	4
2.2. Proteinresistente Oberflächen	5
2.3. Mikro- und Nanostrukturierung von Oberflächen	6
2.3.1. Allgemeiner Überblick	6
2.3.2. Strukturierung mittels selbstaggregierender kolloidaler Monolagen und Submonolagen	8
2.4. Proteine auf künstlichen Oberflächen	13
2.4.1. Adsorptionsmechanismen	13
2.4.2. Konformationsanalyse an Proteinadsorbaten	15
2.4.3. Quantifizierung von Proteinadsorbaten	18
2.4.4. Immobilisierte Enzyme	21
2.5. Das Modellprotein - Glucose Oxidase	24
2.5.1. Allgemeine Informationen	24
2.5.2. Enzymkinetik	25
3. Analytische Methoden	28
3.1. Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie	28
3.1.1. Fourier-Selbstentfaltung	35
3.1.2. Reflexionstechniken	37
3.1.2.1. Die Eigenschaften von Transversalwellen	38
3.1.2.2. Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie	43
3.1.2.3. Abgeschwächte Totalreflexion	44
3.1.3. Infrarot-Spektroskopie an Proteinen	48
3.2. Ellipsometrie	50
3.2.1. Vielfachreflexion an Mehrschichtsystemen	50
3.2.2. Die Messgrößen der Ellipsometrie	51
3.3. Rasterelektronenmikroskopie	52
3.4. Rasterkraftmikroskopie	55
3.5. Dynamische Lichtstreuung	57

3.6.	Elektrophoretische Lichtstreuung	60
3.6.1.	Zeta-Potential	60
3.6.2.	Messung des Zeta-Potentials	61
4.	Experimenteller Teil	63
4.1.	Materialien und Geräte	63
4.1.1.	Chemikalien und Substrate	63
4.1.2.	Messapparaturen	66
4.1.2.1.	FTIR-Spektrometer	66
4.1.2.2.	Ellipsometer	69
4.1.2.3.	UV/Vis-Spektrometer	69
4.1.2.4.	Rasterelektronenmikroskop	70
4.1.2.5.	Rasterkraftmikroskop	70
4.1.2.6.	Zetasizer	70
4.1.2.7.	Goniometer zur Messung des Wasserkontaktwinkels	71
4.1.3.	Datenauswertung	72
4.2.	Synthesen	73
4.2.1.	Vorschrift zur Darstellung von Goldnanopartikeln	73
4.2.2.	Synthese des PAA-PEG2000 Copolymers	74
4.3.	Reinigung der Substrate	75
4.4.	Präparation der Oberflächenbeschichtungen	76
4.4.1.	Thiolmonolagen auf Gold	76
4.4.2.	Silane auf Silicium	77
4.4.3.	Präparation von Poly(ethylenglykol)methacrylatfilmen auf Silicium	78
4.4.3.1.	Veresterung der Aminosilanfilme mit Bromisobutyrylbromid	80
4.4.3.2.	Graftpolymerisation von Poly(ethylenglykol)methacrylat	80
4.4.4.	Polyelektrolytbeschichtungen auf Silicium	81
4.4.5.	Adsorption von Nanopartikeln	82
4.4.5.1.	Statistisch gepackte Monolagen- und Submonolagen	82
4.4.5.2.	Hexagonal dichtest gepackte Monolagen	84
4.5.	Proteinquantifizierung	84
4.5.1.	Quantifizierung in Lösung	84
4.5.2.	Adsorbatquantifizierung - ELISA	86
4.5.2.1.	Proteinadsorption	86
4.5.2.2.	Quantifizierung	87

4.6.	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Glucose Oxidase	89
4.6.1.	Proteinadsorption	89
4.6.2.	Aktivitätsbestimmung	89
5.	Ergebnisse und Diskussion	92
5.1.	Kolloidale Lithographie	92
5.1.1.	Adsorption von PS- und SiO ₂ -Nanopartikeln in Gegenwart von NaCl	94
5.1.2.	Präparation von hdp-Nanopartikelmonolagen	110
5.1.3.	Metallisierung	112
5.1.4.	Abscheidung von OEG-Silan aus der Gasphase und Proteinadsorption	114
5.2.	Glucose Oxidase auf homogen beschichteten Oberflächen	119
5.2.1.	Charakterisierung der Oberflächen	119
5.2.2.	Quantifizierung	121
5.2.3.	Aktivität	131
5.2.4.	Sekundärstruktur	136
5.3.	Glucose Oxidase auf nano-strukturierten Oberflächen	142
5.3.1.	Optimierung der strukturierten Oberflächen	142
5.3.2.	Quantifizierung	146
5.3.3.	Aktivität	150
5.3.4.	Sekundärstruktur	153
6.	Zusammenfassung	158
7.	Fazit	162
A.	Berechnung der Born-Repulsion zwischen Partikel und Oberfläche	164
B.	Aktivität von Glucose Oxidase in Lösung und auf homogen beschichteten Oberflächen	167
C.	IR-Spektren der Oberflächenbeschichtungen	172
D.	FSD-IR-Spektren der adsorbierten Glucose Oxidase	176
	Literaturverzeichnis	181

Abbildungsverzeichnis

1.1. Adsorption eines Proteins auf einer künstlichen Oberfläche	1
2.1. SAM auf metallischer bzw. hydroxylierter Oberfläche	3
2.2. Polyelektrolytbeschichtung	4
2.3. Adsorption von Nanopartikeln in Gegenwart von NaCl	10
2.4. Präparation hexagonal dichtest gepackter Partikelmonolagen	11
2.5. Strukturierung mit Hilfe von Kolloidmasken	12
2.6. Wechselwirkung zwischen Proteinen und künstlichen Oberflächen	14
2.7. Typische Amid-I/II Schwingungsbanden eines Proteins	15
2.8. Schematischer Ablauf eines ELISA mit HRPO	19
2.9. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration	25
3.1. Schematischer Aufbau eines Michelson-Interferometers	30
3.2. Interferogramme einiger einfacher Spektren	32
3.3. Häufig benutzte Apodisierungsfunktionen	35
3.4. Das Prinzip der Fourier-Selbstentfaltung	36
3.5. Feldkomponenten einer elektromagnetischen Welle	39
3.6. Reflexion und Brechung eines Lichtstrahls, der von einem optisch dünne- ren auf ein optisch dichteres Medium fällt	39
3.7. Reflektivität an der Grenzfläche Luft - Silicium	41
3.8. Reflektivität an der Grenzfläche Luft - Gold	43
3.9. IRRAS-Oberflächenauswahlregel	44
3.10. Schematische Darstellung eines ATR-Spektroskopie-Experiments	47
3.11. Amid-I-Bande von Lysozym nach FSD	50
3.12. Vielfachreflexion bei einem System mit Zwischenschicht	50
3.13. Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops	54
3.14. Messprinzip des Rasterkraftmikroskops	55
3.15. Lennard-Jones-Potential	56
3.16. Verschiebung der Resonanzfrequenz des Cantilevers bei der ncAFM	57
3.17. Messprinzip der Dynamischen Lichtstreuung	58
3.18. Veranschaulichung des Zeta-Potentials	60
4.1. Schematischer Aufriss der ATR-Flüssigkeitszelle	68
4.2. Goniometer zur Messung des Wasserkontaktwinkels	71
4.3. Strukturen der verwendeten Thiole	76

4.4. Mechanismus der kupferkatalysierten ATRP	79
4.5. Strukturen der verwendeten Polyelektrolyte	82
4.6. Eichgerade der Proteinbestimmung nach Lowry	86
4.7. Eichgerade der ELISA-Quantifizierung	88
5.1. Nanostrukturierte Oberfläche zur gezielten Proteinadsorption	93
5.2. Veranschaulichung der entropischen Kräfte	95
5.3. Koagulationspunkte der verwendeten Nanopartikel	97
5.4. 100 nm SiO ₂ -Partikel bei steigender NaCl-Konzentration auf Silicium . . .	98
5.5. SiO ₂ - und PS-Partikel bei maximaler Monolagenbedeckung auf Au bzw. Si adsorbiert	98
5.6. Summe des attraktiven und repulsiven Potentials der Partikel-Partikel- bzw. Partikel-Oberflächen-Wechselwirkung (SiO ₂)	106
5.7. Summe des attraktiven und repulsiven Potentials der Partikel-Partikel- bzw. Partikel-Oberflächen-Wechselwirkung (PS)	107
5.8. Auswirkung der Hamaker-Konstante auf den Potentialverlauf	109
5.9. 100 nm PS hdp-Nanopartikelmonolagen	111
5.10. 200 nm PS hdp-Nanopartikelmonolagen	111
5.11. hdp-Monolagen von PS-Nanopartikeln mit verschiedenem Durchmesser .	112
5.12. 20 nm PS rcp-Nanopartikelmonolagen nach der Metallisierung mit Au . .	112
5.13. 100 nm PS hdp-Nanopartikelmonolagen vor und nach der Metallisierung mit Au	114
5.14. Berechnung der Größe eines Adsorptionsplatzes	115
5.15. Gasphasenabscheidung von OEG-Silan durch kolloidalen Masken	116
5.16. Adsorption von BSA und Lysozym auf nanostrukturierte Oberflächen . .	117
5.17. Grenzen der kolloidalen Lithographie mit OEG-Silan	118
5.18. Ellipsometrische Schichtdickenbestimmung der adsorbierten GOx	122
5.19. Relativer Schichtdickenverlust in Abhängigkeit vom Wasserkontaktwinkel	123
5.20. ELISA-Quantifizierung der adsorbierten GOx auf homogen beschichteten Substraten	125
5.21. GOx-Quantifizierung mit verschiedenen Methoden	128
5.22. AUDT- bzw. MDDS-SAM im fingerprint-Bereich	129
5.23. Wechselwirkungspotential der GOx mit 3 verschiedenen Modelloberflächen	130
5.24. Redoxreaktion des FAD	133
5.25. Schematische Darstellung einer Untereinheit von GOx mit allen aromati- schen Seitenketten	135
5.26. Spezifische Aktivität vs. Sekundärstruktur - homogene Oberflächen . . .	138

5.27. Sekundärstruktur der GOx und Verteilung der Aminosäuren innerhalb der Struktur	139
5.28. FSD-Spektren der GOx auf DDT und MDDS	141
5.29. AuNP-Monolagen zur gezielten Proteinadsorption	142
5.30. 20 nm AuNP auf verschiedenen Oberflächenbeschichtungen	143
5.31. 11 nm AuNP in PEGMA-Matrix	144
5.32. Ellipsometrische Untersuchung von PAA-PEG2000-Beschichtungen	145
5.33. AuNP verschiedener Grösse auf PAH	146
5.34. Berechnung der effektiven Adsorptionsfläche auf AuNP-strukturierten Oberflächen	147
5.35. 20 nm AuNP-Submonolagen vor und nach ELISA	150
5.36. Teilreaktionen der GOx-katalysierten Oxidation von Glucose	152
5.37. Räumliche Orientierung des GOx-Adsorbats auf AuNP	153
5.38. Partikeldurchmesser bzw. spezifische Aktivität vs. Sekundärstruktur - homogene Oberflächen	156
A.1. Integration über die Wechselwirkung zwischen Molekül und Platte	164
A.2. Integration über die Wechselwirkung zwischen Kugel und Platte	165
B.1. Aktivität von GOx in Lösung	167
B.2. Aktivität von GOx auf DDT	168
B.3. Aktivität von GOx auf PyUDT	168
B.4. Aktivität von GOx auf AUDT	169
B.5. Aktivität von GOx auf MDDS	169
B.6. Aktivität von GOx auf PAH	170
B.7. Aktivität von GOx auf PEI	170
B.8. Aktivität von GOx auf PSS	171
B.9. Aktivität von GOx auf PVP	171
C.1. IRRA-Spektrum von DDT auf 100 nm Au	172
C.2. IRRA-Spektrum von PyUDT auf 100 nm Au	172
C.3. IRRA-Spektrum von AUDT auf 100 nm Au	173
C.4. IRRA-Spektrum von MDDS auf 100 nm Au	173
C.5. IRRA-Spektrum von PAH auf Si	174
C.6. IRRA-Spektrum von PEI PAH auf Si	174
C.7. IRRA-Spektrum von PSS PAH auf Si	175
C.8. IRRA-Spektrum von PVP PAH auf Si	175

D.1. FSD-IR-Spektren der GOx auf Polyelektrolytbeschichtungen	176
D.2. FSD-IR-Spektren der GOx auf Thiolatbeschichtungen	177
D.3. FSD-IR-Spektren der GOx auf 20 nm AuNP	178
D.4. FSD-IR-Spektren der GOx auf 33 nm AuNP	179
D.5. FSD-IR-Spektren der GOx auf 44 nm AuNP	180

Tabellenverzeichnis

2.1. Beispiele für immobilisierte Enzyme	22
2.2. Die wichtigsten biophysikalischen Eigenschaften von Glucose Oxidase	24
3.1. Charakteristische IR-Banden der Peptidbindung	48
3.2. Zuordnung von Peptidschwingungsbanden verschiedener Konformationen im Amid-I-Bereich	49
4.1. Liste der verwendeten Chemikalien	63
4.2. Liste der verwendeten Proteine	65
4.3. Liste der verwendeten Nanopartikel	66
4.4. Charakterisierung der synthetisierten AuNP	74
5.1. Hamaker-Konstanten für die verwendeten Materialkombinationen	102
5.2. ζ -Potentiale der verwendeten Materialien	104
5.3. Theoretisch und experimentell ermittelte NaCl-Konzentrationen zur Ko- agulation von Nanopartikeln sowie deren Adsorption auf Si bzw. Au	105
5.4. Charakterisierung der Oberflächen - Thiolat-SAM	119
5.5. Charakterisierung der Oberflächen - PE-SAM	120
5.6. Bindekapazitäten des HRPO-konjugierten Antikörpers	127
5.7. Aktivität von GOx in Lösung	132
5.8. Aktivität von GOx auf homogen beschichteten Oberflächen	133
5.9. Sekundärstruktur von GOx auf homogen beschichteten Oberflächen	137
5.10. Absorptionen der aromatischen Aminosäureseitengruppen im Amid-I-Bereich in D ₂ O	138
5.11. Theoretische Adsorptionsfläche auf AuNP-strukturierten Oberflächen	148
5.12. Quantifizierte Mengen von GOx auf AuNP-strukturierten Oberflächen	149
5.13. Aktivität von GOx auf AuNP-strukturierten Oberflächen	151
5.14. Sekundärstruktur von GOx auf AuNP-strukturierten Oberflächen	155

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilan
AFM	atomic force microscope (Rasterkraftmikroskop)
AK	Antikörper
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
AUDT	11-Amino-1-undecanthiol Hydrochlorid
AuNP	Goldnanopartikel
BSA	bovine serum albumine (Rinderserum Albumin)
DDT	Dodecanthiol
DLS	Dynamische Lichtstreuung
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immuno-adsorptionstest)
ELS	Elektrophoretische Lichtstreuung
eV	Elektronenvolt
FSD	fourier self deconvolution (Fourier Selbstentfaltung)
FT	Fourier-Transformation
Glu	Glutaminsäure
GOx	Glucose Oxidase
hdp	hexagonal densely packed (hexagonal dichtest gepackt)
His	Histidin
HRPO	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IgG	Immunglobulin G
IR	Infrarot
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
k. A.	keine Angaben
Lys	Lysin
MDDS	12-Mercaptododecansäure
MW	Molekulargewicht
OEG	Oligo(ethylenglykol)
p. a.	zur Analyse (Reinheitsgrad)
PAA	Poly(acrylsäure)

Abkürzungsverzeichnis

PAH	Poly(allylamin) Hydrochlorid
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-/Kochsalzpuffer)
PDMS	Poly(dimethylsiloxan)
PE	Polyelektrolyt
PEG	Poly(ethylenglykol)
PEGMA	Poly(ethylenglykol)methacrylat
PEI	Poly(ethylenimin)
Phe	Phenylalanin
PS	Polystyrol
PSS	Poly(styrolsulfonat) Natriumsalz
PVP	Poly(2-vinylpyridin)
PyUDT	11-(1H-pyrrol-1-yl)undecan-1-thiol
rcp	random close packed (statistisch dicht gepackt)
REM	Rasterelektronenmikroskop
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Vis	visible (sichtbar)
w/v	weight per volume (Gewichtsprozent)

Kurzfassung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung der Aktivität und Sekundärstruktur von adsorbierter Glucose Oxidase (GOx). Das Enzym wird zum einen auf planare Gold- und Siliciumoberflächen abgeschieden, die zuvor mit verschiedenen Thiolen bzw. Polyelektrolyten chemisch modifiziert wurden. Im Vergleich zum nativen Enzym in Lösung bleibt die enzymatische Aktivität der adsorbierten GOx auf positiv geladenen Oberflächen zu bis zu 80 % erhalten und sinkt auf aromatischen Oberflächen auf nur noch ca. 9 % des Referenzwertes. Die gemessenen spezifischen Aktivitäten der GOx sind umso niedriger, je niedriger der infrarotspektroskopisch quantifizierte Sekundärstrukturanteil an α -helicalen Elementen ist und je höher der Anteil an β -Faltblattstrukturen im Vergleich zur nativen Struktur ist. Die GOx wird weiterhin auf Submonolagen von Goldnanopartikeln (AuNP) mit Durchmessern von 11 – 40 nm adsorbiert. Die AuNP werden mit den gleichen Thiolen wie die planaren Goldoberflächen beschichtet und in eine proteinresistente Matrix eingebettet um eine Adsorption der GOx zwischen den AuNP zu verhindern. Die Aktivität der GOx ist auf allen AuNP-Filmen erheblich geringer als die des nativen Enzyms in Lösung sowie - unabhängig von der chemischen Natur der AuNP-Oberfläche - auch geringer als die des GOx-Adsorbats auf den homogen beschichteten Substraten. Ursächlich hierfür ist hauptsächlich eine starke Denaturierung der adsorbierten GOx auf den AuNP, die mit einem hohen Anteil an β -Faltblättern einhergeht.

Zur großflächigen, nanoskaligen Strukturierung von Oberflächen wird auch die kolloidale Lithographie herangezogen. Mittels Gasphasenabscheidung eines oligo(ethylenglykol)-terminierten Silans durch Monolagen aus Silica-Nanopartikeln auf Siliciumsubstraten können Ringstrukturen mit Durchmessern von ca. 50 bzw. 100 nm präpariert werden, auf denen selektiv die Proteine BSA und Lysozym adsorbiert werden können. Begleitend zu den experimentellen Arbeiten werden das Adsorptionsverhalten von Polystyrol- und Silica-Nanopartikeln auf Gold- und Siliciumoberflächen auch theoretisch untersucht. Durch Zugabe von NaCl zur Partikelsuspension kann das repulsive Potential zwischen den Partikeln und den Substraten so weit abgeschirmt werden, dass die Partikel als statistisch dicht gepackte Monolage auf ein planares Substrat adsorbieren. Die Menge an NaCl, die hierfür benötigt wird, ist dabei abhängig vom Partikelradius sowie den Oberflächenladungen und Hamaker-Konstanten der verwendeten Materialien. Es werden die Wechselwirkungspotentiale bestehend aus einem attraktiven van-der-Waals-Term, einem repulsiven Coulomb-Term sowie einem repulsiven Born-Term für verschiedene Partikel-Substrat-Kombinationen berechnet. Die Übereinstimmungen mit den experimentellen Ergebnissen sind sehr gut.

Abstract

This work focuses on the investigation of the activity and secondary structure of adsorbed Glucose Oxidase (GOx). Therefore, the enzyme is adsorbed onto planar gold and silicone surfaces that are chemically modified by the means of various thiolate and polyelectrolyte coatings. Compared to the native enzyme in aqueous solution the enzymatic activity of adsorbed GOx is preserved up to 80 % on positively charged surfaces and drops to only 9 % of the reference value on aromatic surfaces.

Hereby, a decrease of specific activity of the adsorbed GOx can be correlated with the degree of breakup of α -helical elements and an increasing amount of β -sheets as determined via infrared spectroscopy. Furthermore, the behavior of GOx is studied after adsorption onto sub-monolayers of gold nanoparticles (AuNP) with a diameter of 11 – 40 nm. Analogues to the planar gold surfaces, the AuNP sub-monolayers were coated with thiolates and subsequently embedded into a protein resistant matrix to inhibit protein adsorption in between the AuNP. Remarkably, the activity of GOx on all AuNP films is shown to be lower than the activity of the native enzyme in solution. In addition, irrespective of the AuNP's chemical coating, the activity of the GOx is lower compared to the GOx adsorbates on planar surfaces. The low enzymatic activity can be correlated with a high degree of unfolding coinciding with a large quantitative fraction of β -sheets.

Additionally, colloidal lithography is applied to facilitate large-area nano-structuring of surfaces. Ring structures with a diameter of 50 and 100 nm, respectively, are prepared by means of vapor phase deposition of an oligo(ethylene glycol)-terminated silane through monolayers of silica particles on silicon substrates. BSA and Lysozyme can be selectively adsorbed onto these ring structures. Concomitantly, the adsorption behavior of polystyrene and silica nanoparticles is studied in theory.

The formation of particles adsorbed as random close packed monolayers are achieved by addition of NaCl to the particle suspension, whereby NaCl screens the repulsive potentials between the particles and substrates. The required amount of NaCl depends on the particles' as well as the surface charges and the Hamaker constants of the particular materials. The interaction potentials consisting of an attractive van-der-Waals term, a repulsive Coulomb term and a repulsive Born term are calculated and found to be in good agreement with the experiments.

1. Einleitung

Die Wechselwirkung von Proteinen mit künstlichen Oberflächen bildet die Grundlage vieler medizinischer, biochemischer und biotechnologischer Anwendungen [1,2]. Unspezifisch adsorbierte Proteine bestimmen z. B. die Körperverträglichkeit von Implantaten, das Adhäsionsverhalten von Bakterien und limitieren die Nachweisgenauigkeit biomedizinischer Analyseverfahren. Neben der Zusammensetzung der Adsorbatschicht und der Menge adsorbierter Proteine spielt in vielen Fällen auch deren Konformation eine entscheidende Rolle: Proteinentfaltungsprozesse auf Implantaten sind häufig Auslöser für Abwehrmechanismen des Körpers [3] und pharmakologisch aktive Proteine können durch oberflächeninduzierte Konformationsänderungen ihre medizinische Wirksamkeit einbüßen [4]. Eine Kontrolle oder gar gezielte Steuerung der Struktur adsorbierter Proteine ist daher von großer medizinischer und biotechnologischer Relevanz.

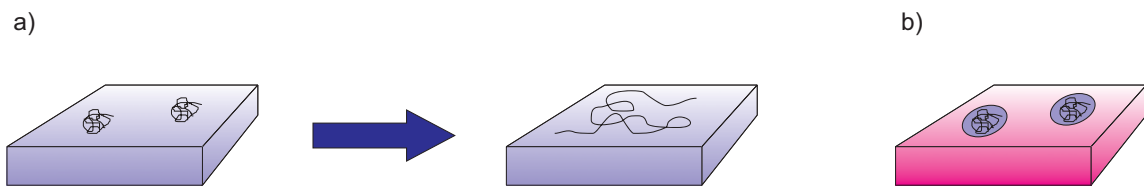


Abb. 1.1.: a) Die Adsorption von Proteinen auf Oberflächen führt in der Regel zu einer Entfaltung der Biomoleküle. b) Durch Einbettung nanoskaliger Adsorptionsplätze (blau) in ein inertes Matrixmaterial (magenta) wird eine Entfaltung der Proteine über die Grenzen des Adsorptionsplatzes hinaus unterbunden und die Proteinstruktur stabilisiert.

Die Konformation oberflächenadsorbierter Proteine wird durch die speziellen physikochemischen Eigenschaften der Oberfläche sowie ihre Topologie nachhaltig beeinflusst. Im Gegensatz zur Präparation einer komplett proteinresistenten Oberflächenbeschichtung zur Vermeidung unspezifischer Adsorption besteht die weitaus größere Herausforderung also darin, ein Substrat so zu strukturieren, dass es möglich wird, einzelne Proteine kontrolliert und unter Erhaltung ihrer natürlichen Konformation abzusetzen (siehe Abb. 1.1). Da die Größe eines einzelnen Proteins bei nur etwa 5 bis 20 nm liegt, stößt man bei einem solchen Vorhaben sehr schnell an die Grenzen der bekannten lithographischen Methoden, insbesondere wenn eine Fläche von mehreren Quadratzentimetern strukturiert werden soll. Mit Hilfe der Elektronenstrahlolithographie konnten zwar bereits Linienstrukturen mit einer Breite von nur 20 nm hergestellt werden [5,6], jedoch beschränkt sich diese Strukturierungsmethode auf eine Fläche von wenigen Quadratmikrometern und birgt zudem einen enormen Zeitaufwand in sich.

Sollen Nanostrukturen in hoher Dichte auf einer Fläche mit makroskopischen Abmessungen erzeugt werden, kommen hierfür eigentlich nur Selbstorganisationsprozesse und damit verknüpfte Maskentechniken in Frage. Der Fokus dieser Arbeit soll dabei auf Monolagen und Submonolagen monodisperser Nanopartikel als Masken sowie als direkte Methode zur chemischen und topographischen Strukturierung von Oberflächen gerichtet sein. Solche Nanopartikel aus unterschiedlichen Materialien wie z. B. Polystyrol (PS) oder Siliciumdioxid (SiO_2) sind in Größen von etwa 20 nm bis zu einigen μm käuflich erwerblich und können schnell, einfach und in gezielt einstellbarer Dichte auf beinahe beliebig große Substratoberflächen abgeschieden werden [7–10]. Goldkolloide sind in guter Größenverteilung sogar bis zu einem unteren Durchmesser von etwa 5 nm einfach herstellbar [11–15]. Mit Hilfe von kolloidalen Monolagen können nun Oberflächen so modifiziert werden, dass nanoskalige Adsorptionsplätze mit definierter Oberflächenchemie in proteinresistente Matrixmaterialien eingebettet werden. Auf diese Weise wird eine Entfaltung des Proteins über die Grenzen des Adsorptionsplatzes hinaus unterbunden. Durch Variation der Größe des Adsorptionsplatzes sowie der Oberflächenchemie sollte sich somit die Proteinkonformation und damit auch die Funktionalität des Proteins gezielt einstellen lassen.

2. Kenntnisstand

2.1. Chemische Modifikation von Oberflächen

2.1.1. Selbstaggregierende Monolagen

Selbstaggregierende Monolagen (SAM) sind ein wichtiges Mittel zur Oberflächenmodifikation [16, 17]. Die besondere Attraktivität dieser Filme besteht in ihrer einfachen Präparation, ihrem hohen Ordnungsgrad und der Möglichkeit, Kopf-, End- und Seitengruppen sowie Molekülkettenlängen für die speziellen Anwendungen anzupassen. Auf diese Weise kann eine Vielzahl von Oberflächen mit spezifischen molekularen Wechselwirkungen und genauer Kontrolle der Oberflächenchemie hergestellt werden. In den vergangenen Jahren sind vor allem zwei Gruppen von SAM untersucht worden: Alkanthiole auf Metallen (vorwiegend Gold) und Alkylsilane auf hydroxylierten Oberflächen (Abb. 2.1).

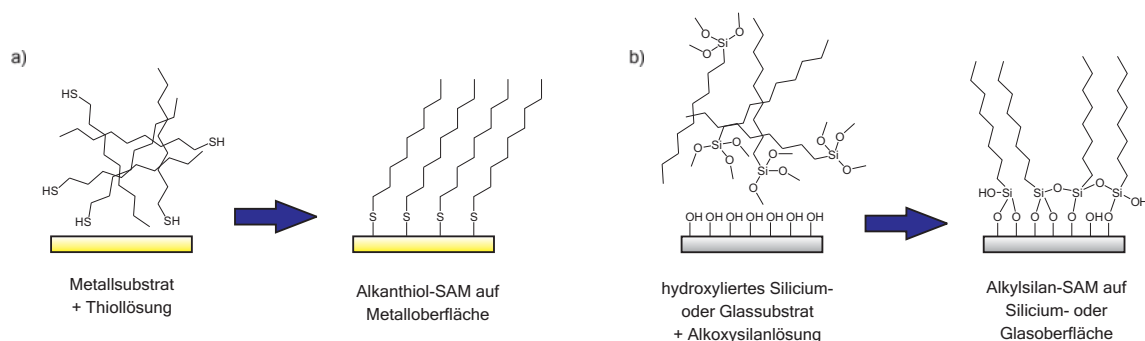


Abb. 2.1.: a) Alkanthiolat-SAM auf metallischem Substrat bzw. b) Alkylsilan-SAM auf hydroxylierter Oberfläche.

Alkylsilan-SAM auf Glas oder Si/SiO₂ weisen eine höhere Stabilität als Alkanthiolat-SAM auf Gold auf. Sie besitzen jedoch nur eine eingeschränkte Anzahl von Funktionalitäten in der ω -Position, die kompatibel mit den reaktiven Trichloro- oder Trialkoxy-Kopfgruppen und Silanolgruppen der Oberfläche sind. Weiterhin tendieren die reaktiven Kopfgruppen zur Polykondensation in Lösung und Multilagen physisorbierter Polysiloxane können die Bildung geordneter Monolagen verhindern. Aus diesem Grund können nur Alkylsilane mit vergleichsweise inerten Endgruppen wie Methyl, Vinyl oder Naphtyl für die Ausbildung geordneter Monolagen eingesetzt werden.

Alkanthiolat-SAM auf Gold sind nicht so temperaturstabil wie Alkylsilan-SAM, aber die Thiol-Kopfgruppe reagiert ausschließlich mit der Metalloberfläche, während alle anderen chemischen Gruppen (mit Ausnahme von Thiolen und Selenolen) nicht an die Goldoberfläche binden und daher als Endgruppen Verwendung finden können. Hierbei handelt es sich unter anderem um hydrophobe Gruppen (Alkyl-, Aryl-, Alkenyl-, Alkynyl-), polare und neutrale Gruppen (Amin-, Amid-, Carboxyl-, Ester-, Alkohol-, Nitril-, Halogenid-), geladene Gruppen (Carboxylat-, Sulfonat-, Phosphat-, Borat-, Ammonium-), Ethylenglykole $(-\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{R}$, Heterocyclen und Zuckergruppen.

2.1.2. Polyelektrolytbeschichtungen

Eine weitere Möglichkeit die Oberflächenchemie eines Materials gezielt zu verändern ist die Abscheidung ionischer Polymere, so genannter Polyelektrolyte (PE). Als Substrate eignen sich hierfür insbesondere oxidische Materialien, deren Oberfläche negativ geladen ist. So wird eine attraktive, elektrostatische Wechselwirkung zwischen Substrat und Polymer gewährleistet (Abb. 2.2).

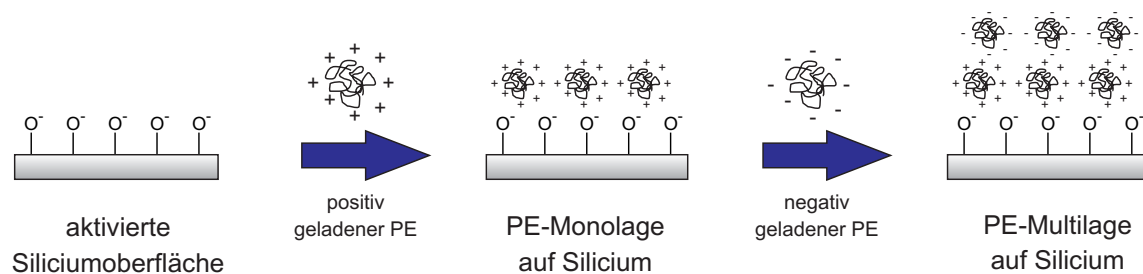


Abb. 2.2.: Abscheidung mehrerer Polyelektrolytschichten auf einer aktivierten Siliciumoberfläche.

Es können auch mehrere Schichten entgegengesetzt geladener Polyelektrolyte nacheinander abgeschieden werden, wobei dann die oberste PE-Schicht im Wesentlichen die Oberflächenchemie des Substrats bestimmt [18–20]. Kationische Polyelektrolyte tragen meist protonierte Aminogruppen, wie in Poly(allylamin), Poly(ethylenimin), Poly(L-Lysin), etc. Für die negativen Ladungen in anionischen Polyelektrolyten sind deprotonierte Säuregruppen verantwortlich wie in Poly(styrolsulfonsäure), Poly(methacrylsäure) oder in manchen Poly(sacchariden) [21] (z. B. Hyaluronsäure, Alginsäure, Pektinsäure, etc.). Mit der Verwendung von Copolymeren, d. h. Polymeren, die aus zwei oder mehreren verschiedenen Monomeren zusammengesetzt sind, erschließt sich, ähnlich wie bei den Alkanthiol-SAM auf Metalloberflächen, ein breites Spektrum an Möglichkeiten, die Oberflächenchemie

von oxidischen Substraten zu variieren. Kenausis et al. und Huang et al. gelang z. B. die Synthese einiger PEG-Copolymere, die über ein kationisches Poly(L-Lysin)-Rückgrat an verschiedene oxidische Materialien wie Nb_2O_5 , Ta_2O_5 , TiO_2 oder SiO_2 gebunden werden können [22, 23]. Diese Beschichtungen zeigen proteinresistentes Verhalten. Cao et al. konnten mit Hilfe eines Sprühverfahrens Polyelektrolytschichten so auftragen, dass sich eine definierte, nanoskalige Morphologie einstellen ließ [24], die der Hautstruktur einiger Meeressäuger ähnelt und die Ansiedlung bestimmter Algen auf der Oberfläche unterdrücken kann.

2.2. Proteinresistente Oberflächen

Für biomedizinische Anwendungen sind Oberflächenbeschichtungen, die die Proteinadsorption verhindern, von besonderem Interesse. Eine unkontrollierte Proteinablagerung auf Implantaten kann z. B. binnen kürzester Zeit dazu führen, dass das Immunsystem diese als Fremdkörper erkennt, was schließlich zur Abstossung führt [25]. Bei Analyseverfahren zum spezifischen Proteinnachweis wie z. B. enzymgekoppelten Immunoassays (ELISA) limitiert eine unspezifische Proteinanlagerung die Nachweisgenauigkeit.

Als besonders geeignet für proteinresistente Beschichtungen haben sich in der Vergangenheit Poly- und Oligo(ethylenglykol)derivate (PEG bzw. OEG) herausgestellt [26]. Diese Verbindungen lassen sich relativ einfach herstellen und können so modifiziert werden, dass sie sowohl mit metallischen als auch mit oxidischen Substraten kompatibel sind. Darüber hinaus zeichnen sie sich durch ihre toxikologische Unbedenklichkeit aus.

Die Mechanismen, die die proteinabweisenden Eigenschaften von OEG- bzw. PEG-Beschichtungen erklären, unterscheiden sich grundlegend. Die Proteinresistenz von PEG-Derivaten konnte durch sterische Repulsionseffekte erklärt werden [27]: adsorbierende Proteine würden die Polymerketten dehydrieren und in ihrer Bewegungsfreiheit einschränken, was ein sowohl energetisch als auch entropisch ungünstiger Vorgang wäre. Das proteinabweisende Verhalten von OEG-terminierten Oberflächenbeschichtungen ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Eine mögliche Erklärung ist die Ausbildung einer Wasser-Zwischenphase in der Nähe der OEG-Ketten, die den Kontakt von Proteinen mit der Oberfläche verhindert [28, 29]. Feldman et al. schlagen anhand ihrer Forschungsergebnisse die Existenz einer Schicht von Hydroxidionen in Oberflächennähe vor, die infolge der Autodissoziation von Wassermolekülen entsteht [30]. Diese Hydroxidionenschicht führt

schließlich zu einer elektrostatischen Abstoßung zwischen Oberfläche und Proteinen. Ob auf einem OEG-Film Proteine adsorbieren oder nicht hängt weiterhin von der Packungsdichte der SAM auf den entsprechenden Substraten ab. Die Oligoetherketten einer Monolage (1-Mercaptoundecyl)-11-tri(ethylenglykol)methylether weisen z. B. auf Gold eine helikale Konformation auf und sind inert gegenüber Proteinadsorption. Auf Silber liegt eine planare all-trans Konformation vor, die zu einer höheren Packungsdichte der OEG-Thiolate führt. Die Oberflächenbeschichtung ist nicht proteinresistent.

2.3. Mikro- und Nanostrukturierung von Oberflächen

2.3.1. Allgemeiner Überblick

Die Möglichkeiten Substratoberflächen im Mikro- oder Nanometermaßstab zu strukturieren sind sehr vielfältig. An dieser Stelle soll zunächst ein kurzer Überblick über die gängigsten Methoden gegeben werden um anschließend die Verwendung von kolloidalen Monolagen und Submonolagen zur Oberflächenstrukturierung näher zu erläutern.

Die wahrscheinlich einfachste Methode der chemischen Strukturierung ist die Präparation von *Misch- und Gradientenfilmen*. Diese können z. B. durch Koadsorption aus einer Lösung von zwei oder mehreren verschiedenen Alkanthiolen bzw. der entsprechenden Siloxan-/Silanspezies erhalten werden [31–34]. In gemischten SAM sind die einzelnen Komponenten entweder homogen in der Monolage dispergiert oder bilden phasenseparierte Inseln in der Größenordnung von einigen Nanometern [35–37]. Mit verschiedenen Techniken können in Mischfilmen auch Gradienten entlang der Oberfläche erzeugt werden [38–40]. Riepl et al. ließen hierfür z. B. zwei unterschiedlich terminierte Alkanthiole durch eine Sephadexmatrix entlang einer Goldoberfläche kreuzdiffundieren. Handelt es sich hierbei um Alkanthiole mit positiv bzw. negativ geladenen Endgruppen, so kann die Gradientenoberfläche dazu genutzt werden um Proteine mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten aus einem Gemisch aufzutrennen [41].

Microcontact Printing (μ CP) stellt eine relativ einfache und schnelle Methode dar, mit Hilfe von Polymerstempeln Strukturen bis zu einer unteren Auflösungsgrenze von etwa 50 nm großflächig auf eine Oberfläche zu übertragen. Die Basis für dieses Verfahren stellt

ein meist photolithographisch mikrostrukturiertes Material (Master) wie z. B. ein Silicium-Wafer dar. Von dieser Struktur wird nun mit dem Silikonprecursor Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) ein Abguss angefertigt und dieser durch Zugabe eines Vernetzers ausgehärtet [42, 43]. Man erhält auf diese Weise einen elastischen Polymerstempel mit der inversen Struktur des mikrostrukturierten Substratmaterials. Nun wird der Stempel mit „Tinte“ beladen, dies kann z. B. eine Alkanthiollösung sein. Die Lösung wird dabei auf die Oberfläche des Stempels aufgetragen und dieser nach einer Kontaktzeit von etwa 15 min im Luftstrom getrocknet. Der Stempel saugt in der Zwischenzeit die Lösung auf wie ein Schwamm. Presst man nun den Stempel auf eine geeignete Oberfläche, im Falle von Alkanthiolen also z. B. Au, Ag, Cu oder Pd, so werden Moleküle auf die Oberfläche transferiert, allerdings nur an den Kontaktstellen. Auf diese Weise wird folglich die Struktur des Stempels auf die Oberfläche abgebildet. Neben Alkanthiolen auf Edelmetalloberflächen können auch Silane und Siloxane auf Halbleiteroberflächen [44–46], sowie Zellen und Proteine [47–49] gestempelt werden.

Bei der bereits oben erwähnten *Photolithographie* [50] arbeitet man mit belichtungssensitiven Beschichtungen (Resist), die auf das zu strukturierende Material aufgetragen werden. Bestrahlt wird üblicherweise durch Chrommasken, so dass auch hier großflächige Strukturen in kurzer Zeit erhalten werden können. Je nach der chemischen Beschaffenheit des Resistmaterials wird dieses durch die Bestrahlung entweder leichter (Positivresist) oder schwerer bzw. gar nicht mehr (Negativresist) in speziell gewählten Lösungsmitteln oder Ätzlösungen entfernt. Die eigentliche Struktur wird anschließend im freigelegten Substrat durch weitere chemische Behandlung entwickelt. Diese Technik hat sich schon seit langem in der Halbleiterindustrie zur Herstellung von Mikrochips und integrierten Schaltkreisen etabliert.

Da photolithographische Verfahren infolge der Beugungsgrenze auf Strukturgrößen oberhalb von 100 nm beschränkt sind, muss für die Erzeugung noch kleinerer Muster auf alternative Methoden wie z. B. *Elektronenstrahlolithographie* zurückgegriffen werden. Aufgrund ihrer vergleichsweise kurzen Wellenlänge und exzellenten Fokussierbarkeit lassen sich mit Elektronenstrahlen sowohl durch Maskentechniken als auch durch direktes Elektronenstrahlschreiben Nanostrukturen erzeugen. Als Resistmaterialien können hierbei auch Thiolat- bzw. Siloxan-/Silan-SAM dienen. Aliphatische SAM verhalten sich als Positivresist, d. h. das Kohlenstoffgerüst wird durch den Beschuss mit Elektronen zerstört und die SAM dadurch leicht ablösbar [5, 51] bzw. bestrahlte SAM-Bereiche können durch andere selbstaggregierende Moleküle ausgetauscht werden [52, 53]. Die Moleküle in aromatischen SAM werden hingegen bei Bestrahlung mit Elektronen untereinander vernetzt

und damit stabiler gegenüber einem anschließenden Ätzprozess (Negativresist) [6, 54, 55]. In Nitrobiphenylthiolat-SAM konnten mit Elektronenstrahlen unter gleichzeitiger Reduktion der Nitro- zur Aminogruppe Linienstrukturen mit einer Breite von 20 nm geschrieben werden [5]. Die so erzeugten aminoterminierten Nanostrukturen können als Template für orts aufgelöste Kopplungsreaktionen eingesetzt werden, z. B. können Farbstoffe [56], Proteine oder Zellen [57] angebunden werden und die Aminogruppen können als Startgruppe für Polymerisationen an der Oberfläche [3] dienen.

Des Weiteren können noch rastersondenmikroskopische Techniken zur Nanostrukturierung von Oberflächen herangezogen werden. Bei der *Dip-Pen Nanolithographie* [58–60], werden beispielsweise einzelne Moleküle mit Hilfe einer AFM-Spitze orts aufgelöst auf eine Oberfläche platziert. Dies eröffnet zwar die Möglichkeit zur Herstellung von sub 10 nm Strukturen, allerdings beschränken sich die Muster auf einen Bereich von nur wenigen μm^2 und ihre Erzeugung ist im Vergleich zu den oben aufgeführten Methoden extrem zeitaufwändig.

2.3.2. Strukturierung mittels selbstaggregierender kolloidaler Monolagen und Submonolagen

Besondere Schwierigkeiten treten auf, wenn Nanostrukturen hoher Dichte auf einer Fläche mit makroskopischen Abmessungen erzeugt werden sollen. Hier ist der Einsatz von Maskentechniken sequentiell arbeitenden und somit hochgradig zeitintensiven Verfahren klar vorzuziehen. Allerdings sind makroskopische Belichtungsmasken zur Nanostrukturierung nur sehr bedingt verfügbar. Eine viel versprechende Realisierungsmöglichkeit stellt die Kolloidmaskentechnik dar [61, 62]. Hier werden Monolagen und Submonolagen monodisperser Nanopartikel (z. B. Polystyrolkugeln) in unterschiedlichen Packungsdichten auf Oberflächen abgeschieden. Anschließend können die Bereiche, die nicht mit Nanopartikeln bedeckt sind, metallisiert oder chemisch funktionalisiert werden. Die Nanopartikel werden zuletzt entweder abgelöst oder können auch als Teil der Struktur auf der Oberfläche verbleiben.

Nanopartikelschichten können auf nahezu jeder beliebigen Oberfläche mit gezielt einstellbarer Bedeckungsdichte präpariert werden, wobei man im Allgemeinen zwischen zwei Adsorptionsmechanismen unterscheidet: die Nanopartikel können zufällig sequentiell adsorbieren, d. h. ein einmal adsorbiertes Partikel ändert infolge stark attraktiver Wechsel-

wirkungen mit der Oberfläche seine Position auf dem Substrat nicht mehr. Der maximale Bedeckungsgrad beträgt dann 54.7 %. Solche Partikelmonolagen nennt man *statistisch dicht gepackte* (engl. random closed packed, rcp) Monolagen. Sind die Partikel nach der Adsorption entlang der Oberfläche noch beweglich, so können *hexagonal dichtest gepackte* (engl. hexagonal densely packed, hdp) Monolagen mit einem maximalen Bedeckungsgrad von 90 % entstehen. Zur Adsorption stehen je nach Packungsdichte eine Reihe verschiedener Techniken zur Verfügung:

- **Elektrostatische Adsorption** Nanopartikel sind in Suspension üblicherweise ladungsstabilisiert um eine Aggregation zu verhindern. Bei der Herstellung von Polystyrol-Partikeln (PS) wird z. B. ein geringer Anteil an Polystyrolsulfonat beigemischt um eine negative Oberflächenladung zu erzeugen. Silica-Partikel (SiO_2) sind durch die Deprotonierung der Silanolgruppen im basischen pH-Bereich negativ geladen. Da die Partikel meist auf oxidische oder metallische Oberflächen adsorbiert werden sollen, die ebenfalls negativ geladen sind, müssen entweder die Partikel oder die Oberfläche mit einem positiv geladenen Polyelektrolyten funktionalisiert werden um eine attraktive Wechselwirkung herzustellen [63, 64]. Unter der Annahme, dass ein einmal adsorbiertes Partikel seine Position aufgrund der anziehenden Kraft, die die Oberfläche auf es auswirkt, nicht mehr verändert, erfolgt die Adsorption zufällig sequentiell und es bilden sich statistisch dicht gepackte Monolagen aus.
- **Adsorption in Gegenwart kleiner Makromoleküle oder eines Elektrolyten** Die Experimente von Himmelhaus und Takei zeigen, dass es möglich ist, PS-Nanopartikel durch Zugabe kleiner Makromoleküle wie N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) zur Partikelsuspension auf Goldoberflächen zu adsorbieren [7]. Der Theorie zufolge bewirken bei großen Konzentrationen an Makromolekülen entropische Kräfte eine Partikeladsorption auf die Oberfläche. J. Berndt konnte zeigen, dass Nanopartikel auch in Gegenwart eines Elektrolyten wie Kochsalz auf Oberflächen abgeschieden werden können [65]. Die Elektrolytlösung vermag dabei die Oberflächenladung der Partikel soweit abzuschirmen, dass schließlich attraktive, dispersive Wechselwirkungen zwischen Partikel und Substratoberfläche überwiegen und die Partikel adsorbieren (Abb. 2.3). Die anziehende Kraft, die von der Substratoberfläche ausgeht, muss größer sein als die attraktiven Kräfte zwischen den Partikeln, da diese sonst aggregieren, bevor sie auf das Substrat abgeschieden werden [65]. Die Menge der adsorbierten Partikel lässt sich über die Elektrolytkonzentration steuern und die Adsorption folgt dem zufällig sequentiellen Modell.

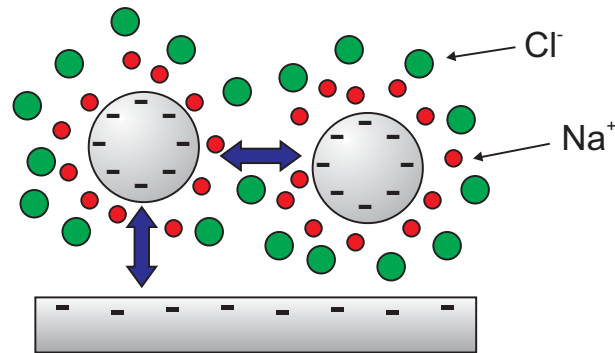


Abb. 2.3.: Adsorption von Nanopartikeln in Gegenwart von NaCl. Die Na^+ und Cl^- Ionen lagern sich in einer Doppelschicht an die Partikel an und schirmen deren Oberflächenladung ab. Ab einer gewissen Elektrolytkonzentration können attraktive, dispersive Kräfte zwischen Partikel und Substratoberfläche dominieren und zur Adsorption führen.

- **Langmuir-Blodgett-Adsorption** Bei dieser Technik läßt man die Partikel auf einer Flüssigkeit aufschwimmen. An der Grenzfläche flüssig/gasförmig können sich die Partikel zu einer dicht gepackten Monolage ordnen, die mittels einer beweglichen Barriere weiter komprimiert werden kann [66]. Das Substrat wird in die Lösung getaucht und unter der Partikelmonolage herausgezogen, wobei die Partikel auf die Substratoberfläche adsorbieren. Da die Partikel auf der Flüssigkeitsoberfläche frei beweglich sind, ist es möglich hexagonal dichtest gepackte Filme herzustellen.
- **Adsorption durch Verdampfung des Lösungsmittels** Trägt man die Partikelsuspension als dünnen Film auf die Substratoberfläche auf und läßt anschließend das Lösungsmittel langsam verdampfen, bewirken auftretende Kapillarkräfte ein besonders dichtes Packen der Nanopartikel. Ein gleichmäßiges Verdampfen der Flüssigkeit kann durch Schrägstellen der Probe oder Spin-Coating erreicht werden (Abb. 2.4) [8, 10, 67].

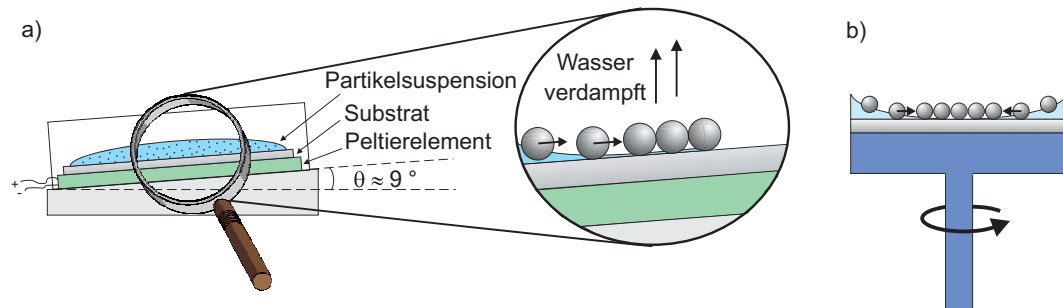


Abb. 2.4.: Präparation hexagonal dichtest gepackter Partikelmonolagen. Durch das Verdampfen des Lösungsmittels entstehen Kapillarkräfte, die die Entstehung einer quaskristallinen Partikelmonolage begünstigen.

Die Abbildung 2.5 illustriert, welche Strukturen sich beispielsweise mit Hilfe von a) hexagonal dichtest gepackten oder b) statistisch gepackten Partikelmonolagen erzeugen lassen. Hexagonal dichtest gepackte Partikelmonolagen lassen nur kleine Bereiche im Kontaktbereich der Partikel unbedeckt, so dass nach der Metallisierung und dem Ablösen der Partikel kleine Dreiecke aus Metall in regelmäßigen Abständen auf dem Substrat zurück bleiben. Wird hingegen durch statistisch gepackte Partikelmonolagen metallisiert, so ist das Ergebnis eine Metallschicht mit Löchern in der Größe des Partikeldurchmessers. Durch Variation der Partikelgröße können die Abmessungen der unbedeckten Bereiche und damit die Größe der erzeugten Nanostrukturen gezielt variiert werden. Anwendung können solche nanostrukturierten Oberflächen z. B. als poröse Elektroden in elektronischen Biosensoren finden [68]. Da oxidische bzw. metallische Substrate unterschiedlichen chemischen Funktionalitäten gegenüber reaktiv sind, können die Nanostrukturen anschließend noch weiter chemisch strukturiert werden [69, 70] um beispielsweise Biomoleküle gezielt auf Oberflächen abzulegen.

Kolloidmonolagen können auch als Ätzmasken verwendet werden. Valsesia et al. beschreiben z. B. die Präparation von nanoskaligen Mercaptohexadecansäure (MHDS) Inseln in einer Hexadecanithiol (HDT) Matrix auf Goldsubstraten [71]. Die MHDS-SAM mit einer darüberliegenden hexagonal dichtest gepackten Monolage aus 500 nm PS-Partikeln wurde mit Sauerstoffplasma behandelt. Durch die Plasmaoxidation wurde sowohl der Durchmesser der Partikel verkleinert als dann auch die freigelegten MHDS-Moleküle verbrannt. Anschließend wurden die Partikel im Ultraschallbad entfernt und das freigelegte Goldsubstrat mit HDT aufgefüllt. An die MHDS-Inseln konnten gezielt Antikörper gebunden werden.

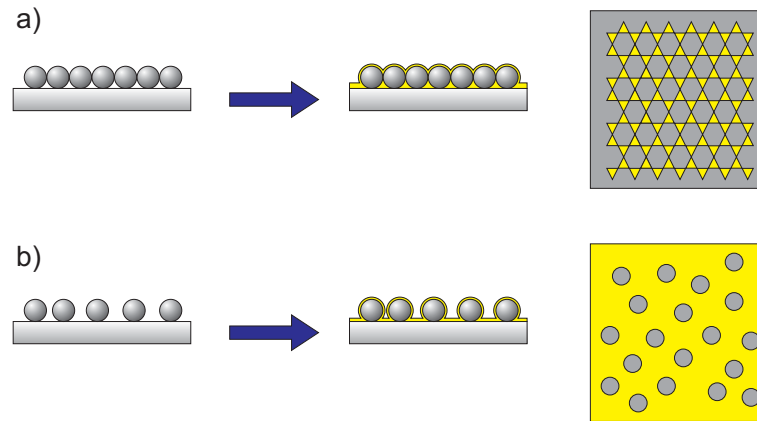


Abb. 2.5.: Strukturierung mit Hilfe von Kolloidmasken. Metallisierung durch a) eine hexagonal dichtest oder b) statistisch gepackte Kolloidmonolage liefert entweder Dreiecksstrukturen oder Metallfilme mit Poren in der Größe der Partikeldurchmesser.

McLellan et al. berichten von einer Strukturierungsmethode, die sich *Edge Spreading Lithography* nennt [72]. Dabei werden hexagonal dichtest gepackte Partikelmonolagen auf Gold- bzw. Silbersubstrate abgeschieden, auf die anschließend ein mit Alkanthiollösung beladener, unstrukturierter PDMS-Stempel gepresst wird. Die Alkanthiolmoleküle werden entlang der Partikeloberfläche auf das Substrat dirigiert und können dort binden. So entstehen Ringstrukturen aus Alkanthiolat-SAM deren Durchmesser über die Dauer der Kontaktzeit mit dem PDMS-Stempel variiert werden kann.

Eine weitere Alternative zu sequentiellen Belichtungsverfahren ist die Strukturierung von Oberflächen mittels Selbstaggregation. Wie von Spatz et al. gezeigt wurde, können Mizellen aus amphiphilen Blockcopolymeren gebildet und in ihrem Inneren mit Tetrachlorogoldsäure (HAuCl_4) beladen werden [73]. Nach Abscheidung einer mizellaren Monolage auf flachen Substraten lassen sich durch Plasmabehandlung die organischen Bestandteile entfernen. Die durch nachfolgende Reduktion des HAuCl_4 erzeugten Nanopartikel sind monodispers und bilden eine quasi-hexagonale Struktur auf der Oberfläche aus. Durch Variation der Mizellenbeladung und der Polymerkettenlänge lassen sich Nanopartikel mit einem Durchmesser von 1 bis 20 nm und einem gegenseitigen Abstand von 30 bis 150 nm erzeugen. Eine nachträgliche Vergrößerung der Goldpartikel ist durch stromlose Goldabscheidung aus Elektrolytlösungen möglich.

2.4. Proteine auf künstlichen Oberflächen

2.4.1. Adsorptionsmechanismen

Die Adsorption eines Proteins auf einer künstlichen Oberfläche ist ein komplizierter Prozess (Abb. 2.6). Bereits nach weniger als einer Millisekunde, die das Substrat der Proteinlösung ausgesetzt ist, erreichen die ersten Proteine die Substratoberfläche und treten mit ihr in Wechselwirkung. Diese Wechselwirkungen beruhen auf elektrostatischen und dispersiven Kräften sowie zum Teil auch auf Wasserstoffbrücken und chemischen Bindungen [1, 25]. Die Verdrängung von adsorbierten Wassermolekülen von der Substratoberfläche und aus der Hydrathülle der gelösten Proteine stellt einen hohen Entropiegewinn dar [74]. Nach einer gewissen Verweilzeit können die adsorbierten Proteinmoleküle mehr und mehr deformiert werden und dabei weitere Bindungen zum Substrat ausbilden. Dieser Effekt spielt insbesondere bei hydrophoben Oberflächen eine große Rolle, da durch Umorientierungen im Gerüst der adsorbierten Proteine attraktive Wechselwirkungen zwischen Substrat und hydrophoben Proteinbereichen, die in wässriger Lösung durch die Faltung der Polypeptidkette besonders im Kernbereich des Moleküls zu finden sind, ausgebildet werden [75].

Die Zusammensetzung des Adsorbats hängt sowohl von der Art des Proteins (Größe, Struktur, isoelektrischer Punkt, etc.) als auch von der Natur der Oberfläche ab. Allgemein gilt, dass kleine Proteine wie Lysozym und Ribonuclease A (beide MW ≈ 14 kDa) sehr empfindlich auf die Benetzbarkeit einer Oberfläche reagieren und sehr gut auf hydrophobe Oberflächen, jedoch kaum auf hydrophile Oberflächen abgeschieden werden können [76–78]. Große Proteine wie Pyruvat Kinase (Dimer, MW ≈ 237 kDa) oder Fibrinogen (Dimer, MW ≈ 340 kDa) sind diesbezüglich eher indifferent, da sie sehr viele Kontaktpunkte zur Oberfläche ausbilden können. Generell ist zu beobachten, dass die Adsorbatmenge mit der Konzentration des Proteins in der Lösung, aus der es abgeschieden wird, steigt [79]. Bei Adsorption aus sehr verdünnten Proteinlösungen erfahren die oberflächengebundenen Proteine größere strukturelle Veränderungen, da die Verweilzeit eines einzelnen Proteins auf der Oberfläche länger ist, bis ein Nachbarmolekül adsorbiert, und somit mehr Zeit zur Entfaltung des Proteins bleibt.

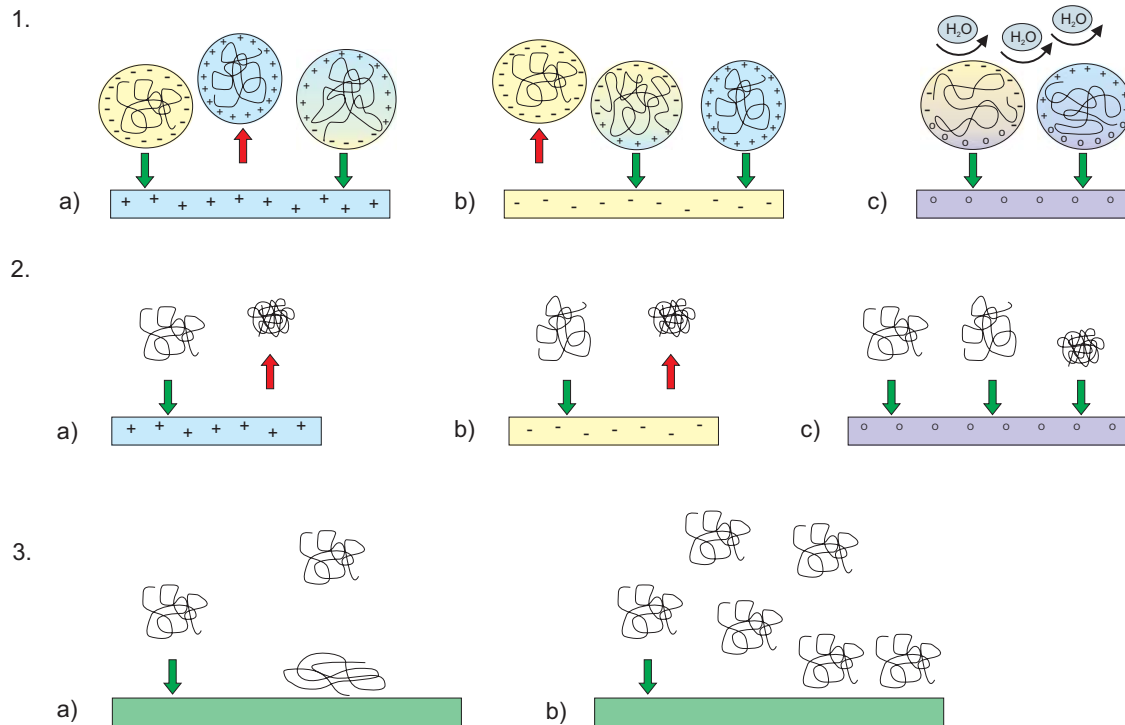


Abb. 2.6.: Wechselwirkung zwischen Proteinen und künstlichen Oberflächen [76, 77].

1. a) + b) Sind Protein und Oberfläche entgegengesetzt geladen (blau: negativ, gelb: positiv), so werden sie einander anziehen (attraktive Coulomb-Wechselwirkung, grüner Pfeil). Bei gleicher Ladung kommt es entweder zu einer repulsiven Wechselwirkung (roter Pfeil) oder das Protein verändert seine Konformation so, dass entgegengesetzt geladene Aminosäurereste Richtung Oberfläche zeigen. Dann wird es adsorbieren. c) Zwischen einer hydrophoben, ungeladenen Oberfläche und einem Protein herrschen attraktive van der Waals-Wechselwirkungen. Die Adsorption wird zusätzlich durch den hohen Entropiegewinn infolge der Dehydrierung der Proteinschicht begünstigt.

2. a) + b) Kleine und/oder stark geladene Proteine adsorbieren schlecht auf geladene Oberflächen, wohingegen große und/oder schwach geladene Proteine in ihrer Struktur deutlich flexibler sind um attraktive Wechselwirkungen ausbilden zu können. c) Hydrophobe Oberflächen sind in jedem Fall attraktiv.

3. a) Proteine, die aus sehr verdünnter Lösung abgeschieden werden, verändern ihre Konformation infolge von Adsorption auf einer Oberfläche stärker, als Proteine, die b) aus konzentrierter Lösung abgeschieden werden.

2.4.2. Konformationsanalyse an Proteinadsorbaten

Zur Untersuchung der Konformation adsorbierter Proteine stehen verschiedene spektroskopische Methoden zur Verfügung, wobei vor allem die *Infrarotspektroskopie* sehr gut geeignet ist um Veränderungen in der Sekundärstruktur eines Proteins zu beobachten. Mit Infrarotstrahlung lassen sich Molekülschwingungen anregen und deren Resonanzfrequenzen hängen sowohl von der Art, als auch von der elektronischen Mikroumgebung einer Molekülgruppe ab. Proteine zeigen sehr charakteristische Schwingungsbanden, die von den Peptidbindungen verursacht werden (Abb. 2.7). Je nachdem, ob eine Peptidbindung sich nun in einer α -Helix, einem β -Faltblatt oder einer ungeordneten Struktur befindet, erscheint die zugehörige Schwingungsbande bei einer etwas anderen Frequenz im Spektrum [80, 81]. Die spezielle Konfiguration der *Abgeschwächten Totalreflexion* (engl. attenuated total reflection, ATR) erlaubt hierbei auch die Strukturanalyse unter Flüssigkeit (meist wässriges Puffermedium). Ball und Jones studierten beispielsweise die qualitative Veränderung der charakteristischen IR-Schwingungsmoden von Lysozym das auf eine Siliciumoberfläche abgeschieden wurde und konnten auch zeigen, wie die Struktur des Proteins sich weiter verändert, wenn die Temperatur schrittweise erhöht wird [82]. Buijs et al. verglichen mithilfe der IR-ATR-Spektroskopie die Sekundärstruktur zweier unterschiedlicher Immunglobuline, die auf eine hydrophile sowie eine hydrophobe Modelloberfläche adsorbiert wurden, mit der Konformation der nativen Proteine in Lösung [83]. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch Adsorption auf die hydrophobe Oberfläche der Anteil an β -Faltblatt Strukturelementen zugunsten von α -helicalen Strukturen verschiebt, und zwar in deutlich stärkerem Ausmaß, als im Falle der Adsorption auf eine hydrophile Oberfläche. Diese experimentell gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen die weiter oben bereits getroffene Aussage, dass die strukturelle Deformation eines adsorbierten Proteins umso größer sein wird, je hydrophober die Oberfläche ist.

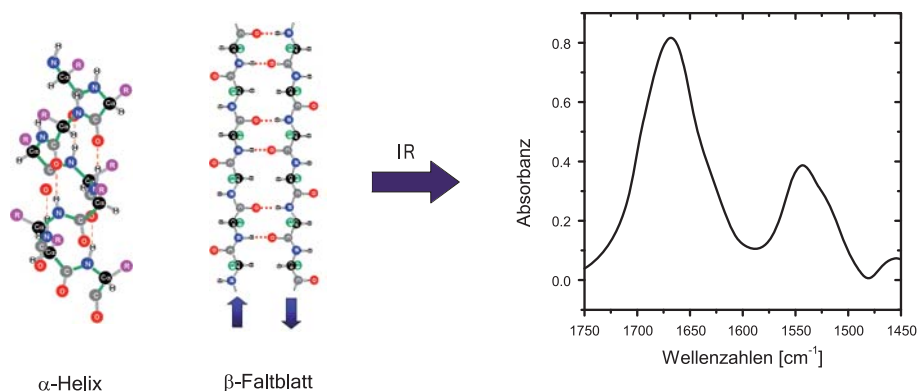


Abb. 2.7.: Typische Amid-I/II Schwingungsbanden eines Proteins.

Fringeli beschreibt weiterhin die Anwendbarkeit der IR-ATR-Spektroskopie zur Bestimmung der räumlichen Orientierung bestimmter Molekülgruppen in dünnen Filmen organischer Verbindungen [84]. Die Methode basiert auf der Ermittlung des Verhältnisses der integralen Absorbanz einer Schwingungsmode, die einmal mit p- und einmal mit s-polarisiertem Licht gemessen wurde. Der Quotient aus $A_{||}$ und A_{\perp} wird dichroitisches Verhältnis genannt. Bei Buffetau et al. findet sich hierfür auch ein experimentelles Beispiel für Poly- γ -benzyl-L-glutamat, das mit Hilfe der Langmuir-Blodgett-Technik direkt auf ein ATR-Reflexionselement aus Germanium adsorbiert wurde [85].

Komplementär zur Infrarotspektroskopie wird zur Sekundärstrukturanalyse von Proteinen in Lösung häufig die Messung des *Circular Dichroismus* (CD) eingesetzt [86]. Als Circular Dichroismus bezeichnet man die Erscheinung, dass optisch aktive Moleküle links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Dies führt dazu, dass linear polarisiertes Licht, welches als Überlagerung von links und rechts polarisiertem Licht aufgefasst werden kann, nach dem Passieren der entsprechenden Probe elliptisch polarisiert ist. Die Messgröße der CD-Spektroskopie ist die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten der links bzw. rechts zirkular polarisierten Lichtkomponente, die sogenannte Elliptizität. Diese wird im Falle von Proteinen üblicherweise über einen Wellenlängenbereich von 180 – 320 nm aufgezeichnet. Durch Vergleich mit CD-Spektren von Proteinen mit bekannter Sekundärstruktur können aus den Messdaten die Anteile an α -helicalen Elementen und β -Faltblättern ermittelt werden. Während sich in IR-Spektren sehr gut Änderungen im Bereich von β -Faltblattstrukturen beobachten lassen, gestaltet sich die Unterscheidung von α -Helices und ungeordneten Elementen oft schwierig. Der Circular Dichroismus spricht hingegen sehr empfindlich auf Strukturänderungen im Bereich von α -Helices an. Obwohl die für eine ausreichende Signalstärke notwendige Probenmenge mit 0.5 – 1.0 mg/ml bei einer Pfadlänge von 0.01 – 0.1 cm im Vergleich zur IR-ATR-Spektroskopie relativ hoch ist, wird in der Literatur auch vereinzelt von CD-spektroskopischen Untersuchungen an Proteinadsorbaten auf planaren Oberflächen berichtet [87,88]. Vermeer und Norde stapelten hierfür einfach bis zu 5 proteinbeschichtete Quarzobjektträger hintereinander in die CD-Messzelle [87]. Erheblich unkomplizierter ist jedoch die Vermessung von Proteinadsorbaten auf Nanopartikeln, sofern das Partikelmaterial selbst im fraglichen Spektralbereich transparent ist. Karlsson et al. verwendeten beispielsweise Silica-Partikel als Substrat für die Adsorption des Enzyms Carboanhydrase und konnten anhand der gemessenen CD-Spektren die Änderungen der Proteinstruktur infolge des Adsorptionsprozesses verfolgen [89]. Lundqvist et al. konnten sogar eine Korrelation zwischen der Größe der Silica-Nanopartikel, die sie als Substrat zur Adsorption von Carboanhydrase benutzten, und dem Grad der Strukturänderung des immobilisier-

ten Proteins nachweisen [90]. Je größer dabei das Partikel, d. h. je mehr Oberfläche dem Protein zur Adsorption zur Verfügung steht, desto größer ist die konformelle Veränderung, die es erfährt. Giacomelli und Norde gelang es die Denaturierung des Amyloid β -Peptids auf hydrophoben Teflon-Partikeln aufzuklären [91]. Diese Studie ist insofern besonders interessant, als dem Amyloid β -Peptid eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Alzheimer'schen Krankheit zugesprochen wird. Man geht davon aus, dass das Amyloid β -Peptid im Gehirn eines Patienten eine strukturelle Veränderung von einer nicht-pathogenen Konformation zu einer pathogenen Konformation durchläuft, die schließlich zur Aggregation und Akkumulation des Peptids und damit zum Ausbruch der Krankheit führt. Da es sich beim Amyloid β -Peptid um ein integrales Membranprotein handelt, könnte eine mögliche Ursache für diese Konformationsänderung auch die Wechselwirkung des Peptids mit hydrophoben Komponenten der Zellmembran sein. Die genaue Ursache für die fehlerhafte Faltung der pathogenen Form des Amyloid β -Peptids ist jedoch bis heute nicht bekannt.

Die *Rasterkraftmikroskopie* (engl. atomic force microscopy, AFM) ist als bildgebendes Verfahren die am häufigsten genutzte Methode um Proteinadsorbate direkt zu visualisieren. Das Abbild der Oberfläche entsteht, indem eine im Idealfall atomar scharfe Spitze (z. B. aus Siliciumnitrid) zeilenweise über die Probe geführt wird. Diese Spitze ist an einer Blattfeder befestigt, an deren Rückseite ein Lasterstrahl reflektiert wird. Untersucht man weiche Proben, wie Proteinadsorbate, so wird üblicherweise im sogenannten non-contact Modus gearbeitet. Dabei hat die Spitze keinen direkten Kontakt zur Probe, sondern wird zu einer resonanten Schwingung angeregt, deren Frequenz und Amplitude sich infolge der Wechselwirkung mit der Probe verändern. Der Abstand zwischen Spitze und Probe wird mit Hilfe eines Piezoelements so nachgeregelt, dass die Schwingungsamplitude der Blattfeder konstant bleibt. Diese Abstandsänderung führt zu einer Auslenkung des reflektierten Laserstrahls und aus der gemessenen Ablenkung des Lasers wird schließlich das eigentliche Bild erzeugt. Aus der Literatur sind zahlreiche rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von oberflächengebundenen Proteinen bekannt. Denis et al. präparierten z. B. Modelloberflächen mit definierter Rauigkeit indem sie PS-Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 23 nm auf Substrate abschieden, bevor diese mit Gold bedampft und anschließend via Selbstaggregation mit Alkanthiolen mit hydrophiler bzw. hydrophober Endgruppe chemisch modifiziert wurden [92]. Im Vergleich zu den jeweils glatten Oberflächen konnte ein deutlicher Einfluß der Substrattopographie auf das Adsorptionsverhalten von Collagen beobachtet werden: während das Protein auf den nicht-strukturierten Substraten ausgedehnte supramolekulare Strukturen bildet, scheint die Mobilität des Proteins entlang der strukturierten Oberflächen gestört zu sein, so dass sich hier eher einzelne Pro-

teincluster bilden. Huang et al. konnten bei Adsorption auf phasenseparierten Mischfilmen von Alkanthiolen auf Gold eine deutliche Änderung der Morphologie der Proteinschicht nachweisen, sobald die Substratoberfläche eine nanoskalige und somit der molekularen Längenskala der adsorbierten Proteine entsprechende Struktur aufwies [93].

2.4.3. Quantifizierung von Proteinadsorbaten

Die *IR-ATR-Spektroskopie* bietet neben der genauen Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen auch die Möglichkeit, die Menge an Adsorbat zu quantifizieren. Dies kann z. B. durch den Vergleich der Intensität der Schwingungsbanden von Proteinlösungen bekannter Konzentration mit der Intensität der Banden des Adsorbats geschehen [94] oder aber auch durch direkte Berechnung aus der integralen Absorbanz der Proteinbanden mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes [84]. Yokoyama et al. beschreiben detailliert den zeitlichen Verlauf der Adsorption von Lysozym auf ein Zinkselenid ATR-Prisma, das zuvor mit einem hydrophoben Silicon-Polystyrol-Copolymer beschichtet wurde [95]. Die absoluten Mengen an adsorbiertem Protein in Abhängigkeit von der Inkubationszeit sowie auch von der Konzentration der Proteinlösung über der Kristalloberfläche wurden anhand der integralen Absorbanz der Amidbanden berechnet. Fink et al. konnten zeigen, dass der Zusammenhang zwischen integraler Absorbanz der Amidbanden und der Oberflächenkonzentration bis zu einer Adsorbatmenge von 300 ng/cm^2 linear ist [96]. Da der molare Extinktionskoeffizient der Amidbanden praktisch unabhängig von der Art des Proteins ist, kann er z. B. durch Vergleich einer Serie von IR-Spektren mit einem alternativen Experiment zur absoluten Quantifizierung von Proteinadsorbaten errechnet werden und ist dann auf Messungen mit jedem beliebigen Protein übertragbar. Ein solches Alternativexperiment, das auch von Fink et al. zum Vergleich benutzt wurde, kann z. B. ein *Radioimmunoassay* sein, bei dem das Protein üblicherweise mit einer radioaktiven Iodverbindung markiert wird. Dann wird eine Eichgerade von radioaktivem Zerfall gegen verschiedene, bekannte Konzentrationen an Protein erstellt und anhand derer schließlich die Menge an Proteinadsorbat auf einer Oberfläche ermittelt [97, 98].

Allgemein werden als *Immunoassays* zusammenfassend eine Reihe von Methoden der Bioanalytik bezeichnet, deren gemeinsames Grundprinzip die Erkennung und damit der Nachweis eines Analyten durch die Bindung eines Antigens an einen Antikörper ist. Je nach Konfiguration des Assays können sowohl Antigen als auch Antikörper der nachzuweisende Analyt sein. Speziell der *enzymgekoppelte Immunoadsorptionstest* (engl. enzyme linked

immunoabsorbent assay, ELISA) kann auch zur Quantifizierung oberflächengebundener Proteine dienen [99]. Der Test basiert auf einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion, die am Spektralphotometer verfolgt werden kann. Das Enzym - meist Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRPO) oder alkalische Phosphatase - ist üblicherweise an einen Antikörper konjugiert, der spezifisch das zu bestimmende Protein erkennt. Die Menge an adsorbiertem Protein ist im Idealfall der Menge an gebundenem Antikörper proportional und dies führt wiederum durch das konjugierte Enzym zu einem entsprechenden Umsatz an Chromophor (Abb. 2.8). Anhand der spektralphotometrisch bestimmten Extinktion der Farbreaktion kann also auf die Adsorbatmenge zurück gerechnet werden. Wie der oben bereits genannte Radioimmunoassay bedarf auch der ELISA einer Eichung gegen eine Reihe bekannter Konzentrationen des enzymkonjugierten Antikörpers.

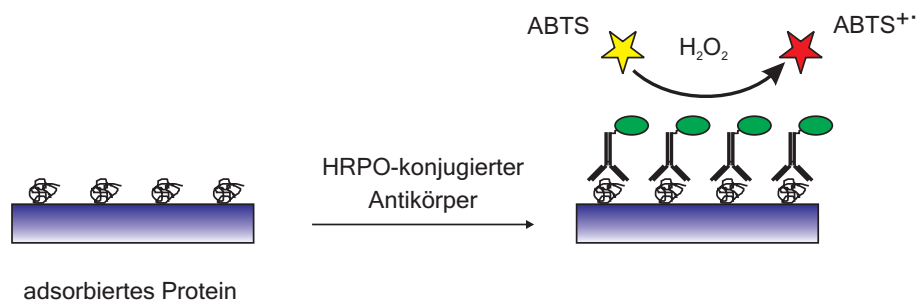


Abb. 2.8.: Schematischer Ablauf eines ELISA mit HRPO. Der gegen das adsorbierte Protein spezifische Antikörper ist mit HRPO konjugiert. Diese kann in Gegenwart ihres Substrats (H_2O_2) den Farbstoff 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)(ABTS) zum Radikalkation umsetzen. Die Extinktionsänderung bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ ist proportional der Menge an HRPO-konjugiertem Antikörper.

Eine oft genutzte Methode zur Quantifizierung von Proteinadsorbaten ist die *Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie* (engl. total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM) [100–102]. Hierfür muss das Protein mit einem fluoreszierendem Molekül markiert werden und die Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge erfolgt durch Vergleich mit der Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Proteinkonzentrationen in Lösung [101]. Diese Vorgehensweise ist nicht ganz unproblematisch, da z. B. in der Nähe von metallischen Oberflächen wie Gold eine Löschung der Fluoreszenz in Folge der elektromagnetischen Wechselwirkung der Fluoreszenzsonde mit dem Metall beobachtet wird. Bei Schmid et al. wird zur Lösung dieses Problems ein experimenteller Umweg beschrieben, bei dem das adsorbierte Protein mit 500 mM Imidazolösung wieder desorbiert und dann in Lösung vermessen wird [100].

Kinetische Studien zur Proteinadsorption werden häufig mit Hilfe der *Oberflächenplasmonenresonanz Spektroskopie* (engl. surface plasmon resonance spectroscopy, SPR spectroscopy) durchgeführt [93,98,103]. Der Versuchsaufbau besteht aus einem optisch transparenten Prisma, das mit einer dünnen Metallschicht bedampft ist und mit der zu analysierenden Probe in Kontakt steht. Durch das Prisma wird Licht unter Totalreflexion auf die Grenzfläche zwischen Metall und Probe gestrahlt, was dazu führt, dass das Elektronengas des Metallfilms bei einem bestimmten Einfallswinkel zu kollektiven Schwingungen (Oberflächenplasmonen) angeregt wird. Trägt man nun die reflektierte Lichtintensität gegen den Einfallswinkel auf, so erscheint die Oberflächenplasmonenresonanz als scharfer Peak im Spektrum. Die Adsorption von Molekülen auf den Metallfilm führt zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels, woraus sich Informationen über die Adsorbatschichtdicke gewinnen lassen.

Zur Aufnahme von kinetischen Daten eignet sich auch die *Quarzmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors* (engl. quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, QCM-D) sehr gut [104–106]. Im Gegensatz zur oben beschriebenen SPR-Spektroskopie handelt es sich bei der QCM-D um einen akustischen Sensor, der aus einem dünnen, kristallinen Quarzplättchen mit zwei Elektroden besteht. Bei resonanter Anregung mit einer Wechselspannung oszilliert dieses Plättchen mit einer Frequenz, die von der gesamten oszillierenden Masse abhängig ist. Erhöht man die Massenbelegung des Sensors, z. B. infolge von Proteinadsorption, verringert sich die Resonanzfrequenz proportional zur Massendifferenz. Ein entscheidender Vorteil der Quarzmikrowaage gegenüber optischen Quantifizierungsmethoden ist die Abhängigkeit von der Gesamtmasse des Adsorbats, d. h. die Hydratisierung des adsorbierten Proteins geht in das Messsignal ein. Die Adsorption von Proteinen an einer Oberfläche erzeugt keinen starren, sondern einen elastischen Film, der die Schwingung des Quarzplättchens dämpft. Anhand der Dämpfungseigenschaften des Systems lassen sich also auch Informationen über die viskoelastische Beschaffenheit des Adsorbats gewinnen. Bei Höök et al. findet sich z. B. eine Studie über das Adsorptionsverhalten eines Sekretionsproteins aus Miesmuscheln, bei der Ellipsometrie, SPR-Spektroskopie und QCM-D als komplementäre Techniken verwendet wurden um die Adsorptionskinetik des Proteins und die Veränderungen, die die Adsorbatschicht nach einer Behandlung mit Natriumperiodatlösung erfährt, zu verfolgen [107]. Während die ellipsometrischen Daten lediglich eine Abnahme der Adsorbatschichtdicke zeigen, kann anhand der QCM-D Messungen eindeutig der dehydrierende Effekt des Natriumperiodats belegt werden, der zu einer Erhöhung des Elastizitätsmoduls der Proteinschicht führt.

2.4.4. Immobilisierte Enzyme

Immobilisierte Enzyme sind nicht nur ein rein wissenschaftliches Forschungsobjekt sondern sind auch unter wirtschaftlichen Aspekten besonders interessant. Enzyme werden in ihrer Eigenschaft als Biokatalysatoren zur großindustriellen organischen Synthese eingesetzt und finden auch in vielen immundiagnostischen Verfahren Anwendung [108, 109]. Immobilisierte β -Galactosidase wird z. B. verwendet um Lactose in Milchprodukten zu spalten, damit diese auch von lactoseintoleranten Menschen konsumiert werden können. Glucose Isomerase katalysiert die Umwandlung von Glucose zu Fructose. Da Fructose deutlich süßer schmeckt als Glucose, wird trägergebundene Glucose Isomerase dazu verwendet, fructoseangereicherte Süßungsmittel für die Nahrungsmittelindustrie herzustellen. Auch der Süßstoff Aspartam wird in einem enzymkatalysierten Prozess hergestellt, hier kommt immobilisiertes Thermolysin zum Einsatz [110].

Die Hauptvorteile der Verwendung immobilisierter Enzyme sind neben einer komfortableren Handhabung vor allem die leichte Separation des Biokatalysators von der Reaktionslösung und die Wiederverwendbarkeit des Enzympräparats. Jedoch muss auch berücksichtigt werden, dass die Herstellung geeigneter Trägermaterialien sowie die Immobilisation der Enzyme Mehrkosten verursacht, die durch die Güte des Präparats ausgeglichen werden müssen. Die Ansprüche, die sich demnach stellen, sind unter anderem:

- **Eigenschaften des Trägermaterials** Das Trägermaterial muss in jedem Fall unlöslich und chemisch inert im entsprechendem Reaktionsmedium sein. Wichtige Voraussetzungen sind auch eine gute thermische und mechanische Stabilität sowie eine große effektive Oberfläche um eine große Menge an Enzym binden zu können. Form und Größe der Trägerpartikel bestimmen, wie gut das Präparat abgetrennt und recycelt werden kann.
- **Effizienz der Immobilisationsmethode** Es soll möglichst viel Enzym an das Trägermaterial gebunden werden, wobei die Aktivität des Enzyms nur wenig beeinträchtigt werden soll.
- **Stabilität unter Einsatz- und Lagerbedingungen** Wünschenswert sind eine gute thermische Stabilität sowie eine gute Funktionsweise über einen weiten pH-Wert Bereich und unter Einsatz organischer Lösungsmittel.

- **Produktivität** Es soll möglichst viel Produkt pro Masseneinheit an immobilisiertem Enzym gewonnen werden, eine lange Lebensdauer des Enzympräparats ist entscheidend für die Wirtschaftlichkeit des Prozesses.

Tab. 2.1.: Beispiele für Kombinationen aus verschiedenen Trägermaterialien, Immobilisierungsmethoden und Enzymen.

	Trägermaterial	Bindungstyp	Enzym	Referenz
Anorganische Träger	Kieselgel	Adsorption	Lipase	[111]
	Aluminiumoxid	Adsorption	Lipase	[111, 112]
		kovalente Kopplung mit Trichlorazin	Penicillin G Acylase	
	poröse Gläser	kovalente Kopplung mit Aminopropyltriethoxysilan	Glucose Oxidase, Glutamatdehydrogenase	[113]
natürlich vorkommende organische Träger	Cellulose	kovalente Kopplung durch Tosylierung	Lipase	[114, 115]
		ionische Bindung	Invertase	
	Chitosan	kovalente Kopplung mit Glutardialdehyd	Urease	[116]
	Dextran, Agarose	kovalente Kopplung mit Cyanbromid	Trypsin	[117]
synthetische organische Träger	Polyvinylalkohol Fasern	ionische Bindung	Invertase	[118]
	Nylon Fasern	kovalente Kopplung mit Benzochinon bzw. Glutardialdehyd	Glucose Oxidase	[119]
	Polyethylen-terephthalat Fasern	kovalente Kopplung mit Methacrylsäure bzw. Acrylamid	Urease	[120]

Enzyme können auf vielfältige Art und Weise auf einem Trägermaterial immobilisiert werden. Die einfachste Methode ist dabei die schlichte Adsorption über attraktive van der Waals- und Coulomb-Wechselwirkungen. Der Vorteil dieser Methode liegt neben dem geringen präparativen Aufwand in dem Umstand, dass das immobilisierte Enzym oft nur geringfügig an Aktivität gegenüber dem freien Enzym in Lösung einbüßt. Der Nachteil besteht in der häufig schlechten mechanischen Stabilität, das heißt, das Enzym kann unter den Reaktionsbedingungen wieder vom Trägermaterial gelöst werden. Deshalb werden Enzyme meist kovalent an das Trägermaterial angebunden. Die für eine chemische

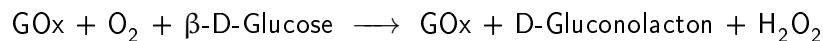
Reaktion infrage kommenden funktionellen Gruppen eines Enzyms sind die Aminogruppen der Aminosäureseitenketten von Lysin, die Carboxylgruppen von Asparaginsäure und Glutaminsäure, die schwefelhaltigen Seitenketten von Cystein und Methionin, sowie die aromatischen Gruppen von Tyrosin, Histidin und Tryptophan. Die entsprechenden Reaktionen sind dann z. B. die Acylierung von Aminogruppen mit aktivierten Carboxylgruppen des Trägermaterials, Quervernetzung von Aminogruppen mit Glutardialdehyd (Ausbildung Schiff'scher Basen), Addition von Thiolatgruppen an Maleimidfunktionen oder auch die Komplexbildung von Metallionen durch die Imidazolreste der Aminosäure Histidin. Weitere Methoden zur Immobilisation sind z. B. die direkte Copolymerisation des Enzyms mit dem Trägermaterial und Einschluss in kolloidale Sol-Gele. Beispiele für die verschiedenen Kombinationen von Trägermaterialien, Kopplungsreaktionen und immobilisierten Enzymen finden sich in Tabelle 2.1.

Häufig verringert sich infolge der Immobilisation die Aktivität der Enzyme im Vergleich zum nativen Enzym in Lösung. Dieser Nachteil kann etwa durch eine verbesserte Thermostabilität ausgeglichen werden, wie am Beispiel von immobilisiertem Papain gezeigt werden konnte [121]. Durch Immobilisation kann ferner auch das pH-Optimum eines Enzyms verschoben werden. So liegt beispielsweise der optimale pH-Wert der enzymatischen Aktivität der β -Galactosidase für das gelöste Enzym bei etwa $\text{pH} = 3.0$ und verschiebt sich nach $\text{pH} = 4.0$ wenn das Enzym an Zirkoniumoxid gebunden wird [122]. In einigen Fällen kann sogar eine deutliche Erhöhung der spezifischen Aktivität eines immobilisierten Enzyms im Vergleich zum gelösten Enzym beobachtet werden. Kobayashi et al. konnten dies anhand von Lipase zeigen, die auf verschiedene SAM-Beschichtungen auf Gold abgeschieden wurde [123]. Das auf eine aminoterminierte Oberfläche adsorbierte Enzym wies eine 300 mal höhere Aktivität als die entsprechende Menge an gelöstem Enzym auf.

2.5. Das Modellprotein - Glucose Oxidase

2.5.1. Allgemeine Informationen

Glucose Oxidase (GOx) ist ein dimeres Flavoenzym, das hauptsächlich aus Schimmelpilzen wie *Aspergillus niger* und *Penicillium amagasakiense* gewonnen wird. Es katalysiert in Anwesenheit von Sauerstoff die Umsetzung von Glucose zu Gluconolacton und Wasserstoffperoxid:



Tab. 2.2.: Die wichtigsten biophysikalischen Eigenschaften von Glucose Oxidase [124, 125].

Struktur	Homodimer, 605 Aminosäuren pro Untereinheit
Enzymtyp	Flavin-abhängige Oxidoreduktase
Molekülmasse	131 kDa
isoelektrischer Punkt	pI = 5.02
Größe einer Untereinheit	67.5 x 67.5 x 216.4 Å
Sekundärstruktur	34 % α -Helix, 23 % β -Faltblatt, 43 % ungeordnete Strukturen

Die wichtigsten biophysikalischen Daten sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Industriell wird GOx unter anderem zur Gluconsäureherstellung oder als Konservierungsstoff in Nahrungsmitteln verwendet. Hauptsächlich dient das Enzym jedoch als Biosensor für Glucose und findet sich z. B. immobilisiert auf Diabetes-Teststreifen [126]. GOx ist als Lyophilisat sehr stabil und kann sogar mehrere Jahre bei - 20 °C gelagert werden, ohne dass das Enzym merklich an Aktivität verliert. Es ist deshalb auch ein beliebtes Modellprotein in der biochemischen und biophysikalischen Forschung. Akhtar et al. studierten beispielsweise den dissoziierenden Effekt von hochkonzentrierten, divalenten Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} auf das Enzym [127]. In der Literatur sind auch zahlreiche Experimente zur Immobilisierung von GOx auf den unterschiedlichsten Substraten beschrieben. Atia und El-Batal konnten zeigen, dass die thermische Stabilität und pH-Wert Toleranz von GOx gegenüber dem nativen Enzym in Lösung verbessert werden kann, wenn es mittels γ -Bestrahlung in ein Copolymer aus Poly(vinylalkohol) und Poly(acrylamid) eingeschlossen wird [128].

Pescador et al. untersuchten die katalytische Effizienz von GO_x/HRPO-Coadsorbaten auf polyelektrolytbeschichteten SiO₂-Mikropartikeln [129]. Für das optimierte System konnte im Vergleich zu den freien Enzymen eine 2.5 mal höhere Umsatzrate an Wasserstoffperoxid detektiert werden.

2.5.2. Enzymkinetik

Die Kinetik der durch GO_x katalysierten Reaktion kann mit Hilfe der nach Leonor Michaelis und Maud Menten benannten *Michaelis-Menten-Theorie* beschrieben werden [130]. Bei kleinen Substratkonzentrationen [S] ist die Reaktionsgeschwindigkeit v proportional zu [S], die Reaktion ist also 1. Ordnung bzgl. [S]. Bei zunehmender Konzentration an Substrat, aber gleich bleibender Konzentration an Enzym, geht die Reaktion in einen Bereich gebrochener Ordnung zwischen 1 und 0 über. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen wird die Reaktionsgeschwindigkeit schließlich konstant, hier ist die Reaktion also 0. Ordnung bzgl. [S]. Trägt man v gegen [S] auf, so erhält man eine inverse Hyperbel (Abb. 2.9).

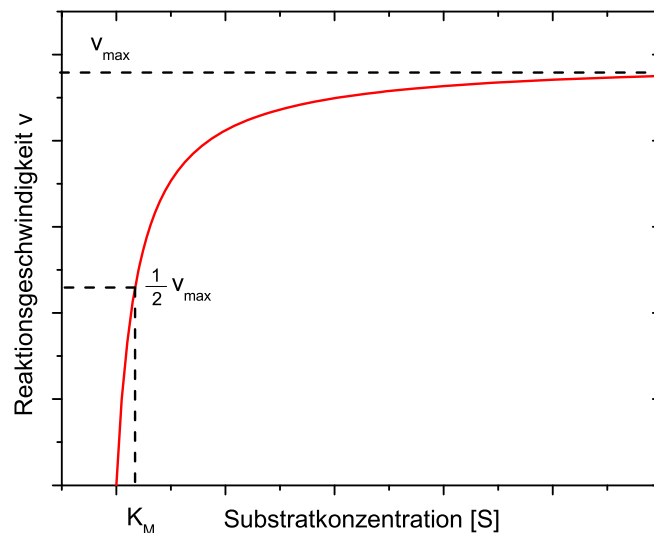
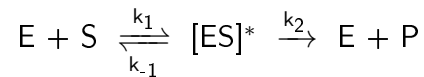


Abb. 2.9.: Michaelis-Menten-Kinetik: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Dieser Sättigungseffekt wurde zuerst von Henri (1903) durch die Annahme der Bildung eines Komplexes aus Enzym E und Substrat S als vorgelagerte Reaktion gedeutet. Er

nahm an, dass der Komplex im Gleichgewicht mit den Ausgangsstoffen steht und dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Enzymreaktion der Zerfall des Komplexes in die Reaktionsprodukte P sei. Der einfachste Mechanismus dieser Art lässt sich folgendermaßen formulieren:



Die Teilreaktion zum Enzym-Substrat-Komplex $[ES]^*$ wird dabei als reversibel betrachtet. Die Konzentrationsänderungen mit der Zeit lassen sich durch die folgenden vier Differentialgleichungen ausdrücken:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1 [E] [S] + k_{-1} [ES]^* \quad (2.1a)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1 [E] [S] + k_{-1} [ES]^* + k_2 [ES]^* \quad (2.1b)$$

$$\frac{d[ES]^*}{dt} = k_1 [E] [S] - k_{-1} [ES]^* - k_2 [ES]^* \quad (2.1c)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES]^* \quad (2.1d)$$

Nach einer kurzen Anlaufphase ist $[ES]^*$ für einen längeren Zeitraum konstant, d. h.

$$\frac{d[ES]^*}{dt} = 0$$

Man bezeichnet dies als *quasistationären Zustand*. Unter der Annahme, dass die Summe der Konzentrationen an freiem Enzym $[E]$ und Enzym im Enzym-Substrat-Komplex $[ES]^*$ gleich der Anfangskonzentration des Enzyms $[E]_0$ ist, folgt aus Gleichung 2.1d für die Produktbildungsgeschwindigkeit:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES]_{\text{stat.}}^* = \frac{k_2 k_1 [E]_0 [S]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_2} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{[S] + (k_{-1} + k_2)/k_1} \quad (2.2)$$

Mit Einführung der Michaelis-Menten-Konstante

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

vereinfacht sich die Gleichung 2.2 zu:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{[S] + K_M} \quad (2.3)$$

Bei sehr hohen Substratkonzentrationen gilt $[S] \gg K_M$. In diesem Fall folgt aus Gleichung 2.3, dass die Reaktionsgeschwindigkeit einen Maximalwert erreicht:

$$v_{\max} = k_2 [E]_0 \quad (2.4)$$

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} und die Michaelis-Menten-Konstante K_M können direkt aus dem Funktionsgraphen von v gegen $[S]$ abgelesen werden (Abb. 2.9). K_M ist die Substratkonzentration, bei der gerade die halbe Maximalgeschwindigkeit erreicht wird. Sie ist ein wichtiges Maß für die Substrataffinität eines Enzyms. Je kleiner K_M , desto stärker bindet das Enzym sein Substrat. Ist K_M groß, so ist das Enzym eher unspezifisch gegenüber seinem Substrat.

3. Analytische Methoden

3.1. Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Die Bestrahlung von Materie mit Infrarotlicht (IR, $\lambda = 0.78 - 15 \mu\text{m}$) führt zur Anregung von Molekülrotationen und -schwingungen [131]. Die Wellenlängen, bei denen IR-Licht absorbiert wird, sind molekülgruppenspezifisch, so dass mit Hilfe der IR-Spektroskopie Informationen über den Aufbau des Moleküls gewonnen werden können. Während Rotationsbanden nur in der Gasphase aufgelöst werden können, können Schwingungsspektren sowohl von Flüssigkeiten, als auch von Festkörpern erhalten werden. Ein typisches Schwingungsspektrum wird im Bereich von $2.5 - 15 \mu\text{m}$ aufgezeichnet (mittleres Infrarot, MIR). Es ist in der IR-Spektroskopie üblich, nicht die Wellenlänge anzugeben, sondern deren reziproken Wert in cm^{-1} , der - physikalisch nicht ganz korrekt - *Wellenzahl* $\tilde{\nu}$ genannt wird. Zeichnet man die Intensität des eingestrahnten IR-Lichts gegen die Wellenlänge bzw. Wellenzahl auf, so erhält man ein Spektrum mit charakteristischen Absorptionsbanden, deren Flächeninhalte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz der Konzentration sowie der Schichtdicke der Probe proportional sind:

$$E = \epsilon \cdot [c] \cdot d = \log \frac{I_0}{I} \quad (3.1)$$

E:	Extinktion
ϵ :	molarer Extinktionskoeffizient, wellenlängenabhängig $\left[\frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}\right]$
c:	Konzentration der Probe $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
d:	Schichtdicke [cm]
I_0 :	einfallende Strahlungsintensität bei einer bestimmten Wellenlänge
I:	Strahlungsintensität nach Durchgang durch die Probe

Da sowohl in der Umgebungsluft Moleküle wie Wasser oder Kohlendioxid enthalten sind, die IR-Strahlung absorbieren, als auch organische Kontaminationen auf der Geräteoptik zu erwarten sind, die ebenfalls zu Absorptionsbanden im Spektrum führen, muss das eigentliche Probenspektrum immer durch Division durch diesen Hintergrund korrigiert werden.

Die wichtigsten Bauteile eines IR-Spektrometers sind die folgenden Komponenten:

- **Strahlungsquelle** Als Strahlungsquelle verwendet man für den nahen und mittleren Infrarotbereich einen Global (Siliciumcarbid) oder Nernst-Stift (Hartkeramik aus Seltenerdmetalloxiden). Mit einer Betriebstemperatur von 1400 – 2300 K handelt sich hierbei um thermische Strahler, die polychromatisches Licht ähnlich der Schwarzkörperstrahlung erzeugen.
- **Optik** Die Spiegel zur Strahlführung und -fokussierung sind meist aus einem Stück gefertigt und fest installiert, so dass ein Nachjustieren nicht nötig ist. Die Spiegel sind mit Gold bedampft, das im IR-Bereich eine hohe Reflektivität aufweist.
- **Dispersives Element** Die Zerlegung der polychromatischen Strahlung in ihre einzelnen Wellenlängen erfolgt in dispersiv arbeitenden Geräten durch Beugung an einem Gitter, hinter dem sich ein Spalt befindet. Durch Drehen des Gitters kann die Wellenlänge der Strahlung, die den Spalt passiert, verändert werden. Solche Gitterspektrometer sind heute allerdings kaum noch im Einsatz und überwiegend durch wesentlich exakter und schneller arbeitende Fourier-Transform-IR-Spektrometer abgelöst, deren genaue Funktionsweise weiter unten beschrieben wird.
- **Detektor** Als Standarddetektoren für die Routineanalytik sind DTGS-Detektoren (DTGS: deuteriertes Triglycinsulfat) sehr weit verbreitet. DTGS ist ein Ferroelektrikum, das unterhalb einer bestimmten Temperatur (Curie-Temperatur) spontan elektrisch polarisiert. Verändert sich die auf den Detektor auftreffende Strahlungsleistung, so führt dies zu einer Änderung der Polarisation, die sich nach außen als Spannungsstoß zeigt. Das so erzeugte elektrische Signal wird verstärkt und ausgewertet. Ein solcher pyroelektrischer Sensor hat den Vorteil, dass er bei einer Betriebstemperatur von etwa - 40 °C, die durch elektrische Kühlung mittels eines Peltier-Elements erreicht werden kann, und innerhalb einer großen spektralen Bandbreite arbeitet. Für Spezialanwendungen, bei denen sehr kleine Analytmengen detektiert werden sollen, ist jedoch sein Signal-zu-Rausch-Verhältnis meist nicht ausreichend. Hier kommen Halbleiterdetektoren zum Einsatz, die nach dem inneren Fotoeffekt arbeiten. Die Fotoleitung im halbleitenden Festkörper kommt durch die Zunahme beweglicher Ladungsträger zustande, indem Elektronen durch eingestrahlte Photonen vom Valenzband in das energetisch höher gelegene Leitungsband wechseln. Die elektrische Leitfähigkeit ist dann abhängig von der eingestrahnten Energie bzw. Wellenlänge. Der Detektorchip befindet sich beim Halbleiterdetektor in einem evakuierten Dewargefäß und muss mit flüssigem Stickstoff auf eine Betriebstemperatur von ca. 80 K gekühlt werden. Die gebräuchlichsten Materialien

für solche Detektorchips sind Quecksilber-Cadmium-Tellurid (engl. mercury cadmium telluride, MCT), Indiumantimonid oder Bleisulfid. Die spektrale Bandbreite ist abhängig vom Chipmaterial und deutlich eingeschränkter als bei pyroelektrischen Detektoren. Eine größere Bandbreite geht immer zu Lasten des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses. MCT-Detektoren z. B. weisen jedoch gegenüber DTGS-Detektoren ein um 1 bis 2 Größenordnungen besseres Signal-zu-Rauschverhältnis auf. Ferner erlaubt die geringere Ansprechzeit eine etwa 4 – 5 mal schnellere Spektrenaufzeichnung.

Das Herzstück eines *Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometers (FTIR-Spektrometer)* ist das Michelson-Interferometer, dessen Aufbau in Abbildung 3.1 schematisch dargestellt ist [132].

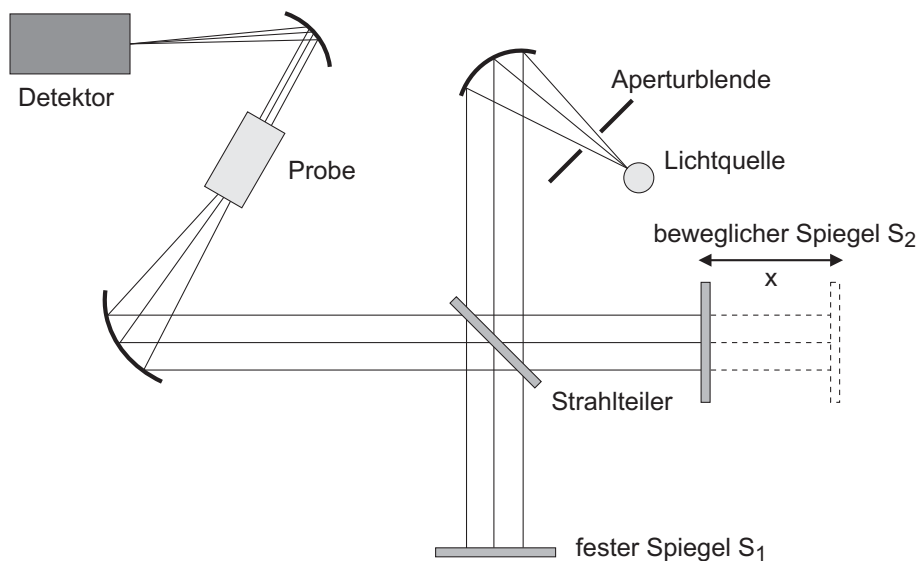


Abb. 3.1.: Schematischer Aufbau eines Michelson-Interferometers.

Es besteht aus zwei zueinander senkrecht stehenden Spiegeln, von denen einer fest montiert (S_1) und einer mit konstanter Geschwindigkeit verschiebbar ist (S_2). Im 45° -Winkel zu beiden Spiegeln befindet sich ein halbdurchlässiger Strahlteiler (meist Germanium auf einen Träger aus Kaliumbromid aufgedampft), der im Idealfall die auftreffende IR-Strahlung zu 50 % auf S_1 transmittiert und zu 50 % auf S_2 reflektiert. Die beiden Teilstrahlen werden an S_1 und S_2 zum Strahlteiler zurück reflektiert und überlagern sich dort. Je nach Position des Spiegels S_2 legen also die beiden Teilstrahlen eine unterschiedliche optische Weglänge zurück und man erhält ein entsprechendes Interferenzmuster, wenn man die Strahlungsintensität I gegen die Spiegelauslenkung x aufträgt. Unter der Annahme, dass zum Zeitpunkt der Nullauslenkung ($x = 0$) beide Spiegel den gleichen Abstand

zum Strahlteiler haben, folgt die Oszillation des Messsignals einer Kosinusfunktion:

$$I'(x) = \frac{1}{2} \cdot I(\tilde{\nu}) \cdot [1 + \cos(2\pi\tilde{\nu}x)] \quad (3.2)$$

- $\tilde{\nu}$: reziproke Wellenlänge der einfallenden Strahlung [cm^{-1}]
 $I(\tilde{\nu})$: Intensität der Strahlung bei $\tilde{\nu} = \lambda^{-1}$
 x : Auslenkung des Spiegels S_2

Aufgezeichnet wird jedoch nur der veränderliche Teil des Signals, das *Interferogramm*:

$$I(x) = \frac{1}{2} \cdot I(\tilde{\nu}) \cdot \cos(2\pi\tilde{\nu}x) \quad (3.3)$$

Da in der Funktion 3.3 nur eine Wellenlänge betrachtet wird, muss für den Fall der polychromatischen Strahlungsquelle noch über alle eingestrahlten Wellenlängen integriert werden. Das eigentliche Spektrum $B(\tilde{\nu})$ wird nun nicht direkt gemessen, sondern durch eine *Fourier-Transformation (FT)* des Interferogramms errechnet:

$$I(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\tilde{\nu}) \cdot [\cos(2\pi\tilde{\nu}x) + i \cdot \sin(2\pi\tilde{\nu}x)] d\tilde{\nu};$$

$$B(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(x) \cdot [\cos(2\pi\tilde{\nu}x) + i \cdot \sin(2\pi\tilde{\nu}x)] dx \quad (3.4)$$

- $B(\tilde{\nu})$: Intensität der Strahlung mit $\tilde{\nu} = \lambda^{-1}$ unter Berücksichtigung der Gerätekorrektur (Intensitätsverluste infolge von Reflexionen an Spiegeln, etc.)

$I(x)$ und $B(\tilde{\nu})$ sind ein *Fourier-Transformations-Paar*. Die Abbildung 3.2 zeigt einige einfache Beispiele für die FT eines Interferogramms in das zugehörige Spektrum. In der Abbildung ist a) das FT-Paar einer monochromatischen Strahlungsquelle dargestellt, b) bzw. c) zeigen die Überlagerung von 2 bzw. 9 Kosinuswellen unterschiedlicher Frequenz und Amplitude und in d) ist schließlich eine Absorptionsbande in Form einer Lorentz-Kurve bei einer bestimmten Wellenzahl mit ihrem korrespondierendem Interferogramm dargestellt.

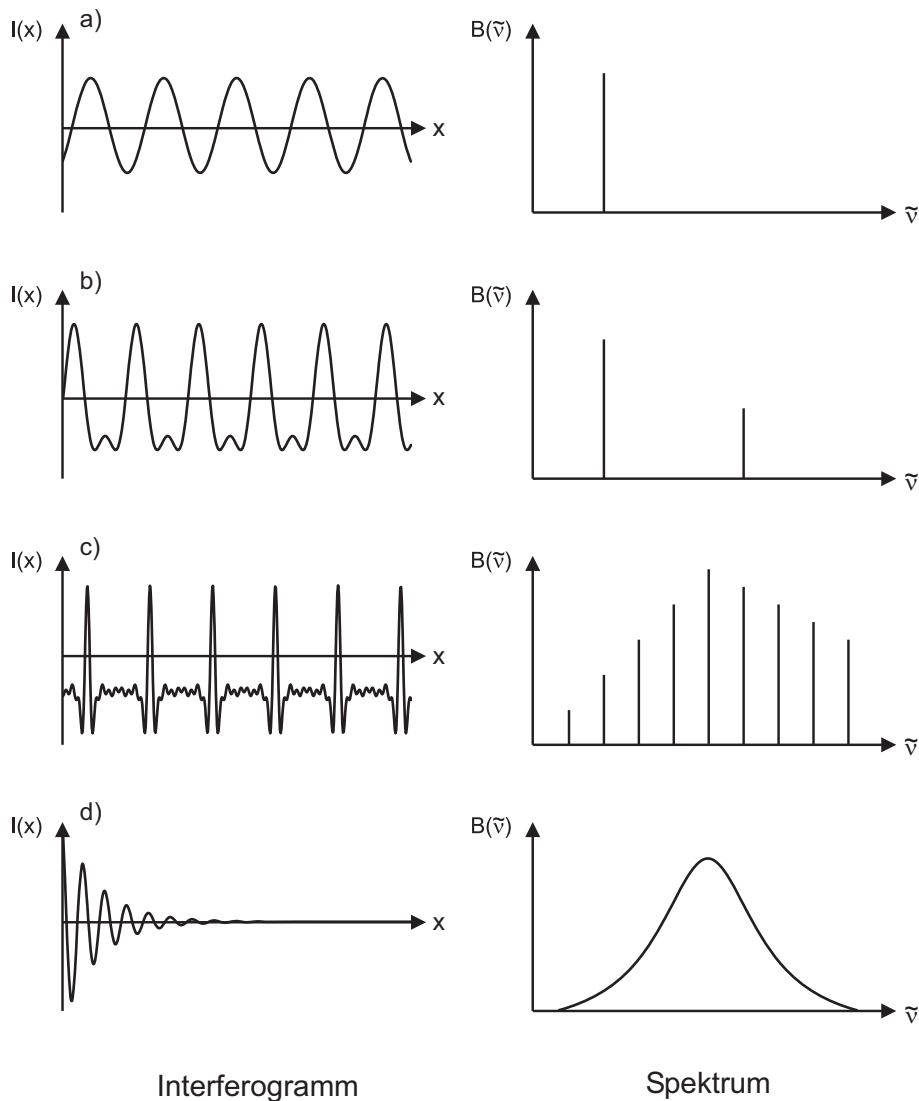


Abb. 3.2.: Interferogramme einiger einfacher Spektren.

Die Imaginärteile der Integrale in Gleichung 3.4 ergibt nach Einsetzen der Integrationsgrenzen Null, da die Stammfunktionen (Gl. 3.3) achsensymmetrisch sind. Diese Tatsache ist unter anderem ein wichtiger Test dafür, ob das Interferometer richtig optisch justiert ist, da für ein unsymmetrisches Interferogramm die Gleichung 3.4 nicht mehr ohne den Imaginärteil gelöst werden kann. Zu Justagezwecken wird parallel zur IR-Strahlung das Signal eines He-Ne-Lasers mit einer genau bekannten Wellenlänge in das Interferometer eingekoppelt. Die Nulldurchgänge des Interferenzmusters der Laserstrahlung definieren sehr genau die Position des beweglichen Spiegels. Hieraus ergibt sich der erste von 3 wesentlichen Vorteil der FTIR-Technik gegenüber dispersiven Spektrometern:

- **Connes Vorteil** FTIR-Spektrometer zeichnen sich aufgrund der lasergestützten Kalibration durch eine hohe Wellenzahlengenauigkeit aus.
- **Jaquinot-Vorteil** In FTIR-Spektrometern werden anstelle von Spaltöffnungen kreisförmige Aperturblenden verbaut. Dies ermöglicht einen sehr viel höheren Strahldurchsatz und führt zu einem deutlich verbesserten Signal-zu-Rausch-Verhältnis.
- **Multiplex- oder Fellgett-Vorteil** Aufgrund der Tatsache, dass ein FTIR-Gerät immer alle Wellenlängen gleichzeitig misst, sind bei gleichem Signal-zu-Rausch-Verhältnis die Messzeiten sehr viel kürzer als bei dispersiv arbeitenden Spektrometern. Durch Akkumulation und Mittelung vieler Interferogramme kann das Rauschen deutlich verringert werden.

Nun fällt auf, dass Gleichung 3.3 von $-\infty$ bis $+\infty$ integriert wird, die Spiegelauslenkung x des Interferometers aber auf jeden Fall nur einen endlichen Wert $x_{\max} = \pm L$ erreichen kann. Das spektrale Auflösungsvermögen ist von der Spiegelauslenkung wie folgt abhängig:

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{|L|}$$

Das heißt in der praktischen Anwendung, je größer der Spiegelhub, desto höher die Auflösung. An den Stellen $-L$ und $+L$ wird das Interferogramm abgeschnitten bzw., mathematisch ausgedrückt, mit einer Rechteckfunktion $D(x)$ multipliziert:

$$B'(\tilde{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I'(x) \cdot D(x) \cdot \cos(2\pi\tilde{\nu}x) dx = F\{I'(x) \cdot D(x)\} \quad (3.5)$$

$$\text{mit } D(x) = \begin{cases} 1 & \text{für } -L \leq x \leq +L \\ 0 & \text{für } x > L \end{cases}$$

Die FT des Produktes zweier Funktionen ist gleich der Faltung der Fourier-Transformierten jeder einzelnen der beiden Funktionen:

$$B'(\tilde{\nu}) = F\{I'(x)\} * F\{D(x)\} = B(\tilde{\nu}) * f(\tilde{\nu})$$

Mit $f(\tilde{\nu})$ als der Fourier-Transformierten der Rechteckfunktion $D(x)$:

$$F\{D(x)\} = f(\tilde{\nu}) = \frac{2 \cdot L \cdot \sin(2\pi\tilde{\nu}L)}{2\pi\tilde{\nu}L} = 2 \cdot L \cdot \text{sinc}(2\pi\tilde{\nu}L) \quad (3.6)$$

$$\text{mit } \text{sinc}(x) = \frac{\sin(x)}{x}$$

Die Form einer einzelnen Spektrallinie an der Stelle $\tilde{\nu}_1$ errechnet sich schließlich aus der Faltung des Spektrums B' an der Stelle $\tilde{\nu}_1$ mit der Funktion 3.6. Die Faltung einer solchen sinc-Funktion mit einer Spektrallinie führt zum Auftreten von unerwünschten Seitenbanden, die keine reale spektrale Information beinhalten. Um diese Störsignale zu minimieren, kann das Interferogramm noch vor der FT gemäß Gleichung 3.5 mit einer anderen sogenannten *Apodisierungsfunktion*, anstelle der Rechteckfunktion, multipliziert werden [133]. Es ist jedoch zu beachten, dass die Reduktion von Seitenbanden immer auf Kosten der spektralen Auflösung geht, d. h. die resultierende Absorptionslinie hat eine größere Halbwertsbreite. Einige häufig benutzte Apodisierungsfunktionen finden sich in Abbildung 3.3.

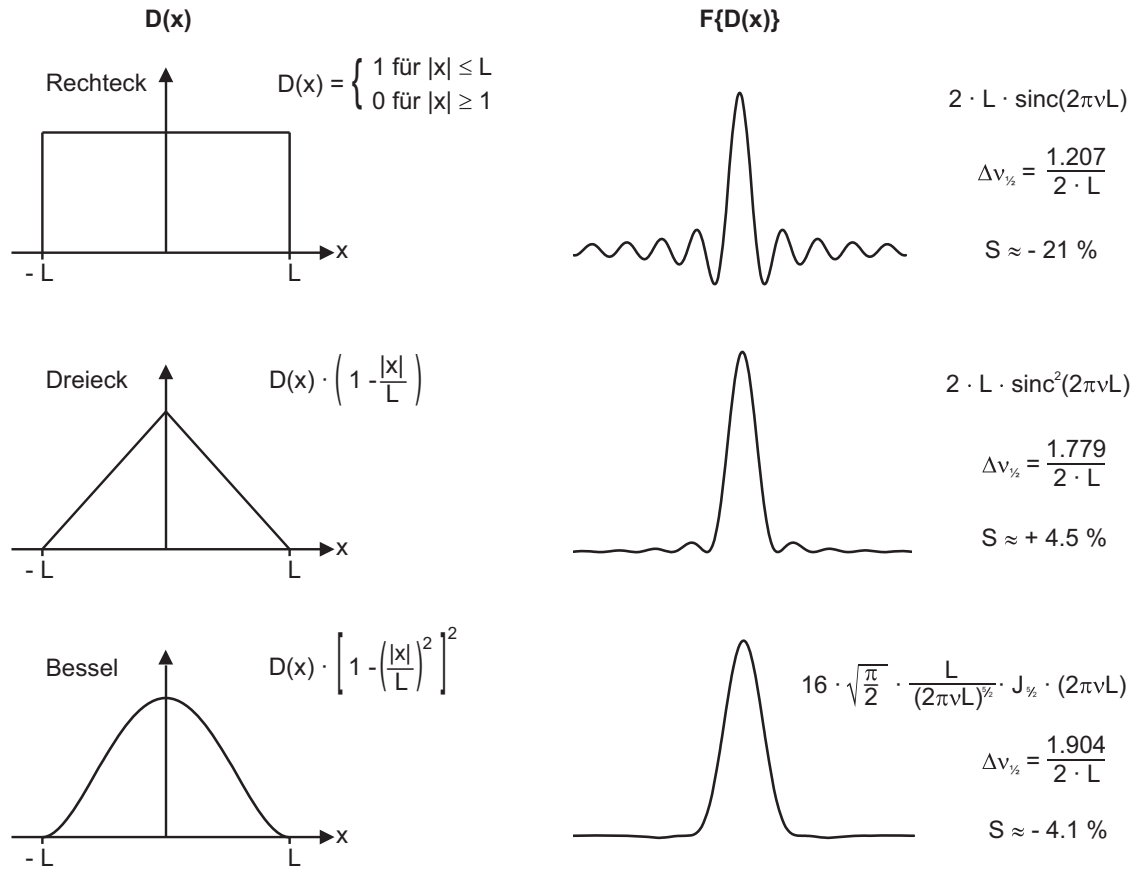


Abb. 3.3.: Häufig benutzte Apodisierungsfunktionen. Bei der Bessel-Apodisierung ist nicht die Apodisierungsfunktion selbst, sondern deren Fourier-Transformierte eine Bessel-Funktion. ($\Delta\tilde{\nu}_{\frac{1}{2}}$: Halbwertsbreite der Spektrallinie, S: Amplitude der größten Seitenbande in Prozent des Hauptmaximums) [132].

3.1.1. Fourier-Selbstentfaltung

Die Verbreiterung einer Spektrallinie wird nicht nur durch Gerätemerkmale wie Spiegelauslenkung oder Aperturblenden verursacht. Es gibt auch eine natürliche Linienbreite, die von der Lebensdauer des angeregten Schwingungszustandes abhängig ist. Diese begründet sich auf der Heisenberg'schen Unschärferelation und ergibt im Linien-Profil eine Lorentz-Kurve mit der Halbwertsbreite $2 \cdot \sigma$:

$$E(\tilde{\nu}) = \frac{\sigma}{\sigma^2 + (\tilde{\nu} - \tilde{\nu}_0)^2} \quad (3.7)$$

- $E(\tilde{\nu})$: Extinktion in Abhängigkeit von der Wellenzahl
- $2 \cdot \sigma$: Halbwertsbreite der Absorptionsbande
- $\tilde{\nu}_0$: Wellenzahl am Maximum der Absorptionsbande

Die Lebensdauer des angeregten Schwingungszustandes wird weiterhin von intramolekularen Stößen verringert und hängt somit auch vom Aggregatzustand der Probe sowie von Druck und Temperatur ab. Infolgedessen wächst auch die Halbwertsbreite der Lorentz-Kurve.

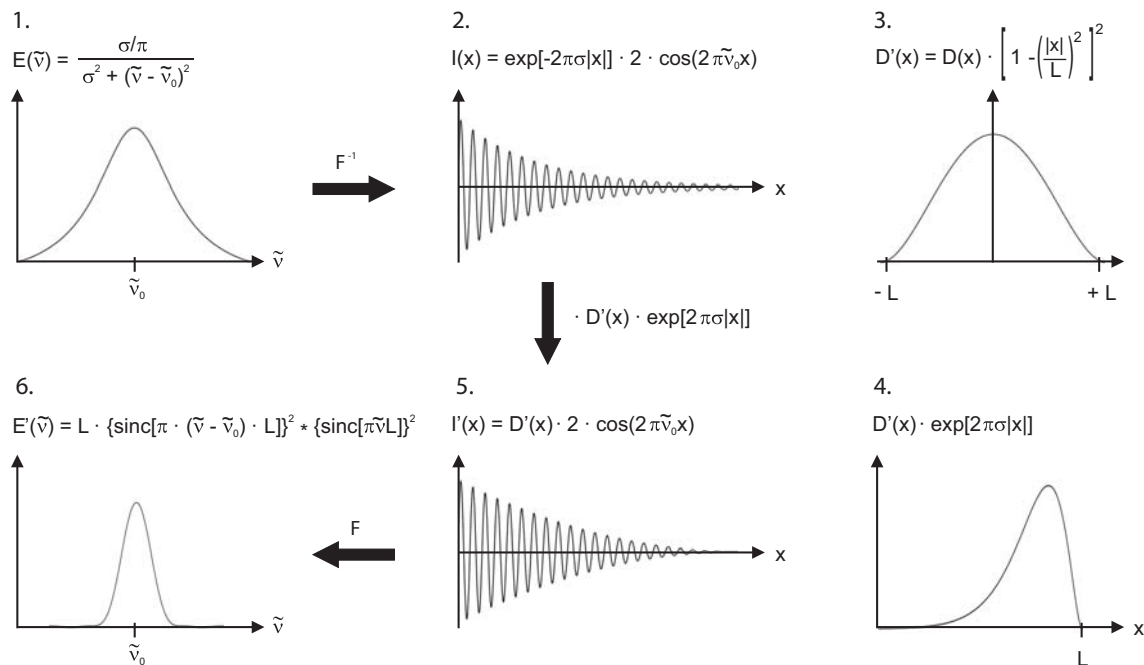


Abb. 3.4.: Ablauf der Fourier-Selbstentfaltung einer Lorentz-Kurve mit dem Beispiel einer Bessel-Apodisierung. $D(x)$ ist die unter Gleichung 3.6 beschriebene Rechteckfunktion [134].

Wenn nun eine Reihe von Absorptionsbanden so dicht nebeneinander liegen, dass sie unter gegebenen Bedingungen nicht mehr aufgelöst werden können, kann man mit Hilfe der *Fourier-Selbstentfaltung* (engl. Fourier self deconvolution, FSD) das aufgezeichnete Spektrum so bearbeiten, dass die überlagerten Spektrallinien sichtbar werden [81, 132, 134]. Das Prinzip der FSD ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

Der Ablauf der FSD ist wie folgt:

1. Ausgangspunkt ist die unter Gleichung 3.7 beschriebene Spektrallinie in Form einer Lorentz-Kurve mit der Halbwertsbreite $2 \cdot \sigma$.
2. Diese wird einer inversen Fourier-Transformation unterzogen. Das Ergebnis ist eine exponentiell abklingende Kosinusfunktion.
3. Das Interferogramm (2) der Lorentz-Funktion (1) wird mit einer neuen Gewichtungsfunktion multipliziert, z. B. einer quadrierten Dreiecksfunktion.
4. Die Funktion (3) wird durch die einhüllende Exponentialfunktion des Interferogramms (2) geteilt.
5. Das Interferogramm (2) der ursprünglichen Spektrallinie wird mit der Funktion (4) multipliziert.
6. Das resultierende, neue Interferogramm wird schließlich wieder Fourier-transformiert und ergibt eine neue Spektrallinie mit verringerter Halbwertsbreite. Bei mehreren, überlagerten Absorptionsbanden wirkt sich die FSD gleichermaßen aus, so dass eine verbesserte spektrale Auflösung resultiert.

3.1.2. Reflexionstechniken

Der einfachste Messmodus der IR-Spektroskopie ist es, den IR-Lichtstrahl in Transmission unter senkrechtem Einfall durch die Probe zu leiten. Ein Gas wird hierfür in ein ca. 10 cm langes Quarzrohr eingefüllt, das mit zwei IR-transparenten Fenstern (z. B. aus NaCl oder CaF_2) verschlossen ist, Feststoffe werden mit Kaliumbromid verrieben und zu einer dünnen Tablette gepresst und Flüssigkeiten werden als dünner Film zwischen zwei IR-durchlässige Fenster gebracht. Bereits bei Vermessung von Flüssigkeiten stellt sich jedoch häufig das Problem, dass viele Substanzen sehr große Extinktionskoeffizienten im IR-Bereich aufweisen und demnach gemäß Gleichung 3.1 die Probenschichtdicke sehr dünn, d. h. im Bereich von wenigen μm , sein muss. Die gegenteilige Problematik tritt bei Adsorbaten auf Festkörperoberflächen auf: auf Halbleiteroberflächen können diese in Transmission gemessen werden, solange die Adsorbatschichtdicke noch im μm -Bereich liegt, organische Monolagen, die nur wenige nm dick sind, liefern hingegen eine zu geringe Signalstärke.

Metallsubstrate sind für die Transmissionsspektroskopie gänzlich ungeeignet, da IR-Licht sehr stark mit dem freien Elektronengas wechselwirkt und Metalle für IR-Strahlung somit undurchlässig sind. Analyten, die auf eine Oberfläche aufgetragen sind, aber auch stark absorbierende Flüssigkeiten, werden daher meist mit Hilfe von Reflexionstechniken vermessen.

3.1.2.1. Die Eigenschaften von Transversalwellen

Der Feldstärkenverlauf einer ebenen, harmonischen, elektromagnetischen Welle lässt sich durch folgende Gleichung beschreiben*:

$$E(z, t) = E_0 \cdot \sin \left[\omega t - \left| \vec{k} \right| z + \varphi \right] \quad (3.8)$$

$$\text{mit } \omega = \frac{2\pi c}{n\lambda} \quad \text{und} \quad \left| \vec{k} \right| = \frac{2\pi}{\lambda}$$

- $E(z, t)$: zeitlich veränderliches elektrisches Feld mit der Ausbreitungsrichtung z
- E_0 : Amplitude des elektrischen Feldes
- ω : Kreisfrequenz
- \vec{k} : Wellenvektor
- z : Ausbreitungsrichtung
- t : Zeit
- z : Ausbreitungsrichtung der Welle
- λ : Wellenlänge
- n : Brechungsindex des Mediums, in dem die Welle sich ausbreitet
- c : Vakuumlichtgeschwindigkeit ($c = 2.99792458 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}$)
- φ : Phasenverschiebung

Eine *Transversalwelle* ist durch zwei Richtungsvektoren charakterisiert: den Wellenvektor \vec{k} , der in Ausbreitungsrichtung zeigt, und den Feldvektor, der bei Transversalwellen immer senkrecht auf dem Wellenvektor steht (Abb. 3.5). Dies lässt jedoch im dreidimensionalen Raum noch einen Freiheitsgrad offen, nämlich die Rotation des Feldvektors um den Wellenvektor. Licht heißt *linear polarisiert*, wenn sich die Spitze des Feldvektors auf einer

*Hier ist nur der Verlauf des elektrischen Feldes angegeben, der Verlauf des magnetischen Feldes verhält sich analog.

Geraden bewegt, es heißt *zirkular polarisiert*, wenn die Spitze des Feldvektors in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung eine Kreisbahn beschreibt und es heißt *elliptisch polarisiert*, wenn sich der Feldvektor in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung auf einer Ellipse bewegt.

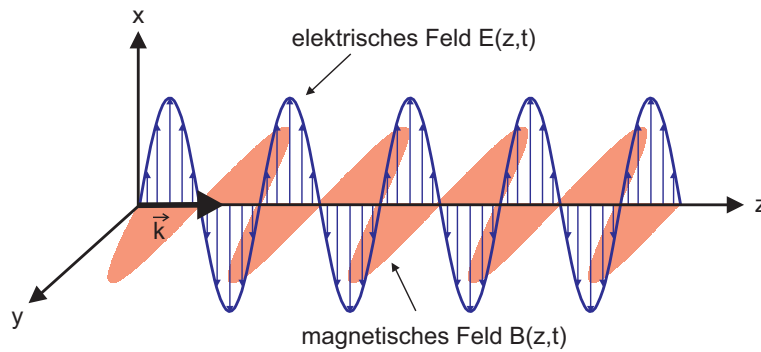


Abb. 3.5.: Elektrisches Feld $E(z,t)$ und magnetisches Feld $B(z,t)$ einer in z-Richtung propagierenden Welle mit dem Wellenvektor \vec{k} und den Feldvektoren der elektrischen Feldkomponente in blau eingezeichnet.

Wenn nun Licht auf die Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes n_1 und n_2 trifft, so wird es teilweise reflektiert und teilweise transmittiert. Der Ausfallswinkel nach der Reflexion bleibt dabei gleich dem Einfallswinkel α . Der Winkel β , unter dem die Welle in das Medium 2 transmittiert wird, hängt von den Brechungsindizes der beiden Materialien ab. Ist $n_1 < n_2$, so ist $\beta < \alpha$, d. h. die Welle wird zum Einfallslot hin gebrochen. Ist jedoch $n_1 > n_2$, so ist auch $\beta > \alpha$ und die Welle wird vom Einfallslot weg gebrochen (Abb. 3.6).

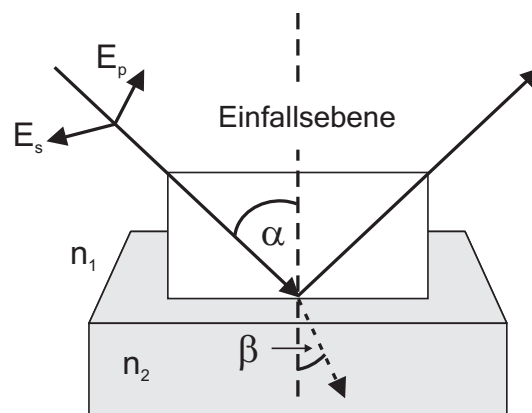


Abb. 3.6.: Reflexion und Brechung eines Lichtstrahls, der von einem optisch dünneren auf ein optisch dichteres Medium fällt ($n_1 < n_2$). Die elektrischen Feldkomponenten E_s und E_p stehen senkrecht bzw. parallel zur Einfallsebene, diese steht senkrecht zur reflektierenden Grenzfläche.

Der Winkel β lässt sich nach dem Snellius'schen Brechungsgesetz berechnen:

$$n_1 \cdot \sin(\alpha) = n_2 \cdot \sin(\beta) \quad (3.9)$$

Bei der Reflexion eines Lichtstrahls ist es weiterhin sinnvoll die elektrischen Feldkomponenten senkrecht bezüglich der Einfallsebene polarisiert E_s und parallel zur Einfallsebene polarisiert E_p zu unterscheiden. Die Einfallsebene steht hierbei senkrecht zur reflektierenden Grenzfläche und enthält den Wellenvektor \vec{k} der einfallenden Welle. Als Reflektivität einer Substanz ist das Verhältnis zwischen dem reflektierten und transmittierten Anteil des einfallenden Lichts definiert. Sie wird, getrennt nach s- und p-Polarisation, durch das Betragsquadrat der Fresnel-Koeffizienten wiedergegeben [135]:

$$r_s = \frac{n_1 \cdot \cos(\alpha) - n_2 \cdot \cos(\beta)}{n_1 \cdot \cos(\alpha) + n_2 \cdot \cos(\beta)}; \quad r_p = \frac{n_2 \cdot \cos(\alpha) - n_1 \cdot \cos(\beta)}{n_2 \cdot \cos(\alpha) + n_1 \cdot \cos(\beta)} \quad (3.10)$$

$$R_s = |r_s|^2; \quad R_p = |r_p|^2$$

- r_s : Fresnel-Koeffizient für senkrecht polarisiertes Licht
- r_p : Fresnel-Koeffizient für parallel polarisiertes Licht
- R_s : Reflexionsvermögen für senkrecht polarisiertes Licht
- R_p : Reflexionsvermögen für parallel polarisiertes Licht
- α : Einfallswinkel
- β : Winkel, unter dem die Strahlung in das Medium 2 transmittiert wird

Für kleine Einfallswinkel sind die Reflektivitäten der s- und p-Komponenten R_s und R_p annähernd gleich, dann ist jedoch mit zunehmendem Einfallswinkel die Reflektivität für eine s-polarisierte Lichtwelle stets größer als die Reflektivität von p-polarisiertem Licht (Abb. 3.7). Wird ein Lichtstrahl an der Grenzfläche vom optisch dünneren Medium zum optisch dichteren Medium reflektiert, so spricht man von *externer Reflexion*. Die umgekehrte Situation wird *interne Reflexion* genannt.

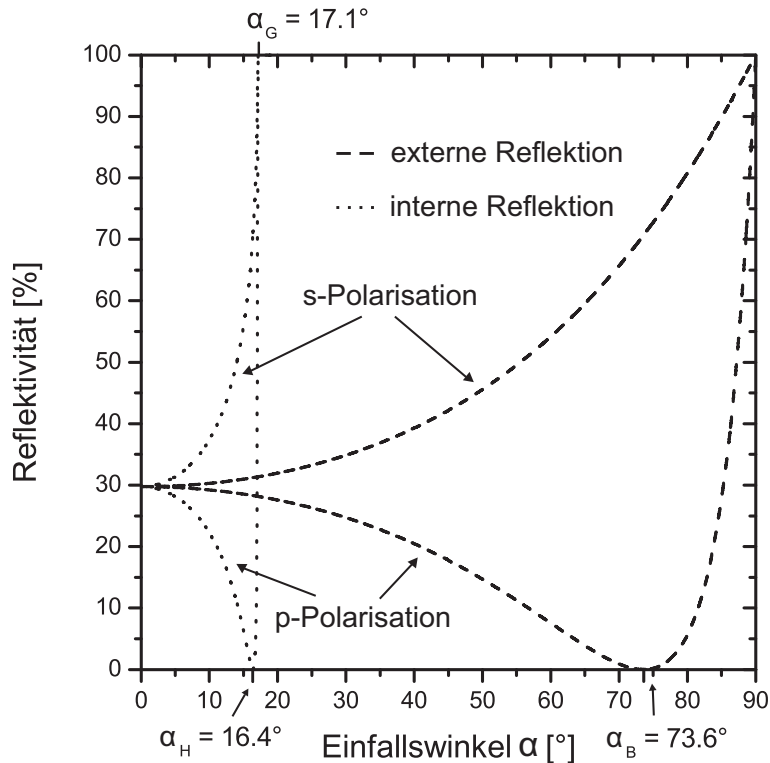


Abb. 3.7.: Reflektivität für senkrecht und parallel polarisiertes Licht in Abhängigkeit vom Einfallswinkel an der Grenzfläche Luft - Silicium bei einer Wellenlänge von $10 \mu\text{m}$ ($n_1 = n(\text{Luft}) = 1.0$, $n_2 = n(\text{Si}) = 3.4$).

In beiden Fällen durchläuft R_p jeweils ein Minimum um danach steil bis auf 100 % anzusteigen. Bei externer Reflektion geschieht dies am *Brewster-Winkel* α_B , bei interner Reflektion ist das Minimum als *Hauptwinkel* α_H definiert. Trifft der Lichtstrahl von der Seite des optisch dichteren Mediums auf die Grenzfläche, so wird β mit steigendem Einfallswinkel immer größer, bis der gebrochene Strahl schließlich parallel zur Grenzfläche verläuft und nicht mehr in das optisch dünnere Medium transmittiert wird. Dies ist der Grenzfall der *Totalreflexion* mit dem zugehörigen Grenzwinkel α_G . Die 3 Winkel werden wie folgt berechnet:

$$\tan(\alpha_B) = \frac{n_2}{n_1}; \quad \tan(\alpha_H) = \frac{n_1}{n_2}; \quad \sin(\alpha_G) = \frac{n_1}{n_2} \quad (3.11)$$

mit $n_1 < n_2$

α_B : Brewster-Winkel
 α_H : Haupt-Winkel
 α_G : Grenzwinkel der Totalreflektion

Bislang wurde von einfachen Brechungsindices n_i ausgegangen, die keine Absorption des jeweiligen Materials im betrachteten Wellenlängenbereich berücksichtigen. Der Brechungsindex ist jedoch eine komplexe Größe

$$N = n + i \cdot k$$

wobei n das Verhältnis der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Lichtwelle im Vakuum zur Ausbreitungsgeschwindigkeit im betreffenden Medium angibt. Der Extinktionskoeffizient k ist ein Maß für die Dämpfung der Intensität I der Lichtwelle im Material infolge von Absorption:

$$I(z) = I_0 \cdot e^{-\frac{4\pi k z}{\lambda}} \quad (3.12)$$

I_0 : einfallende Strahlungsintensität bei einer bestimmten Wellenlänge
 $I(z)$: Intensität der Lichtwelle in Ausbreitungsrichtung z
 k : Extinktionskoeffizient
 z : Ausbreitungsrichtung der Lichtwelle
 λ : Wellenlänge

Die Auswirkung auf die Reflektivität eines Materials, das bei einer gegebenen Wellenlänge absorbiert ($k \neq 0$), ist in Abbildung 3.8 für externe Reflexion zu sehen. Auffälligstes Merkmal ist, dass die Kurve für die p-polarisierte Lichtkomponente am Brewster-Winkel zwar immer noch ein Minimum durchläuft, jedoch nicht mehr auf $R = 0$ fällt.

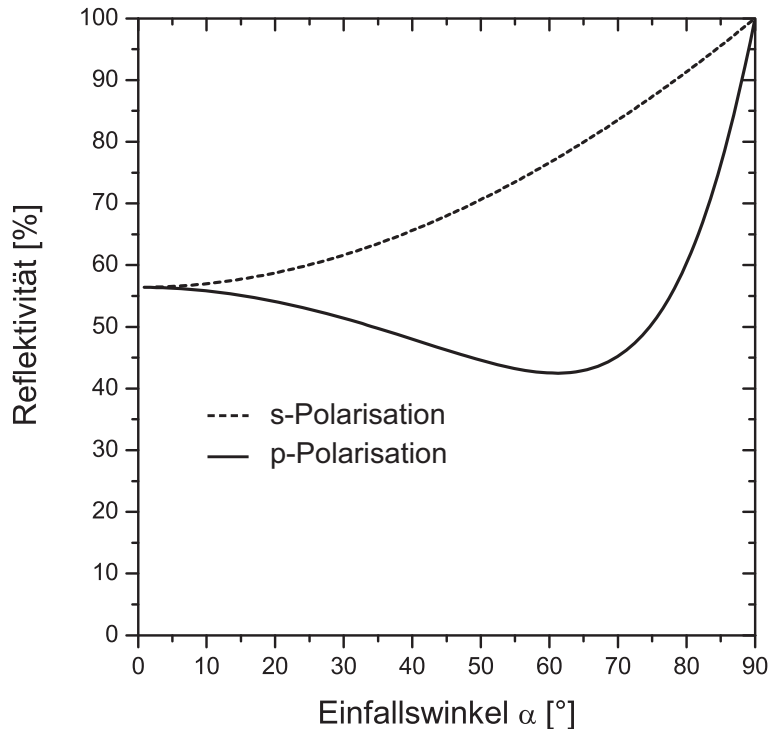


Abb. 3.8.: Reflektivität für senkrecht und parallel polarisiertes Licht in Abhängigkeit vom Einfallswinkel an der Grenzfläche Luft - Gold bei einer Wellenlänge von $10 \mu\text{m}$ ($k(\text{Au}) \neq 0$) in externer Reflexion.

3.1.2.2. Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie

Werden Oberflächenadsorbate in externer Reflexion vermessen, so spricht man von *Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie (IRRAS)*. Während der Messstrahl unter konstantem Einfallswinkel am Metall- oder Halbleitersubstrat reflektiert wird, durchläuft er zwei mal den darauf befindlichen Analyten. Je flacher der Winkel, unter dem der IR-Strahl auf die Probe trifft, desto größer wird die effektive Schichtdicke des Adsorbats, die er durchdringt. Die Empfindlichkeit der IRRAS reicht damit aus, um IR-Spektren selbst monomolekular dünner Filme mit Schichtdicken von einigen wenigen nm messen zu können. Zu beachten bei Nichtmetallsubstraten ist jedoch, dass ein Einfallswinkel ungleich dem Brewsterwinkels gewählt wird, da ansonsten die p-polarisierte Komponente der IR-Welle vollständig in das Substrat transmittiert wird.

Bei Reflexion an Metalloberflächen, wird deren freies Elektronengas zu Schwingungen angeregt, die exakt entgegengesetzt der s-polarisierten Komponente der einfallenden Welle polarisiert sind (Abb. 3.9).

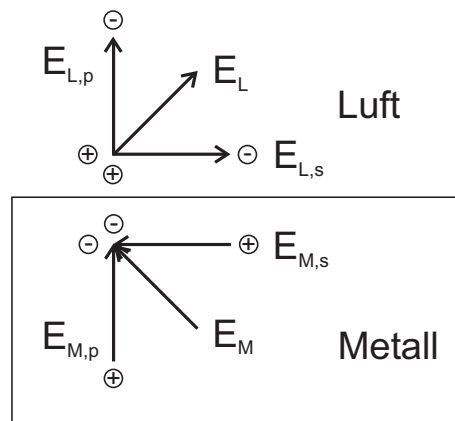


Abb. 3.9.: IRRAS-Oberflächenauswahlregel für Metalloberflächen: Nur der p-polarisierte Anteil der einfallenden elektromagnetischen Welle kann mit dem Adsorbat wechselwirken [136]. $E_{L,p}$ und $E_{L,s}$ sind die p- bzw. s-polarisierten Feldkomponenten an Luft, $E_{M,p}$ und $E_{M,s}$ sind die p- bzw. s-polarisierten Feldkomponenten im Metall.

Durch diese induzierten Spiegelladungen wird der s-polarisierte Anteil des anregenden E-Feldes ausgelöscht, wohingegen der p-polarisierte Anteil verstärkt wird. Mit der IRRAS an Metalloberflächen können demzufolge nur Molekülschwingungen angeregt werden, die parallel zur Einfallsebene und damit senkrecht zur Oberfläche gerichtet sind (IRRAS-Oberflächenauswahlregel). Diesen Effekt kann man sich zu Nutze machen um Molekülorientierungen von Oberflächenadsorbaten zu bestimmen. Ferner bietet sich an, mit Hilfe eines Polarisators den s-Anteil des IR-Lichts aus dem Messstrahl zu filtern, da dieser nur unnötigen „Energieballast“ und somit zusätzliches Rauschen am Detektor erzeugen würde, jedoch keine spektralen Informationen liefert.

3.1.2.3. Abgeschwächte Totalreflexion

Bei der *internen Reflexionsspektroskopie* (engl. attenuated total reflection spectroscopy, ATR-Spektroskopie) trifft der Messstrahl von der Seite des optisch dichteren Mediums aus auf den Analyten. Senkrecht zur Grenzfläche bilden sich infolge einer Überlagerung von einfallendem und reflektiertem Strahl stehende Wellen mit der Wellenlänge

$$\lambda_G = \frac{\lambda_M}{\cos(\alpha)} \quad (3.13)$$

- λ_G : Wellenlänge der stehenden Welle senkrecht zur reflektierenden Grenzfläche im optisch dichteren Medium
 λ_M : Wellenlänge im optisch dichteren Medium
 α : Einfallswinkel

Obwohl das IR-Licht bei einem Einfallswinkel $\alpha > \alpha_G$ (Gl. 3.11) vollständig reflektiert wird, ergibt sich unmittelbar aus den Stetigkeitsbedingungen der Maxwell'schen Gleichungen, dass die Tangentialkomponenten der oben beschriebenen, stehenden Wellen beim Übertritt von Medium 1 in das Medium 2 den gleichen Wert haben müssen. Infolgedessen muss trotz Totalreflexion auch im optisch dünneren Medium noch ein elektrisches Feld vorhanden sein [135, 137]. Die Amplitude des E-Feldes im optisch dünneren Medium folgt jedoch keinem oszillierenden Verlauf mehr (Gl. 3.8), sondern klingt mit dem Abstand z von der Grenzfläche exponentiell ab, man spricht von einem *evaneszenten Feld*:

$$E(z) = E_0 \cdot e^{-\frac{z}{d_p}} \quad (3.14)$$

- $E(z)$: elektrische Feldstärke in Abhängigkeit des Abstands z von der reflektierenden Grenzfläche
 E_0 : elektrische Feldstärke bei $z = 0$ [$\frac{V}{m}$]
 d_p : Eindringtiefe des evaneszenten Feldes [m]

Die Eindringtiefe d_p des evaneszenten Feldes in das optisch dünnere Medium liegt im Bereich der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts und ist definiert als der Abstand zur reflektierenden Grenzfläche, an dem der Wert E_z/E_0 auf e^{-1} abgeklungen ist [138]:

$$d_p = \frac{\lambda_M}{2\pi \cdot \sqrt{\sin^2(\alpha) - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad (3.15)$$

- λ_M : Wellenlänge der einfallenden Strahlung
 α : Einfallswinkel
 n_1 : Brechungsindex des optisch dichteren Mediums
 n_2 : Brechungsindex des optisch dünneren Mediums

Das evaneszente Feld spaltet an der Grenzfläche zwischen optisch dichterem und optisch dünnerem Medium in 3 Komponenten entlang der Achsen eines rechtshändigen Koordinatensystems bezüglich der Grenzfläche auf:

$$E_{x0} = \frac{2 \cdot \cos(\alpha) \cdot (\sin^2(\alpha) - n_{21}^2)^{1/2}}{(1 - n_{21}^2)^{1/2} \cdot [(1 + n_{21}^2) \cdot \sin^2(\alpha) - n_{21}^2]^{1/2}} \quad (3.16a)$$

$$E_{y0} = \frac{2 \cdot \cos(\alpha)}{(1 - n_{21}^2)^{1/2}} \quad (3.16b)$$

$$E_{z0} = \frac{2 \cdot \sin(\alpha) \cdot \cos(\alpha)}{(1 - n_{21}^2)^{1/2} \cdot [(1 + n_{21}^2) \cdot \sin^2(\alpha) - n_{21}^2]^{1/2}} \quad (3.16c)$$

mit $E_p = \left(|E_{x0}|^2 + |E_{z0}|^2\right)^{1/2}$ und $E_s = E_{y0}$

- E_{x0}, E_{y0}, E_{z0} : Komponenten der elektrischen Feldstärke bezüglich der 3 Raumachsen an der reflektierenden Grenzfläche
- E_p, E_s : Komponenten des elektrischen Feldes, die parallel bzw. senkrecht zur Einfallsebene stehen
- n_{21} : Verhältnis der Brechungsindices von optisch dünnerem (n_2) und optisch dichterem Medium (n_1)
- α : Einfallswinkel

Es kann, genau wie eine oszillierende Welle, mit Substanzen, die sich im Bereich der Eindringtiefe d_p im optisch dünneren Medium befinden, wechselwirken. Das heißt letztendlich, dass in dieser Geometrie Absorptionsspektroskopie betrieben werden kann. Hierzu verwendet man Einkristalle aus IR-durchlässigen Halbleitermaterialien wie Zinkselenid, Germanium oder Silicium, die zu prismen-, halbkugel-, halbzylinder- oder trapezförmigen Reflexionselementen verarbeitet sind. Die Abbildung 3.10 zeigt oben noch einmal den Verlauf der elektromagnetischen Welle vor und nach Passieren der reflektierenden Grenzfläche. Unten ist der schematische Aufbau eines ATR-Spektroskopie-Experiments unter Verwendung einer Halbkugel bzw. eines Trapezes als Reflexionselement abgebildet. Der Vorteil einer Halbkugel bzw. eines Halbzylinders besteht darin, dass der Einfallswinkel frei gewählt werden kann. Durch die runde Kristalloberfläche ist gewährleistet, dass der Lichtstrahl immer annähernd senkrecht auftrifft, so dass keine weitere Brechung berücksich-

sichtigt werden muss. Wird das IR-Licht hingegen in ein Trapez eingekoppelt, so trifft es zwar unter einem fixen Einfallswinkel (meist 45°) auf die totalreflektierende Grenzfläche, aber das Strahlenbündel wird auf dem Weg durch den Kristall mehrfach reflektiert, was in einer Verstärkung des Messsignals resultiert.

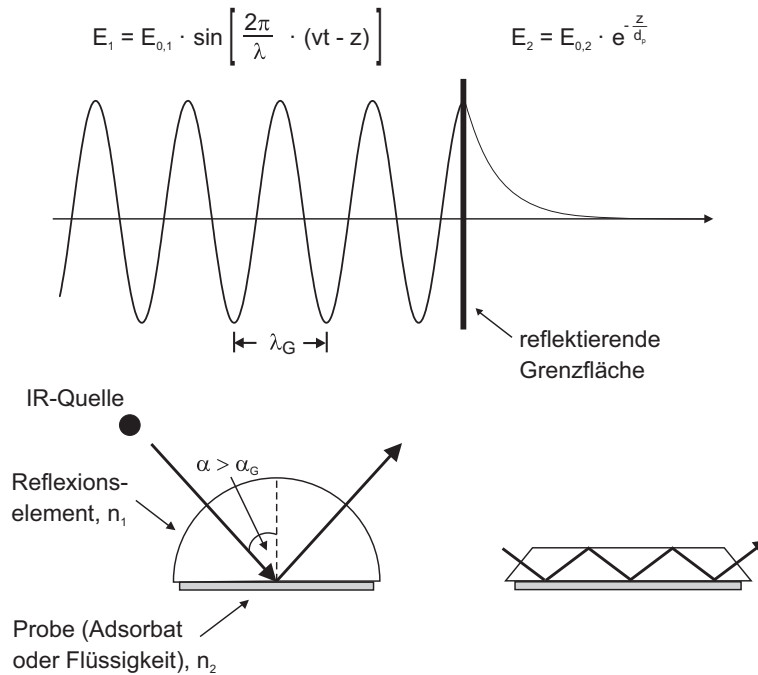


Abb. 3.10.: Oben: Verlauf der elektromagnetischen Welle zu beiden Seiten der reflektierenden Grenzfläche. Unten: Halbkugelförmiges Reflexionselement für Messungen unter variablem Einfallswinkel bzw. trapezförmiges Reflexionselement für Mehrfachreflexion unter festem Einfallswinkel.

Der größte Vorteil der ATR-Spektroskopie ist, dass die effektive Probenschichtdicke allein durch die optischen Eigenschaften des Systems bestimmt wird. Misst man in der Nähe des Grenzwinkels α_G und/oder sind die Brechungsindices n_1 und n_2 sehr ähnlich, so wird nach Gleichung 3.15 die Eindringtiefe d_p groß und damit ist auch die effektiv analysierte Probenschichtdicke groß. Diese Konfiguration eignet sich besonders gut um gering konzentrierte Analyten in Flüssigkeiten zu spektroskopieren. Möchte man hingegen Vorgänge untersuchen, die sich direkt an der Grenzfläche zwischen beiden Medien abspielen, so sollte man ein Reflexionselement mit einem deutlich größerem Brechungsindex als dem des Probenmaterials wählen. Dann wird, wie mit Hilfe der Gleichung 3.11 errechnet werden kann, auch der Grenzwinkel α_G klein. Ein Einfallswinkel, der sehr viel größer als α_G ist und ein kleiner Quotient aus n_2 und n_1 können d_p auf wenige 100 nm reduzieren und erlauben eine extrem oberflächensensitive Spektroskopie.

3.1.3. Infrarot-Spektroskopie an Proteinen

Die erste Veröffentlichung zur IR-spektroskopischen Untersuchung an Proteinen datiert bereits auf 1950. Elliot und Ambrose nahmen Spektren von synthetischen Polypeptiden auf und konnten anhand der Bandenlage eindeutig zwischen α -Helix- und β -Faltblatt-Konformation unterscheiden. Es dauerte allerdings noch mehr als 30 Jahre und bedurfte der Etablierung der FTIR-Spektroskopie bis Anfang der 1980er Jahre Kauppinen et al. erstmals die Fourier-Selbstentfaltung (FSD) zur detaillierten Auswertung von IR-Spektren im Allgemeinen vorstellten [134]. Susi und Byler zeigten kurze Zeit später die Anwendbarkeit der FSD auf Proteinspektren und es gelang ihnen, die Sekundärstruktur zahlreicher globulärer Proteine in wässriger Lösung aufzuklären [80, 81]. Charakteristisch für Proteinspektren sind vor allem die Schwingungsmoden der Polypeptidbindungen (Amid-Bindungen), über die Tabelle 3.1 einen Überblick gibt.

Tab. 3.1.: Charakteristische IR-Banden der Peptidbindung [139].

Amid	$\tilde{\nu}_{\max}$ [cm^{-1}]	Zuordnung der Schwingung
A	3300	N-H (ν)
B	3100	N-H (ν)
I	1650	C=O (ν) 80 %; N-H (δ_i) 10 %; C-N (ν) 10 %
II	1550	N-H (δ_i) 60 %; C-N (ν) 40 %
III	1300	C-N (ν) 40 %; N-H (δ_i) 30 %; C-C (ν) 20 %; C=O (δ_i) 10 %
V	725	N-H (δ_a); C-N (τ)
IV	625	C=O (δ_a) 40 %; C-C (ν) 30 %; C-N-C (δ_a) 30 %
VI	600	C=O (δ_a); C-N (τ)
VII	200	N-H (δ_a); C-N (τ); C=O (δ_a)

Abkürzungen: $\tilde{\nu}_{\max}$ Hauptmaximum der Absorptionsbande, ν Streckschwingung, δ_i Deformationsschwingung in der Ebene der Amidbindung, δ_a Deformationsschwingung aus der Ebene der Amidbindung, τ Torsionsschwingung.

Zur Sekundärstrukturanalyse wird meist die Amid-I-Bande mit einem Hauptmaximum bei ca. 1650 cm^{-1} herangezogen. Diese Spektralbande wird hauptsächlich durch die Anregung der Streckschwingung der Peptid-Carbonylgruppen verursacht. Diese stehen im gefalteten Protein über Wasserstoffbrückenbindungen mit benachbarten Aminogruppen in Wechselwirkung. Je nachdem, ob eine Peptidbindung sich nun in einer α -Helix, einem

Tab. 3.2.: Zuordnung von Peptidschwingungsbanden verschiedener Konformationen im Amid-I-Bereich [80].

Sekundärstrukturelement	Amid-I-Bande [cm^{-1}]
β -Faltblatt	1625 – 1635 (s), 1675 – 1680 (w)
α -Helix	1650 – 1655 (s)
β - und γ -Schleifen	1660 – 1670 (v), 1685 – 1695 (w)
ungeordnete Strukturen	1640 – 1645 (s)

Abkürzungen: s stark, w schwach, variabel.

β -Faltblatt, β - bzw. γ -Schleifen oder ungeordneten Strukturen befindet, hat die exakte Resonanzfrequenz der Carbonylbindung einen etwas anderen Wert. Die Amid-I-Bande ist also eine Überlagerung vieler einzelner Spektrallinien, die nur mit Hilfe der FSD aufgelöst werden können. Die Zuordnung der einzelnen Sekundärstrukturelemente zu ihren jeweiligen Schwingungsbanden findet sich in Tabelle 3.2.

Im Amid-I-Bereich absorbieren neben den Peptid-Carbonylgruppen noch einzelne Aminosäureseitenketten, jedoch sind die Extinktionskoeffizienten dieser Schwingungen um einige Größenordnungen kleiner, als die der Peptidbindungen, so dass dies bei der Spektralauswertung nicht berücksichtigt werden muss [140]. Die IR-Spektroskopie eignet sich sehr gut um β -Faltblätter vorher zu sagen. Diese liefern starke und unverwechselbare Absorptionsbanden im Bereich von $1630 - 1640 \text{ cm}^{-1}$, sowie eine etwas weniger intensive Bande im Bereich um 1675 cm^{-1} . Problematisch wird die Dateninterpretation jedoch, wenn Proteine mit hohem α -Helix-Gehalt untersucht werden. In der Tabelle 3.2 sind nur die durchschnittlichen Resonanzmaxima der α -helicalen und ungeordneten Strukturen angegeben, häufig sind diese Banden jedoch um einige Wellenzahlen verschoben, so dass sie bei sehr ähnlichen Wellenzahlen zu finden sind. Alternative Methoden zur Sekundärstrukturbestimmung, wie etwa die CD-Spektroskopie (vgl. Kap. 2.4.2) führen in diesem Fall zu deutlich besseren Ergebnissen. Die Abbildung 3.11 zeigt schließlich am Beispiel eines ATR-Spektrums von Lysozym in wässriger Pufferlösung, wie mittels FSD die Feinstruktur der Amid-I-Bande aufgelöst werden kann. Um die einzelnen Sekundärstrukturelemente zu quantifizieren, wurden hier Gauß-Profile an die Feinstruktur angepasst.

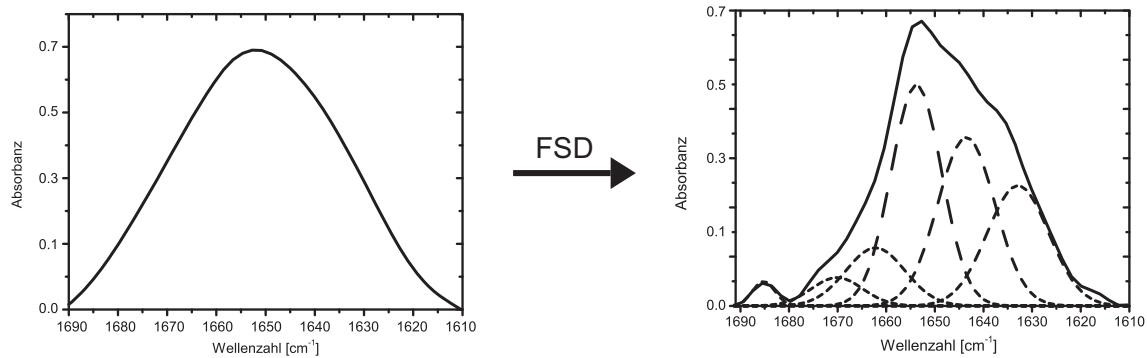


Abb. 3.11.: Amid-I-Bande von Lysozym vor (links) und nach (rechts) der FSD mit angepassten Gauß-Kurven zur quantitativen Auswertung der Sekundärstruktur.

3.2. Ellipsometrie

Die *Ellipsometrie* ist eine Methode zur Bestimmung der Schichtdicke dünner Oberflächenadsorbate. Dabei wird definiert (in der Regel linear) polarisiertes Licht auf die Probenoberfläche gestrahlt und dessen Polarisations- und Intensitätsänderung nach erfolgter Reflexion gemessen. Der Name der Methode rührt daher, dass das reflektierte Licht im allgemeinen elliptisch polarisiert ist.

3.2.1. Vielfachreflexion an Mehrschichtsystemen

Wird Licht an einer Oberfläche mit einer Adsorbatschicht der Dicke d reflektiert, findet Mehrfachreflexion an den Grenzflächen zwischen Medium 1 mit dem Brechungsindex N_1 (in der Regel Luft, $N_1 = 1$), Medium 2 mit dem Brechungsindex N_2 und Medium 3 mit dem Brechungsindex N_3 statt, und das gesamte reflektierte Licht ist somit eine Überlagerung der reflektierten Teilstrahlen (Abb. 3.12).

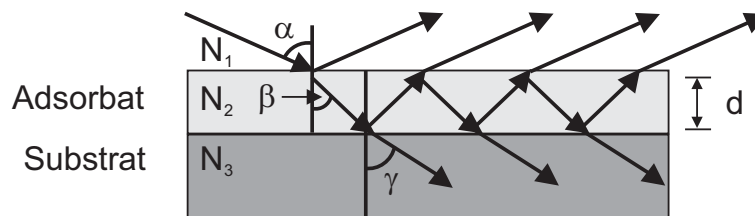


Abb. 3.12.: Reflexion und Transmission bei einem System mit einer Zwischenschicht.

Einfallswinkel, α , β und γ , sind wieder über das Snellius'sche Brechungsgesetz (Gl. 3.9) mit den jeweiligen Brechungsindizes verknüpft. Die Fresnel-Koeffizienten (vgl. Gl. 3.10) sehen mit der zusätzlichen, absorbierenden Schicht (Medium 2 in Abb. 3.12) so aus:

$$r_s = \frac{r_s^{12} + r_s^{23} \cdot e^{-i2\varphi}}{1 + r_s^{12} \cdot r_s^{23} \cdot e^{-i2\varphi}} \quad r_p = \frac{r_p^{12} + r_p^{23} \cdot e^{-i2\varphi}}{1 + r_p^{12} \cdot r_p^{23} \cdot e^{-i2\varphi}} \quad (3.17)$$

$$\text{mit } \varphi = 2 \cdot \pi \cdot \left(\frac{d}{\lambda} \right) \cdot N_2 \cdot \cos(\beta)$$

Eine Welle, die das Adsorbat durchläuft und am Substrat (Medium 3) reflektiert wird, erfährt im Vergleich zu einer Welle, die direkt an der Grenzfläche zwischen Luft und Adsorbat reflektiert wird, einen Phasenunterschied von $2 \cdot \varphi$.

3.2.2. Die Messgrößen der Ellipsometrie

Die Amplituden der s- bzw. p-polarisierten Komponente der Lichtwelle werden sich bei Reflexion am betrachteten Dreischichtsystem unterschiedlich stark abschwächen. Dies kann anhand der Fresnel-Koeffizienten berechnet werden. Aus deren Verhältnis ist die erste Messgröße der Ellipsometrie definiert:

$$\tan(\Psi) = \frac{|r_p|}{|r_s|}$$

Die elektrischen Wellen parallel und senkrecht zur Einfallsebene stehen vor der Reflexion an der Probenoberfläche in einer festen Phasenbeziehung δ_1 zueinander. Bei der Reflexion werden sich die Phasen der beiden Wellen unterschiedlich stark verschieben, so dass es nach der Reflexion zu einem Phasenunterschied δ_2 zwischen s- und p-Welle kommt. Die Phasenverschiebung Δ aufgrund der Reflexion beträgt also

$$\Delta = \delta_2 - \delta_1$$

und ist letztendlich auch dafür verantwortlich, dass das eingestrahlte linear polarisierte Licht nach Reflexion an der Probe elliptisch polarisiert ist. Δ und Ψ sind die Werte, die ein Ellipsometer misst. Sind Δ und Ψ bestimmt, sind der Einfallswinkel des Lichts, die Brechungsindizes der optischen Medien und die Schichtdicke des Films die verbleibenden

Unbekannten. Zur Berechnung des Brechungsindex der Adsorbatschicht wird meist ein Cauchy-Modell angenommen, das von einem mit der Wellenlänge quadratisch abfallenden Brechungsindex des Filmmaterials ausgeht [141]:

$$n(\lambda) = n_0 + \frac{A}{\lambda^2} \quad (3.18)$$

- n_0 : Brechungsindex für den Grenzfall großer Wellenlängen
A: Cauchy-Parameter

Das Modell ist eine gute Näherung, solange das Filmmaterial im fraglichen Spektralbereich nicht absorbiert. Einfallswinkel und der Brechungsindex vom Substrat können durch Kalibration des Geräts gegen ein System mit bekannten optischen Eigenschaften eliminiert werden, die Schichtdicke des Adsorbats ist das gesuchte Messergebnis.

3.3. Rasterelektronenmikroskopie

Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops ergibt sich nach Abbe zu

$$s \geq \frac{\lambda}{n \cdot \sin\alpha} \quad (3.19)$$

- s: auflösbare Bildpunktabstände
 λ : Lichtwellenlänge
n: Brechungsindex des Mediums (Objektiv)
 α : halber Öffnungswinkel des Objektivs

wobei die Größe $n \cdot \sin\alpha$ die numerische Apertur des Objektivs genannt wird. Demnach können mit einem Lichtmikroskop bestenfalls Objekte, deren Größe in der Größenordnung der Wellenlänge von sichtbarem Licht (400 – 700 nm) liegt, untersucht werden. In einem Elektronenmikroskop werden anstelle von Licht Elektronen zur Abbildung verwendet. Dem Elektron kann über die de-Broglie-Beziehung analog dem Licht eine Wellenlänge zugeordnet werden:

$$\lambda = \frac{h}{m_e \cdot v} \quad (3.20)$$

- h: Planck'sches Wirkungsquantum ($h = 6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$)
m_e: Ruhemasse des Elektrons ($m_e = 9.109 \cdot 10^{-31} \text{ kg}$)
v: Geschwindigkeit des Elektrons

Aus Gleichung 3.20 kann leicht geschlossen werden, dass eine Erhöhung der Geschwindigkeit der Elektronen zu einer kürzeren Wellenlänge und somit auch zu einer höheren Auflösung führt. Theoretisch führt also die Verwendung von Elektronen zu einem unbegrenzten Vergrößerungsfaktor, während dieser bei der Lichtmikroskopie bei etwa 2000 : 1 liegt. In der Praxis stellt man jedoch fest, dass das Auflösungsvermögen eines Elektronenmikroskops durch apparative und systematische Einflüsse limitiert wird. Es liegt bei Transmissionselektronenmikroskopen typischerweise im Bereich von 0.1 – 0.2 nm, einige Hochleistungsgeräte können aber auch Objekte mit einer Größe von nur 0.05 nm auflösen.

In einem *Rasterelektronenmikroskop (REM)* wird die Oberfläche des zu untersuchenden Objekts mittels eines fein gebündelten Elektronenstrahls zeilenförmig abgetastet. Der komplette Vorgang findet normalerweise im Hochvakuum statt, um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen in der Luft zu vermeiden. Das REM besteht im Wesentlichen aus den folgenden Komponenten (Abb. 3.13.):

- **Elektronenquelle** Die Elektronenquelle besteht aus einer Kathode, aus der die *Primärelektronen (PE)* emittiert werden und in Richtung einer Anode beschleunigt werden. Je nach Betriebsmodus (rein thermischer Emitter, Feldemissionskathode oder Schottky-Emitter) haben die erzeugten Primärelektronen eine Energie von 0.2 – 3 eV. Die Beschleunigungsspannung liegt typischerweise im Bereich von 1 – 10 keV.
- **Optik** Das Linsensystem des REM besteht aus ein bzw. zwei magnetischen Kondensorenlinen und einer magnetischen Objektivlinse. Es dient der Fokussierung des Primärelektronenstrahls auf die Probe. Weitere optische Elemente sind der Stigmator zur Korrektur von Fehlern in der Strahlführung, die Aperturblende zur Stromlimitierung und die Ablenkeinheit zum Abrastern der Probenoberfläche.
- **Detektoren** Zum Nachweis der durch die PE ausgelösten Wechselwirkungsproduk-

te wie *Sekundärelektronen (SE)*, Rückstreuелеktronen, Röntgenstrahlung, etc. können verschiedene Detektoren eingesetzt werden. Der *Everhart-Thornley-Detektor* besteht z. B. aus einer Kombination eines Szintillators und eines Photomultipliers und dient der Detektion von Sekundär- und Rückstreuелеktronen.

- **Bildgebungssystem** Das REM-Bild wird auf einem Monitor dargestellt, wobei die Bilddarstellung mit der Rasterung des PE-Strahls über die Probe synchronisiert ist. Das Photomultiplier-Ausgangssignal steuert hierbei die Bildhelligkeit.

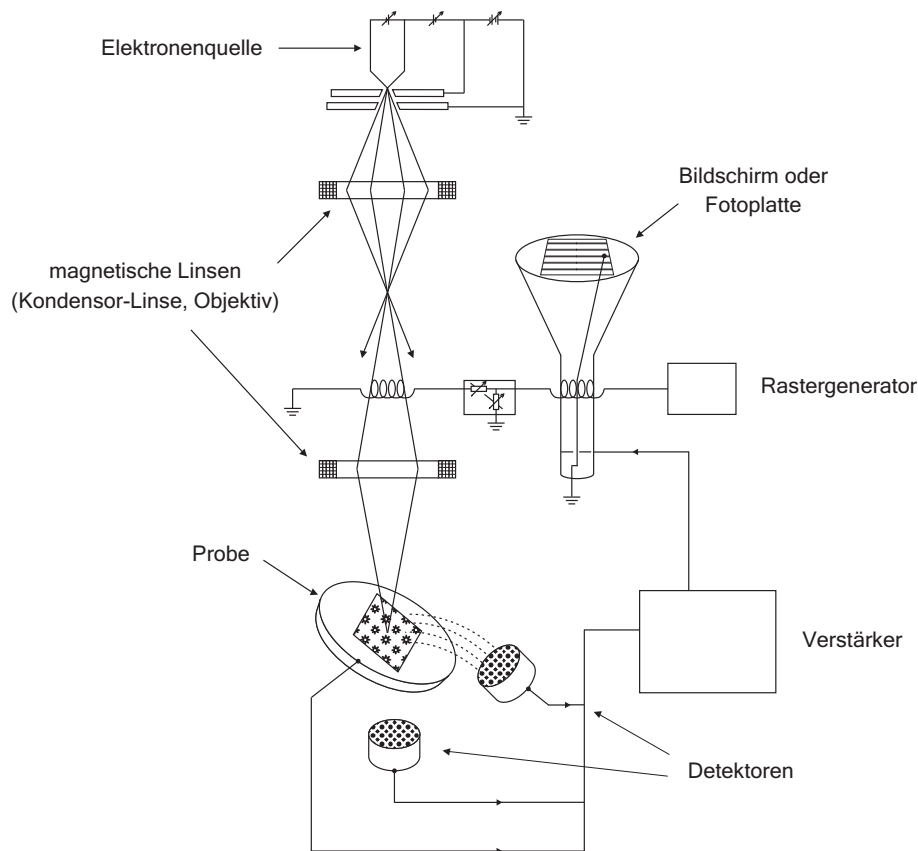


Abb. 3.13.: Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops [142].

Die auf die Probenoberfläche einfallenden PE können zum einen elastisch am Probenmaterial gestreut werden und bewirken zum anderen durch inelastische Wechselwirkungen die Erzeugung von SE, Auger-Elektronen, charakteristischer Röntgenstrahlung, Bremsstrahlung und Kathodolumineszenz. Prinzipiell lassen sich all diese Wechselwirkungsprodukte zur Bilddarstellung verwenden. Zur Topographieabbildung von Proben beschränkt man sich jedoch meistens auf die Detektion von SE und Rückstreuелеktronen. Der Kontrastmechanismus im Falle von SE beruht darauf, dass in erhabenen Teilen des zu untersuchenden Objekts mehr SE die Probe verlassen, so dass diese Bereiche hell erscheinen. Das

Auflösungsvermögen eines REM ist im Vergleich zu Transmissionselektronenmikroskopen üblicherweise ca. 1 Größenordnung schlechter.

3.4. Rasterkraftmikroskopie

Das Herzstück eines *Rasterkraftmikroskops* (engl. *Atomic Force Microscope, AFM*) besteht aus einer mikroskopisch kleinen Blattfeder (engl. *Cantilever*) mit einer Federkonstanten von ca. 0.2 – 2.0 N/m, an der eine scharfe Spitze, meist aus Siliciumnitrid, befestigt ist [143]. Mit Hilfe eines Piezoscanners wird der Cantilever zeilenweise in einem definierten Raster über die Oberfläche einer Probe geführt. Der Druck der AFM-Spitze auf die Oberfläche beträgt typischerweise einige Nanonewton. Je nach Topographie der Probenoberfläche verbiegt sich nun der Cantilever, wobei diese Verbiegung über die Ablenkung eines Laserstrahls, der an der Oberseite des Cantilevers in Richtung einer Photodiode reflektiert wird, gemessen wird (Abb. 3.14).

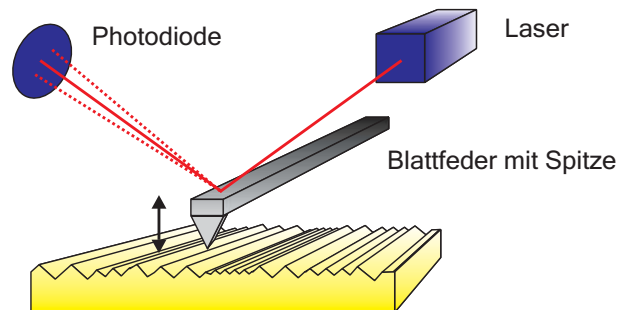


Abb. 3.14.: Messprinzip des Rasterkraftmikroskops.

Durch das punktweise Aufzeichnen der Auslenkung des Cantilevers lässt sich, wie bei einem Digitalfoto, eine Abbildung der Probenoberfläche generieren. Die mögliche Auflösung des Bildes wird hauptsächlich durch den Krümmungsradius der Spitze bestimmt. Dieser beträgt in der Regel 10 – 20 nm, was je nach Rauigkeit der Probenoberfläche laterale Auflösungen von 0.1 – 10 nm erlaubt. Dies reicht aus, um im Idealfall sogar einzelne Atome abbilden zu können.

Man kann die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probe näherungsweise mit dem Lennard-Jones-Potential beschreiben (Abb. 3.15):

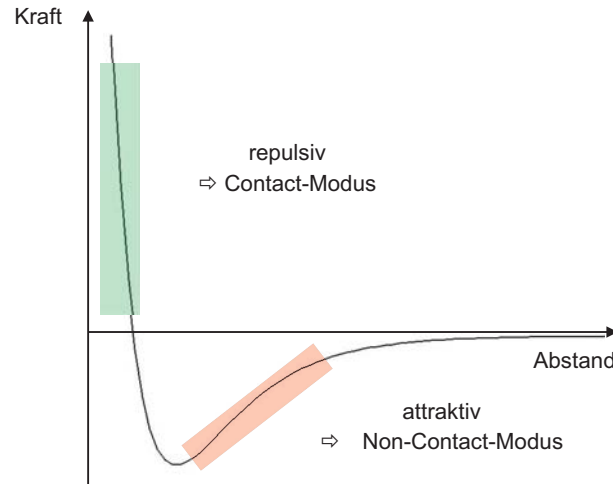


Abb. 3.15.: Lennard-Jones-Potential. Im Contact-Modus herrschen zwischen AFM-Spitze und Probenoberfläche repulsive Kräfte, im Non-Contact-Modus herrschen attraktive Kräfte.

Betrachtet man zwei ungeladene, nicht chemisch aneinander gebundene Teilchen, die sich einander annähern, so wirken zunächst attraktive Kräfte wie van-der-Waals-Kräfte oder permanente Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Wird ein bestimmter Abstand unterschritten, so überwiegt die Pauli-Repulsion, die dadurch bedingt ist, dass sich Elektronen mit gleichem Spin abstoßen, wenn deren Orbitale zu überlappen beginnen. Im sogenannten *Contact-Modus* befindet sich die AFM-Spitze in direktem Kontakt zur Probenoberfläche, die Kräfte zwischen der Spitze und der Probe werden also abstoßender Natur sein.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, das AFM im *Non-Contact-Modus* zu betreiben. Die Spitze wird hierbei sehr nahe an die Probenoberfläche herangeführt ohne diese jedoch zu berühren. Nun wird der Cantilever zu Schwingungen im Bereich seiner Resonanzfrequenz, deren Amplitude gemessen wird, angeregt.

$$\omega = \sqrt{\frac{k_{\text{eff}}}{m}} \quad \text{mit} \quad k_{\text{eff}} = k - f' \quad (3.21)$$

- k_{eff} : effektive Federkonstante unter Berücksichtigung der Wechselwirkung zwischen Probe und Blattfeder
- k : Federkonstante ohne Wechselwirkung mit der Probe
- f' : Kraftgradient, der durch die Wechselwirkung mit der Probe hervorgerufen wird
- m : Masse der Feder

Die Kräfte, die zwischen dem Probenmaterial und der AFM-Spitze wirken, sind attrakti-

ver Natur und führen zu einer Verschiebung dieser Resonanzfrequenz und somit auch zu einer Veränderung der Schwingungsamplitude bei der eingestellten Schwingungsfrequenz (Abb. 3.16).

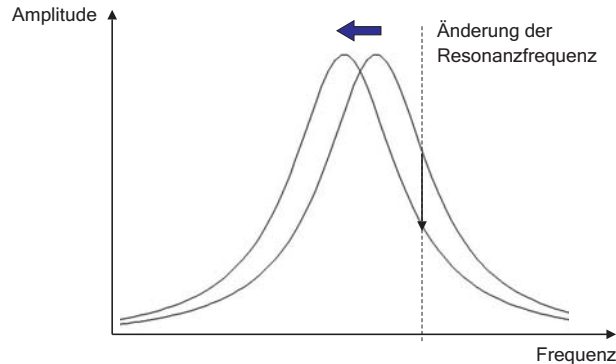


Abb. 3.16.: Verschiebung der Resonanzfrequenz des Cantilevers im Non-Contact Modus durch die Wechselwirkung mit der Probenoberfläche.

Das Piezoelement regelt nun den Abstand zwischen Spitze und Probe so, dass die Schwingungsamplitude konstant bleibt. Um eine Berührung zwischen Spitze und Probenoberfläche zu vermeiden, wird die Schwingungsfrequenz etwas höher als die Resonanzfrequenz des Cantilevers gewählt. Der Non-Contact Modus dient insbesondere der Untersuchung von weichen, biologischen Proben um deren Zerstörung durch eine Reibungswechselwirkung mit der AFM-Spitze zu vermeiden.

Neben der Auslenkung des Cantilevers nach oben und nach unten lässt sich aber auch seine seitliche Auslenkung messen, das Mikroskop wird dann im *Lateralkraftmodus* betrieben (engl. Lateral Force Mode, LFM). Die auf den Cantilever wirkende Lateralkraft hängt von Oberflächeneigenschaften wie Rauigkeit oder Benetzbarkeit der Probe ab. Im LF-Modus lassen sich also auch Oberflächen abbilden, die topographisch glatt aber chemisch strukturiert sind.

3.5. Dynamische Lichtstreuung

Die *Dynamische Lichtstreuung (DLS)*, oder auch *Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)*, ist ein optisches Messverfahren zur Bestimmung der Größenverteilung von Partikeln in Flüssigkeiten [144]. Der Messbereich geht dabei von wenigen Nanometern bis zu einigen Mikrometern. Die zu vermessende Probe wird bei der DLS mit monochromati-

schem Laserlicht bestrahlt und das Streulicht unter einem festen Winkel (üblicherweise 90°) detektiert.

Gemessen wird die Brown'sche Bewegung der Partikel und hieraus deren Größe errechnet: Das einfallende Laserlicht wird im einfachsten Fall an zwei Teilchen gestreut und trifft mit einer bestimmten Phasendifferenz auf den Detektor (Abb. 3.17). Nach einer gewissen Zeit t haben sich die beiden Teilchen zufällig weiterbewegt und streuen erneut das Laserlicht. Die Phasendifferenz zwischen den beiden interferierenden Strahlen wird nun eine andere sein. Die am Detektor registrierte Intensität des Laserlichts ist also eine Funktion der Zeit $I = I(t)$.

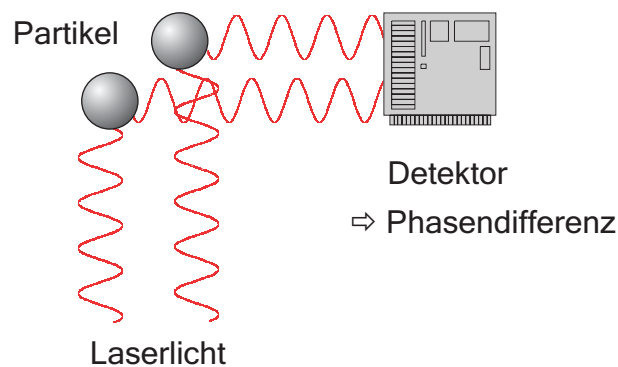


Abb. 3.17.: Messprinzip der Dynamischen Lichtstreuung.

Je größer nun das Partikel, desto langsamer wird seine Brown'sche Bewegung sein und umso langsamer wird sich die gemessene Intensität ändern. Allerdings ist der für die Bewegung relevante, effektive Durchmesser d_{eff} eines Partikels in einer Lösung bzw. Suspension keine absolute Größe, sondern hängt vielmehr von der Art des Lösungsmittels ab. Es ist daher besser den hydrodynamischen Durchmesser $d(H)$ des Partikels anzugeben, eine Größe, die den Einfluss des Lösungsmittels berücksichtigt. Ist in diesem z. B. ein Salz gelöst, so werden sich dessen Ionen entsprechend ihrer Ladung und der Oberflächenladung der Partikel um diese herum anordnen und deren Durchmesser größer erscheinen lassen. Darüber hinaus hängt die Beweglichkeit der Partikel auch von der Viskosität des Lösungsmittels η , sowie von der Temperatur T ab. Eine Funktion, die alle diese Größen miteinander verknüpft, ist die *Stokes-Einstein-Gleichung*:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta \cdot d(H)} \quad (3.22)$$

d(H):	hydrodynamischer Durchmesser
k _B :	Boltzmann Konstante ($k_B = 1.3806504 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$)
T:	Temperatur
η:	Viskosität des umgebenden Mediums
D:	Diffusionskoeffizient

Der Diffusionskoeffizient wird mit Hilfe der DLS bestimmt, indem die Intensität des gestreuten Lichts $I(t_0)$ zum Zeitpunkt t_0 mit der Intensität $I(t_0+t)$ zu einem späteren Zeitpunkt t_0+t verglichen wird. Aufgezeichnet wird die *Autokorrelationsfunktion* $A(t)$, die ein Maß dafür ist, wie gut die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Intensitäten des Streulichts übereinstimmen.

$$A(t) = B \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} + C \quad (3.23)$$

A(t):	Autokorrelationsfunktion
B:	$= \langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2$
C:	$= \langle I \rangle^2$
τ:	charakteristische Dauer einer Fluktuation
t:	Zeit

Die charakteristische Dauer einer Fluktuation eines Partikels τ ist wiederum über folgenden Zusammenhang mit dessen Diffusionskoeffizienten sowie dem Wellenvektor \vec{k} des eingestrahnten Laserlichts verknüpft:

$$\frac{1}{\tau} = 2 \cdot D \cdot |\vec{k}|^2 \quad \text{mit} \quad |\vec{k}| = \frac{4\pi n}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (3.24)$$

\vec{k} :	Wellenvektor
n:	Brechungsindex des Mediums (für Wasser: $n = 1.33$)
λ:	Wellenlänge des eingestrahnten Lichts (He/Ne-Laser: $\lambda = 632.8 \text{ nm}$)
θ:	Streuwinkel (üblicherweise $\theta = 90^\circ$)

Die Korrelation des gemessenen Signals wird also für kleine Partikel schneller abfallen als für große Partikel. Wurde aus der Autokorrelationsfunktion (Gl. 3.23) τ und damit D bestimmt, so kann über die Stokes-Einstein-Gleichung (Gl. 3.22) letztendlich der Parti-

keldurchmesser errechnet werden.

3.6. Elektrophoretische Lichtstreuung

3.6.1. Zeta-Potential

Befindet sich ein geladenes Teilchen in einer Suspension, so wird seine Oberflächenladung durch Anlagerung von komplementär geladenen Ionen aus dem Suspensionsmedium kompensiert. Nach dem Stern-Modell ist die erste Schicht entgegengesetzt geladener Ionen relativ fest an das Teilchen gebunden, man nennt diesen Bereich *Helmholtz-* oder *Stern-Schicht* [145, 146]. Die darauf folgende Schicht mit Gegenionen bildet mit der Stern-Schicht zusammen eine elektrische Doppelschicht, die durch einen linearen Abfall des elektrischen Potentials mit wachsendem Abstand zur Teilchenoberfläche gekennzeichnet ist. Anschließend bildet sich eine diffuse Ionenschicht (Gouy-Chapman-Schicht), wobei die Konzentration dieser Ionen exponentiell mit dem Abstand zum geladenen Teilchen abfällt bis sie schließlich in den Wert übergeht, der der Ionenkonzentration des umgebenden Mediums entspricht [28]. Die immer diffuser werdenden, aufeinander folgenden Ionenschichten lassen das Teilchen aus großer Entfernung elektrisch neutral erscheinen (Abb. 3.18).

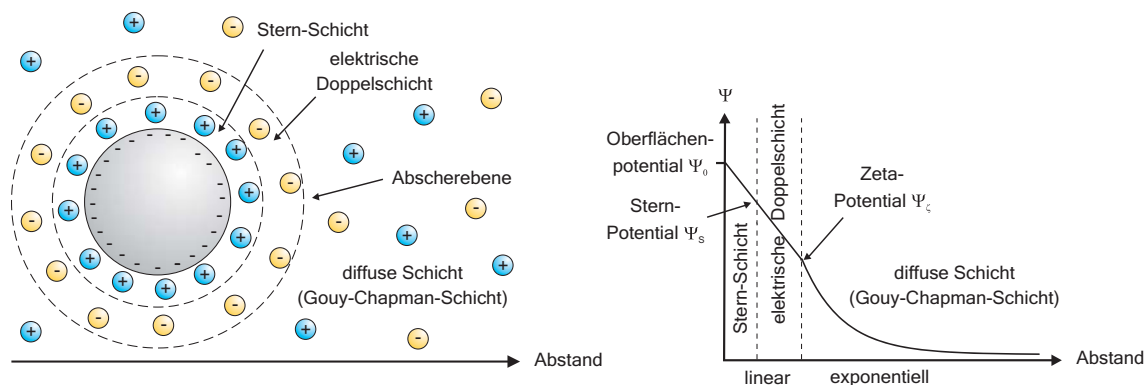


Abb. 3.18.: Veranschaulichung des Zeta-Potentials. Eine erste Schicht fest adsorbierter Gegenionen bildet die Helmholtz- oder Stern-Schicht, die wiederum mit einer folgenden Schicht komplementär geladener Ionen eine elektrische Doppelschicht um das geladene Teilchen bildet. Diese definiert in etwa die Abscherebene der anschließenden diffusen Ionenschicht, an der das Zeta-Potential Ψ_{ζ} gemessen wird.

Ein Maß für die Dicke der elektrischen Doppelschicht ist die *Debyesche Abschirmlänge*, die angibt, ab wann das elektrische Feld, das das geladene Teilchen umgibt, auf den Wert e^{-1} abgefallen ist:

$$\frac{1}{\kappa} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon k_B T}{e^2 \sum_i n_i z_i^2}} \quad (3.25)$$

e:	Elementarladung ($e = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$)
n_i :	Ionenkonzentration $\left[\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right]$
z_i :	Ionenladungszahl
ϵ_0 :	Dielektrizitätskonstante im Vakuum ($\epsilon_0 = 8.85 \cdot 10^{-21} \frac{\text{C}}{\text{Vm}}$)
ϵ :	relative Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums
k_B :	Boltzmannkonstante ($k_B = 1.39 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$)
T:	Temperatur [K]

Die locker gebundenen Ionen in der diffusen Schicht können nun aber abgeschert werden, sobald das Teilchen sich durch die Suspension bewegt, so dass dem Teilchen wieder eine Oberflächenladung zugeordnet werden kann. Das Potential an der Abschergrenze, die in etwa durch die o. g. elektrische Doppelschicht definiert ist, wird *Zeta-Potential* genannt und stellt eine relative Messgröße dar, mit deren Hilfe man Rückschlüsse auf die Oberflächenladung des Teilchens ziehen kann. Zu beachten ist natürlich, dass Messungen für unterschiedliche Teilchen nur bei gleichem umgebendem Medium (Art des Lösungsmittels, Ionenstärke, etc.) verglichen werden können.

3.6.2. Messung des Zeta-Potentials

Das Messprinzip der *Elektrophoretischen Lichtstreuung (ELS)* ist dem der Dynamischen Lichtstreuung (siehe Kap. 3.5) sehr ähnlich [144]. Allerdings wird bei der ELS nicht die Brown'sche Molekularbewegung der Teilchen gemessen, sondern ihre Geschwindigkeit in einem zwischen zwei Elektroden angelegten elektrischen Feld. Dieses beschleunigt die geladenen Teilchen in Richtung der jeweils entgegengesetzt geladenen Elektrode, bis die Reibungskraft im umgebenden Medium diese Beschleunigungskraft gerade kompensiert und sich die Teilchen mit konstanter Geschwindigkeit bewegen. Das Laserlicht, das an den bewegten Teilchen gestreut wird, unterliegt der Dopplerverschiebung, d. h. die gemessene Frequenz erhöht sich, wenn die Teilchen sich in Richtung der Lichtquelle bewegen, und sie verringert sich, wenn sich die Teilchen von der Lichtquelle wegbewegen:

$$\Delta\nu = \frac{|\vec{k}| \cdot v}{2\pi} \cdot \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{mit} \quad |\vec{k}| = \frac{4\pi n}{\lambda} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{und} \quad \Delta\nu = \nu \cdot \frac{v_{||}}{c} \quad (3.26)$$

- ν : Frequenz des Laserlichts
- v : Geschwindigkeit der Teilchen
- $v_{||}$: Geschwindigkeitskomponente der Teilchen in Streurichtung
- \vec{k} : Wellenvektor
- θ : Streuwinkel
- λ : Wellenlänge des Lasers
- n : Brechungsindex des umgebenden Mediums

Die Geschwindigkeit v der Teilchen ist proportional zur angelegten Feldstärke E mit der elektrophoretischen Mobilität μ_E als Proportionalitätskonstante. Diese ist wiederum über die *Henry-Gleichung* mit dem Zeta-Potential verknüpft:

$$\mu_E = \frac{v}{E} = \frac{2\epsilon_0\epsilon \cdot \Psi_\zeta \cdot f(\kappa R)}{3\eta} \quad (3.27)$$

wobei $f(\kappa R)$ die Henry-Funktion darstellt, in die der Radius R des Teilchens und die inverse Debye'sche Abschirmlänge κ eingehen.

Gleichung 3.26 in den ersten Teil der Gleichung 3.27 eingesetzt ergibt für die elektrophoretische Mobilität folgenden Zusammenhang:

$$\mu_E = \frac{\lambda}{E \cdot n \cdot \sin\theta} \cdot \Delta\nu \quad (3.28)$$

Das ζ -Potential kann demnach über die Messung der Dopplerverschiebung bestimmt werden.

4. Experimenteller Teil

4.1. Materialien und Geräte

4.1.1. Chemikalien und Substrate

Die Tabelle 4.1 listet alle verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge auf. Die verwendeten Proteine und Nanopartikel sind gesondert in den Tabellen 4.2 und 4.3 aufgeführt. Für alle Experimente in wässriger Lösung wurde entweder D₂O oder Reinstwasser mit einem spezifischen Widerstand von 18.2 mΩ·cm aus einer Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q der Firma Millipore benutzt. Glasgefäße, die zur Herstellung von Thiol- und Polyelektrolytlösungen, sowie zur Präparation von Goldnanopartikeln benutzt wurden, wurden durch mehrstündiges Einlegen in eine 1 M Kaliumhydroxid Lösung in 75 % Wasser und 25 % Isopropanol gereinigt.

Tab. 4.1.: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller
(3-Aminopropyl)triethoxysilan	99.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
11-Amino-1-undecanethiol Hydrochlorid	99.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin- 6-sulfonsäure) Diammoniumsalz	≥ 99.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deuteriumchlorid (38 %-ige Lösung in D ₂ O)	≥ 99.5 Atom-% D	Carl Roth, Karlsruhe
2,2'-Bipyridyl	≥ 99.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromisobutyrylbromid	98.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deuteriumoxid	≥ 99.8 Atom-% D	Carl Roth, Karlsruhe
Dikaliummonohydrogenphosphat	p. a.	Baker, Deventer (NL)
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'- ethylcarbodiimid Hydrochlorid	≥ 98.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N'-Dimethylformamid	p. a.	Fisher Scientific, Loughborough (UK)
1-Dodecanthiol	≥ 98.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	96.0 %, p. a.	Merck, Darmstadt

Experimenteller Teil

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller
Essigsäure D4	≥ 99.5 Atom-% D	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	96.0 %, p. a.	Baker, Deventer (NL)
Ethylacetat	p. a.	AppliChem, Darmstadt
Fluorwasserstoffsäure	48 %, p. a.	Merck, Darmstadt
Folin-Ciocalteus Reagenz	k. A.	Merck, Darmstadt
Glucose	p. a.	Merck, Darmstadt
Gold(III)chlorid Trihydrat	≥ 99.9 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-Hydroxysuccinimid	≥ 97.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Iod	≥ 99.8 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	p. a.	AppliChem, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	p. a.	Baker, Deventer (NL)
Kaliumhydroxid	≥ 85.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumiodid	≥ 99.5 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumphthalat	k. A.	VWR International,
Pufferlösung, pH 4.0		Fontenau-sous-Bois (F)
Kupfer(I)bromid	≥ 99.0 %	Riedel-de Haen, Seelze
12-Mercaptododecansäure	96.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	p. a.	Baker, Deventer (NL)
11-Mercapto-1-undecanthiol	97.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-[Methoxy(polyethylenoxy)propyl]-trichlorosilan	95.0 %	ABCR, Karlsruhe
Natriumchlorid	p. a.	Baker, Deventer (NL)
Natriumdeuteriumoxid (30 %-ige Lösung in D ₂ O)	≥ 99.5 Atom-% D	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxidlösung (1 M)	p. a.	Baker, Deventer (NL)
PBS-Puffer Tabletten	p. a.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly(acrylsäure)	k. A.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly(allylamin) Hydrochlorid	k. A.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly(ethylenglykol)	p. a.	Polysciences, Eppelheim
α-2-aminoethyl ω-methoxy Poly(ethylenglykol)methacrylat	k. A.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly(ethylenimin), verzweigt	k. A.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly(styrolsulfonat) Natriumsalz	k. A.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly(2-vinylpyridin)	k. A.	Polysciences, Eppelheim
11-(1H-Pyrrol-1-yl)undecan-1-thiol	96.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (1 M)	p. a.	Baker, Deventer (NL)

Chemikalie	Reinheitsgrad	Hersteller
Schwefelsäure	95.0 %	VWR International, Fontenau-sous-Bois (F)
Tanninsäure	p. a.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetra(trimethylsiloxy)silan	k. A.	Dow Corning, Seneffe (B)
Tetramethyltetravinyln-cyclotetrasiloxan	k. A.	Dow Corning, Seneffe (B)
Toluol	99.8 %	VWR International, Fontenau-sous-Bois (F)
Triethylamin	≥ 99.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trinatriumcitrat Dihydrat	≥ 99.0 %	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (30 %)	p. a.	Baker, Deventer (NL)

Tab. 4.2.: Liste der verwendeten Proteine.

Protein	Konzentration bzw. Reinheitsgrad	Hersteller
Glucose Oxidase Typ II-S (EC 1.1.3.4)	Lyophilisat (15 – 50 kU/g)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ig aus Kaninchen, anti Glucose Oxidase (<i>Aspergillus niger</i>)	Lyophilisat (0.8 mg/ml rekonstituiert)	Thermo Scientific, Rockford (UK)
IgG (H+L) aus Ziege, anti Kaninchen, konjugiert mit Meerrettichperoxidase	Lyophilisat (0.8 mg/ml rekonstituiert)	Jackson Immuno Research, West Grove (USA)
Lysozym aus Hühnereiweiß (EC 3.2.1.17)	salzfreies Lyophilisat	Roche, Mannheim
Meerrettichperoxidase, Typ II (EC 1.11.1.7)	salzfreies Lyophilisat (150 – 250 kU/g)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin	≥ 98.0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim

Für die Präparation von Polyelektrolytfilmen auf Silicium zur Aktivitätsbestimmung und ellipsometrischen Schichtdickenbestimmung wurden einseitig polierte Si(100)-Wafer der Firma Silicon Materials, Landsberg am Lech benutzt. Die halbkugelförmigen ATR-Kristalle

Tab. 4.3.: Liste der verwendeten Nanopartikel.

Material	Größe	Konzentration	Firma
Polystyrol	20 ± 5 nm	10.0 % (w/v)	Bangs Labs, Fishers (USA)
Polystyrol	52 ± 7 nm	1.0 % (w/v)	Polysciences, Eppelheim
Polystyrol	96 ± 5 nm	1.0 % (w/v)	Polysciences, Eppelheim
Polystyrol	150 ± 2 nm	1.0 % (w/v)	Polysciences, Eppelheim
Silica	50 ± 10 nm	5.59 % (w/v)	Polysciences, Eppelheim
Silica	100 ± 30 nm	5.69 % (w/v)	Polysciences, Eppelheim

aus Silicium bzw. Germanium für die IR-Spektroskopie wurden von der Firma NewEra Enterprises, Vineland (USA) bezogen.

Die goldbedampften Substrate wurden am Lehrstuhl von Georg Albert präpariert. Um eine möglichst reine Oberfläche zu erhalten, wurden die Si(100)-Substrate zunächst im Vakuum ($p \approx 10^{-7}$ mbar) auf 300 °C erhitzt. Danach wurden bei Raumtemperatur eine 5 nm dünne Schicht Titan als Haftvermittler und schließlich 100 nm Gold aufgedampft. Die Goldbedampfung der PS-Partikel beschichteten Substrate erfolgte aufgrund der Temperaturempfindlichkeit von Polystyrol ohne Ausheizen der Vakuumkammer. Um die Gesamtmenge an aufgedampften Metall möglichst gering zu halten, wurden in diesem Fall lediglich 1 nm Ti und 5 – 15 nm Au aufgedampft. Die Schichtdicken wurden über die Resonanzfrequenz eines mitbedampften Schwingquarzes kontrolliert [147].

4.1.2. Messaparaturen

4.1.2.1. FTIR-Spektrometer

Die IR-Spektren wurden mit einem FTIR-Spektrometer der Firma Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Modell Vertex 70 in einem Wellenzahlenbereich von 4000 bis 800 cm^{-1} bei einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen. Das Gerät wurde mit einem MCT-Halbleiter-Detektor betrieben, der mit flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von ca. - 195 °C gekühlt wurde.

Der in der Raumluft enthaltene Wasserdampf absorbiert IR-Strahlung im Bereich von $4000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ und $1800 - 1300 \text{ cm}^{-1}$. Um die störenden Absorptionsbanden in diesen Bereichen zu reduzieren, wurde die Probenkammer kontinuierlich mit trockener Luft gespült. Hierfür wurde Druckluft bei einem Eingangsdruck von etwa 5 bar durch einen Lufttrockner der Firma Whatman, Göttingen und anschließend über ein Druckminderventil als schwacher Luftstrom in das IR-Spektrometer geleitet. Damit während der Referenz- und der Probenmessung in der Probenkammer ähnliche Bedingungen herrschen, wurde im Falle der IRRAS-Messungen die Spektrenaufnahme jeweils erst nach einer Verzögerungszeit von etwa 10 min gestartet. Zunächst wurde von der Referenz (ein mit einem perdeutertem Alkanthiol beschichtetes Goldsubstrat) ein Einkanalspektrum mit 1000 Einzelscans aufgezeichnet. Anschließend wurde von der Referenz ohne Veränderung der Probenposition ein Absorptionsspektrum aufgenommen, welches im Idealfall nur die Spektrallinien des Restwasserdampfs zeigt. Für alle Probenspektren wurden ebenfalls 1000 Einzelscans aufsummiert. Um nun den Restwasserdampf aus den Probenspektren zu eliminieren wurde von diesen das zuvor aufgezeichnete Wasserdampfspektrum der Referenz manuell subtrahiert, wobei der jeweilige Subtraktionsfaktor individuell angepasst werden muss. Als Probenhalter für die IRRAS-Messungen wurde eine Universalreflexionseinheit mit variablem Einfallswinkel der Firma Bruker Optik, Ettlingen benutzt. Der Einfallswinkel war auf 72° eingestellt. Bei einer Aperturblende von 1.5 mm müssen die Proben dann mindestens $1 \times 2 \text{ cm}$ groß sein um nicht überstrahlt zu werden.

Zur Aufnahme der ATR-Spektren wurde der IRRAS-Probentisch durch eine Flüssigkeitszelle aus Edelstahl (Eigenkonstruktion) ersetzt und der Einfallswinkel auf 45° eingestellt. Der schematische Aufriss der Flüssigkeitszelle ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

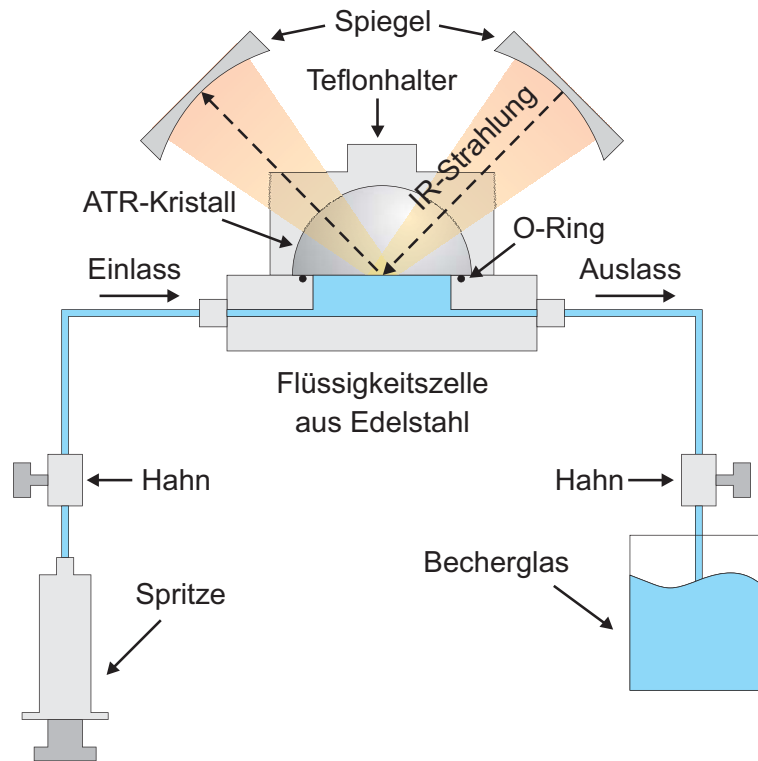


Abb. 4.1.: Schematischer Aufriss der ATR-Flüssigkeitszelle.

Um den Wasserdampfgehalt in der Probenkammer möglichst gering zu halten, wurden die Reflexionselemente bereits am Abend vor der Messung in das Spektrometer eingesetzt. Um Artefakte von H_2O -Banden in den Proteinspektren zu vermeiden, wurde die Flüssigkeitszelle zuerst mit ca. 10 ml D_2O gespült. Anschließend wurde der deuterierte Acetatpuffer, in dem auch im späteren Verlauf des Experiments die GOx gelöst war, in die Zelle injiziert und hiervon ein Referenzspektrum aufgezeichnet. Danach wurde der Acetatpuffer gegen Proteinlösung ausgetauscht und diese für 1 h in der Zelle inkubiert bevor 2 x mit je 20 ml PBS gespült wurde. Als nächstes wurde die Zelle wieder mit ca. 10 ml D_2O gespült und zuletzt deuterierter Acetatpuffer eingefüllt um schließlich das Spektrum des adsorbierten Proteins aufzuzeichnen. Das Proteinspektrum wurde jeweils nach einer Wartezeit von 10 min ein zweites Mal aufgenommen. Da die verwendeten Ominifit-Verbinders zum Befüllen der Zelle mit Flüssigkeit offenbar nicht vollständig dicht waren, waren in allen Proteinspektren immer leichte Wasserdampfbanden zu sehen. Um diese manuell subtrahieren zu können, wurde nach dem Aufzeichnen der Proteinspektren die Probenkammer kurz geöffnet und dann noch einmal am selben ATR-Kristall ein Referenz- und Probenspektrum aufgenommen um ein reines Wasserdampfspektrum zu erhalten. Die Proteinspektren auf den homogen beschichteten Siliciumkristallen wurden für ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis über 200 Einzelscans aufsummiert, auf den AuNP

beschichteten Kristallen wurden aufgrund der geringeren Adsorbatmenge 500 Einzelscans aufsummiert.

Die optimale Position der Proben auf dem IRRAS-Tisch bzw. in der entsprechenden ATR-Kristallhalterung wurde über das Justiersignal (digitalisierte, vom Detektor gemessene Signalintensität) kontrolliert und ggf. die Spiegel der Universalreflexionseinheit nachjustiert.

4.1.2.2. Ellipsometer

Die ellipsometrischen Schichtdickenbestimmungen wurden an einem Spektralellipsometer der Firma J. A. Woollam Co. Inc., Typ M44 durchgeführt. Das Gerät arbeitet mit einer Xenon-Bogenlampe als Lichtquelle, deren Spektralbereich $\lambda = 400 - 800$ nm umfasst. Der Einfallswinkel ist auf 75° festgelegt. Mit Hilfe eines Calcit-Kristalls wird linear polarisiertes Licht erzeugt, welches auf die Probe eingestrahlt wird. Die Intensität des nach der Reflexion elliptisch polarisierten Lichts wird nach Durchgang durch einen weiteren, mit 60 Hz rotierenden Polarisator (Analysator) mit dem Detektor gemessen. Aus der Abhängigkeit der Intensität von der Polarisationsrichtung des Lichts wird die Elliptizität des Lichts bestimmt. Das Messsignal wird vom Detektor auf 48 Kanälen simultan erfasst.

Um den Einfallswinkel exakt zu bestimmen, wurde das Gerät auf eine Probe mit bekannten optischen Eigenschaften kalibriert. Hierfür wurde ein thermisch oxidiertes Siliciumwafer mit einer ca. 25 nm dicken Oxidschicht verwendet. Vor der eigentlichen Probenmessung wurde eine Referenzmessung am blanken Substratmaterial durchgeführt, um dessen Brechungsindices zu bestimmen. Von jeder Probe wurde an 3 unterschiedlichen Punkten die Schichtdicke gemessen und der Mittelwert gebildet. Zur Auswertung der Messdaten der beschichteten Substrate wurde gemäß Gleichung 3.18 ein Cauchy-Modell angenommen. Als Cauchy-Parameter wurden $n_0 = 1.45$ und $A = 0.01 \mu\text{m}^2$ angenommen [136].

4.1.2.3. UV/Vis-Spektrometer

Die Charakterisierung der Goldnanopartikel, die Bestimmungen von Proteinkonzentration und Enzymaktivität sowie die ELISA-Quantifizierungen wurden an einem DU70 Spektrophotometer der Firma Beckman, Brea (USA) durchgeführt, welches mit einer Deuterium- sowie einer Wolframlampe ausgestattet ist und einen Wellenlängenbereich von 190 –

900 nm erfasst. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden bei einer festen Wellenlänge 99 Einzelmessungen gemittelt. Die Absorptionsmaxima der Goldnanopartikel wurden aus Extinktionsspektren von 320 – 700 nm bei einer Scanrate von 300 pro min bestimmt. Für die Aktivitäts- und ELISA-Messungen wurde das Gerät im Kinetikmodus betrieben und über einen Zeitraum von 2 – 3 Minuten alle 15 sec ein Messpunkt bei einer fest eingestellten Wellenlänge aufgezeichnet. Die Küvetten konnten mittels eines Peltierelements temperiert werden.

4.1.2.4. Rasterelektronenmikroskop

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden an einem Leo 1530 der Firma Zeiss, Oberkochen bei einer Beschleunigungsspannung von 3 – 5 kV gemacht. Das Gerät verfügte über einen Everhart-Thornley Sekundärelektronen Detektor sowie über einen In-Lens Detektor zur Bildaufnahme. Die Proben wurden mit einem elektrisch leitfähigen Carbonklebeband auf den Probenhalter aufgeklebt. Bei schlecht leitenden Proben wurde mit Silberkolloidfarbe ein zusätzlicher Kontakt zwischen Probe und Probenhalter hergestellt.

4.1.2.5. Rasterkraftmikroskop

Alle AFM-Messungen wurden an einem Autoprobe-CP der Firma Park Scientific Instruments (PSI) durchgeführt. Das Gerät verfügt über zwei austauschbare AFM-/LFM-Köpfe mit einem Scanbereich von 80 x 80 μm bzw. 5 x 5 μm . Für die AFM-Messungen im Non-Contact-Modus wurden Dreifach-Cantilever aus Silicium der Firma Schäfer Technologies GmbH, Langen (Resonanzfrequenz 105, 155 bzw. 75 kHz, Federkonstante 0.95, 1.75 bzw. 0.60 N/m) verwendet. Die Parameter (Setpoint, Signalverstärkung) für den Non-Contact-Modus müssen für jede Probe individuell angepasst werden.

4.1.2.6. Zetasizer

Aufgrund des ähnlichen Messprinzips konnten Partikelgrößen und ζ -Potentiale mit dem gleichen Gerät bestimmt werden. Zum Einsatz kam hier ein 380 ZLS der Firma Nicomp, Port Richey (USA). Als Streulichtquelle verfügt das Gerät über einen Diodenlaser, der bei einer Wellenlänge von $\lambda = 633 \text{ nm}$ arbeitet. Der Winkel zwischen Analysator und Küvet-

te wird je nach Messmodus über einen Schrittmotor automatisch eingestellt und betrug 90° für die Bestimmung der Partikelgrößen bzw. 13.8° zur Bestimmung des ζ -Potentials. Die Küvette mit der Probenflüssigkeit wurde über ein Peltierelement temperiert. Alle Messungen wurden in wässrigem Medium bei 25°C durchgeführt. Die relative Dielektrizitätskonstante von Wasser beträgt bei dieser Temperatur $\epsilon = 78.25$ und muss von Hand vorgegeben werden.

Die Messung der Partikelgrößen erfolgte durch Aufzeichnung der Autokorrelationsfunktion über einen Zeitraum von 3×2 min. Die Messsoftware errechnet hieraus automatisch den Mittelwert und passt das Ergebnis an eine Gaußverteilung an. Alternativ kann die Größenverteilung auch mit Hilfe einer vom Softwarehersteller implementierten Funktion errechnet werden, die im Gegensatz zur Gaußverteilung verschiedene Partikelpopulationen unabhängig voneinander betrachtet. Da diese Funktion aber im Benutzerhandbuch nicht näher erläutert wird, ist in jedem Fall die Gaußverteilung zu bevorzugen.

Um das ζ -Potential zu bestimmen, wurden 2 Elektroden in die Probenlösung eingetaucht und zunächst ohne Anlegen eines elektrischen Feldes die Frequenz des gestreuten Laserlichts erfasst. Dieser Wert diente als Referenzfrequenz. Anschließend wurde eine Spannung von 15 V angelegt und die Dopplerverschiebung der Laserfrequenz so lange gemessen, bis sich ein konstanter Wert einstellte.

4.1.2.7. Goniometer zur Messung des Wasserkontaktwinkels

Das Goniometer zur Messung des Wasserkontaktwinkels wurde von Christof E. Christophis aufgebaut und die zugehörige Software von Dr. Patrick Kölsch implementiert. Mit Hilfe einer HPLC-Kapillare wurde ein Wassertropfen auf die Probe aufgebracht, von dem mit einer CCD-Kamera ein Bild im Aufriss genommen und gespeichert wurde. Zur Kontrastverbesserung wurde der Tropfen mit einer LED-Lampe ausgeleuchtet (Abb. 4.2).

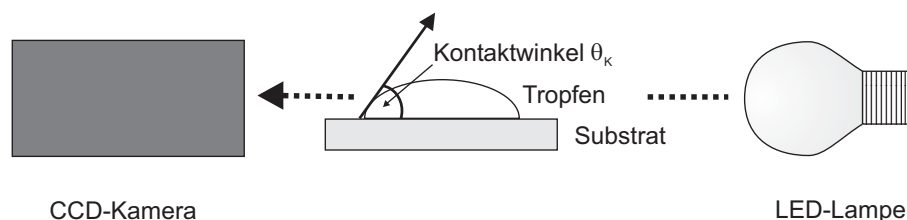


Abb. 4.2.: Schematischer Aufbau des Goniometers zur Messung des Wasserkontaktwinkels.

Die Software berechnet aus dem Bild am rechten und linken Rand des Tropfens den Winkel zwischen der Tangentialebene des Tropfens und der Oberfläche des Substrats (Kontaktwinkel θ_K). Ist $\theta_K < 90^\circ$, so wird eine Oberfläche als hydrophil bezeichnet, ist $\theta_K \geq 90^\circ$, so wird eine Oberfläche als hydrophob bezeichnet.

4.1.3. Datenauswertung

Alle IR-Spektren wurden direkt mit der Spektrometersoftware Opus 6.5 ausgewertet. Die Absorptionsbande des in der Luft enthaltenen CO_2 wurde ausgeschnitten und durch eine gerade Linie ersetzt. Alle Spektren wurden basislinienkorrigiert und über 5 – 11 benachbarte Datenpunkte geglättet. Bei der FSD wurde die Halbwertsbreite $2 \cdot \sigma$ der linienverbreiternden Funktion konstant zu 13 cm^{-1} angenommen und mit einer Besselfunktion apodisiert. An die Feinstruktur der Amid-I-Bande wurden anschließend mit Hilfe des Peak-Fitting-Moduls von Origin 8.1 Gauß-Profile angepasst und integriert. Von jedem Proteinspektrum wurden zwei unabhängig voneinander ermittelte Wasserdampfspektren subtrahiert, beide Ergebnisse der FSD unterzogen und gefittet. Demnach handelt es sich bei den ausgewerteten Proteinsekundärstrukturen jeweils um eine Mittelung über 4 Fitresultate, da, wie oben erwähnt, jedes Proteinspektrum doppelt aufgezeichnet wurde. Die Auswertung der Enzymkinetiken wurde ebenfalls mit Origin 8.1 durchgeführt.

Um die prozentuale Oberflächenbedeckung mit Nanopartikeln zu bestimmen, wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ 1.42q von jeder Probe 5 verschiedene REM-Bilder ausgewertet. Hierfür wurde von den Bildern je ein Grauwerthistogramm erstellt und der Grenzwert zwischen der Graustufe der Partikel und der Graustufe des Hintergrunds per Hand festgelegt. Der Wert liegt zwischen 0 und 255. Alle Pixel, die heller als dieser Grenzwert sind, werden vom Programm Partikeln zugeordnet, alle dunkleren werden als Hintergrund gezählt. Das Programm gibt schließlich den prozentualen Anteil der Pixel, die Partikel darstellen, von der Gesamtpixelzahl an.

Die Potentialrechnungen zur Beschreibung der Wechselwirkungspotentiale zwischen Partikel - Partikel und Partikel - Oberfläche wurden mit Matlab R2009a durchgeführt.

4.2. Synthesen

4.2.1. Vorschrift zur Darstellung von Goldnanopartikeln

Ansatz

Tetrachlorgoldsäure Trihydrat (2 % (w/v) in Wasser)	250 μ l
Trinatriumcitrat Dihydrat (1 % (w/v) in Wasser)	500 – 2000 μ l
Tanninsäure (1 % (w/v) in Wasser)	50 μ l
Wasser	49.75 ml

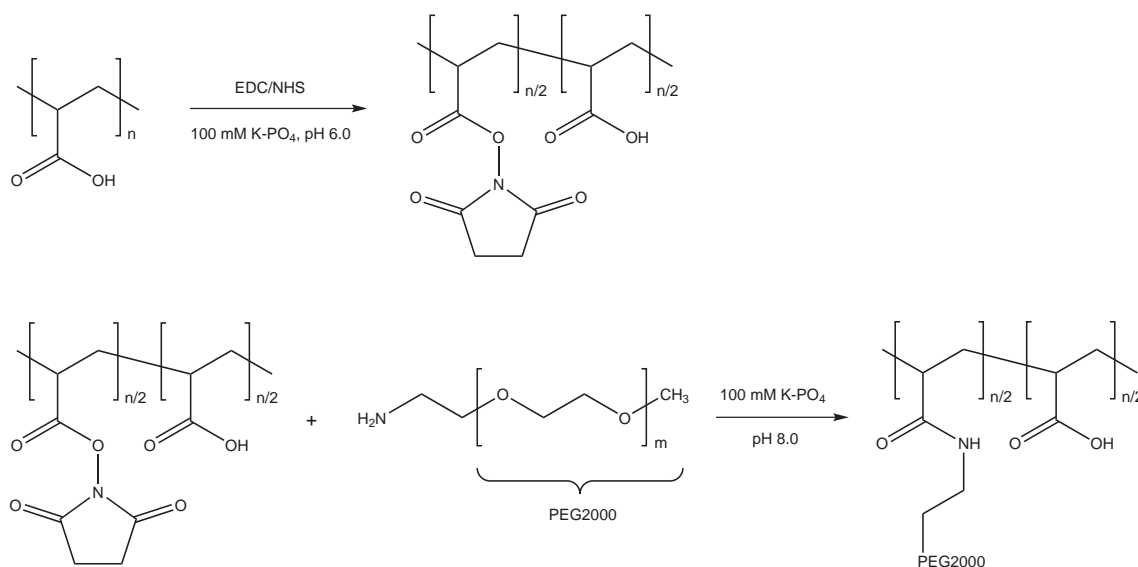
Durchführung

Die verwendeten Goldnanopartikel (AuNP) wurden nach der Methode nach Frens [11] durch Reduktion von Tetrachloroaurat mit Natriumcitrat hergestellt. Hierfür wurden zunächst aus einer 2 % (w/v) Vorratslösung von $\text{HAuCl}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ 250 μ l entnommen und mit 49.75 ml Reinstwasser auf 0.01 % (w/v) verdünnt. Die Lösung wurde in einem mit einer Glaspetrischale abgedeckten 100 ml Erlenmeyerkolben zum Sieden erhitzt, dann zügig eine bestimmte Menge einer 1 %-igen (w/v) Lösung von $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ zugegeben und schließlich noch weitere 10 min unter kräftigem Rühren gekocht. Zur Darstellung von AuNP mit einem Durchmesser ≤ 10 nm muss zusätzlich Tanninsäure als Reduktionsmittel zugesetzt werden [148]. Die Lösung wird nach wenigen Sekunden tiefblau (Keimbildung der Partikel) und schlägt schließlich, je nach Partikelgröße, in hellrot bis weinrot um. Ein Teil des zugegebenen Citrats agiert bei dieser Reaktion als Reduktionsmittel, gleichzeitig bilden überschüssige Citrat-Moleküle aber auch eine Hülle um die AuNP, so dass diese ein negatives ζ -Potential aufweisen. Nach dem Abkühlen der Partikellösungen wurde mit Hilfe des Zetasizers deren Größenverteilung sowie am UV/Vis-Spektrometer das jeweilige Absorptionsmaximum bestimmt. Diese Werte, so wie die jeweils benötigte Menge an Na-Citrat- bzw. Tanninsäure-Lösung, sind der Tabelle 4.4 zu entnehmen.

Tab. 4.4.: Größenverteilung und Absorptionsmaximum der synthetisierten AuNP in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an Citrat- und Tanninsäure-Lösung.

Na-Citrat [μl]	Tanninsäure [μl]	d(AuNP) [nm]	λ_{max} [nm]
2000	50	11 ± 1	519
1000	–	20 ± 3	519
750	–	33 ± 4	522
500	–	40 ± 5	528

4.2.2. Synthese des PAA-PEG2000 Copolymers



Ansatz

Poly(acrylsäure) (MW \approx 1800)	8 μmol
Poly(ethylenglycol) α -2-aminoethyl ω -methoxy (MW \approx 2000)	100 μmol
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC)	1 mmol
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	200 μmol
Natriumhydroxid (1 M Lösung)	\approx 2 ml
100 mM Kaliumphosphat-Puffer (K-PO ₄), pH 6.0	18 ml

Durchführung

14.4 mg (8 μmol) Poly(acrylsäure) werden in 8 ml 100 mM K-PO₄ bei pH 6.0 und Raumtemperatur gelöst. Es werden 192 mg (1 mmol) EDC und 24 mg (200 μmol) NHS in 2 ml K-PO₄ gelöst und zur Aktivierung der Carbonsäuregruppen der Poly(acrylsäure) Lösung zugegeben. Die Bildung des Aktivesters ist durch eine leichte Trübung des Reaktionsgemischs erkennbar. Nach 20 min werden 200 mg (100 μmol) Poly(ethylenglycol) α -2-aminoethyl ω -methoxy in 8 ml K-PO₄ zugefügt und die Reaktionslösung mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 8.0 titriert. Bei diesem pH-Wert reagieren die NHS-Aktivester mit den Aminogruppen des Poly(ethylenglycols). Der pH-Wert wird noch 30 min lang kontrolliert und ggf. weiter Natriumhydroxid-Lösung zugesetzt. Anschließend wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufreinigung des Produkts wird über Nacht gegen vollentsalztes Wasser dialysiert (Cellulose-Membran, MWCO 12400).

4.3. Reinigung der Substrate

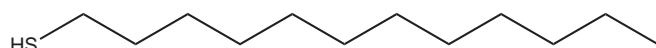
Alle Substrate wurden vor dem Aufbringen von Oberflächenbeschichtungen durch eine einstündige Behandlung mit Ozon gereinigt. Dieses wurde durch Bestrahlung von Luft mit einer Quecksilberdampfampe, Typ NIQ 40/18, der Firma Heraeus, Hanau bei einer Wellenlänge von 254 nm und einer Leistung von 10 W (bei dieser Wellenlänge) generiert. Die Polyelektrolytbeschichtungen auf den Si-ATR-Kristallen wurden durch einstündiges Einlegen in eine 1 : 1 Mischung aus Wasserstoffperoxid und konzentrierter Schwefelsäure wieder entfernt*. Die Lösung wurde mit Wasser abgespült und die Kristalle anschließend noch 10 min lang in Isopropanol mit Ultraschall behandelt. Die adsorbierten Goldnanopartikel wurden mit einer Lösung aus 4 g Kaliumiodid und 1 g Iod in 40 ml Wasser gelöst [149]. Die Ätzrate der Lösung beträgt 0.5 – 1 $\mu\text{m}/\text{min}$ bei Raumtemperatur.

*Die Lösung wirkt stark ätzend und korrosiv! Es ist entsprechende Schutzkleidung zu tragen und ausschließlich unter einem Abzug zu arbeiten!

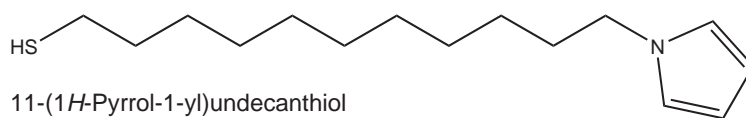
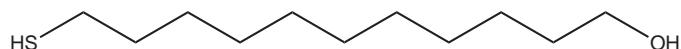
4.4. Präparation der Oberflächenbeschichtungen

4.4.1. Thiolmonolagen auf Gold

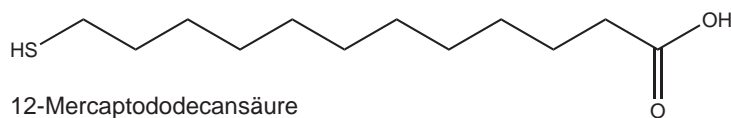
Die Thiolmonolagen wurden aus einer 0.5 mM ethanolischen Lösung der jeweiligen Verbindung präpariert. Die homogen mit Gold beschichteten Substrate wurden hierfür über Nacht bei Raumtemperatur eingelegt, mit Goldnanopartikeln beschichtete Substrate wurden nur für 1 h eingelegt, da bei längeren Inkubationszeiten die Partikel von der Oberfläche gelöst werden können. Anschließend wurden die Proben gründlich mit Ethanol gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und bis zu ihrer Verwendung unter Inertgasatmosphäre aufbewahrt.



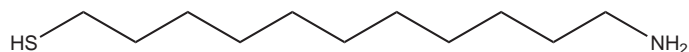
Dodecanthiol

11-(1*H*-Pyrrol-1-yl)undecanethiol

11-Mercaptoundecanol



12-Mercaptododecansäure



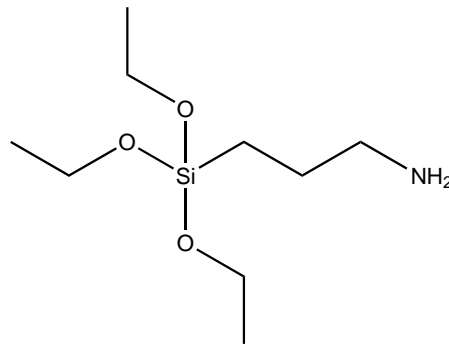
11-Aminoundecanethiol

Abb. 4.3.: Strukturen der verwendeten Thiole.

Die Ge-ATR-Kristalle müssen vor dem Aufbringen der Thiolmonolagen für je 10 min in 48 %-ige Flußsäure[†] eingelegt werden um die native Oxidschicht auf der Germaniumoberfläche zu entfernen [150]. Die Kristalle werden anschließend gründlich mit Wasser und Ethanol gespült und zügig in die Thiollösungen eingetaucht. Die Beschichtung erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur, die weitere Behandlung der Proben ist identisch zu den oben erwähnten Goldsubstraten.

4.4.2. Silane auf Silicium

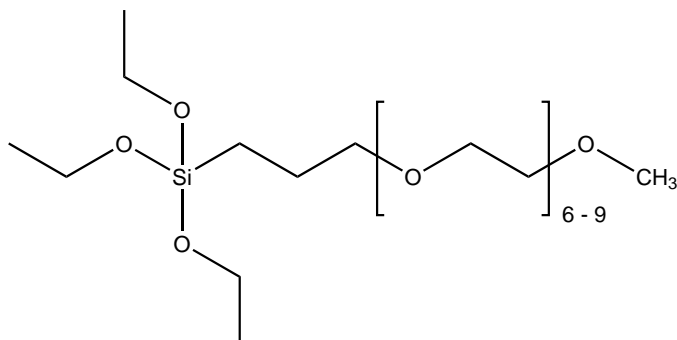
Silanisierung mit (3-Aminopropyl)triethoxysilan



(3-Aminopropyl)triethoxysilan (APTES) wurde bei einer Konzentration von 0.5 vol % in Toluol gelöst und 10 min lang gut gerührt, bis die gereinigten Silicium-Substrate in die Lösung eingetaucht wurden. Das Gefäß wird lediglich mit einer Glaspetrischale abgedeckt, da eine gewisse Luftfeuchtigkeit für die Ausbildung der Si-O-Bindungen vom Silan zum Substrat nötig ist. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde die APTES-Lösung kurz mit Isopropanol abgespült, anschließend wurden die Proben 10 min lang in Ethanol mit Ultraschall behandelt um physisorbierte Silanaggregate zu lösen. Zuletzt wurde noch einmal mit Isopropanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

[†]Beim Umgang mit konzentrierter Flußsäure ist größte Vorsicht geboten! Es ist entsprechende Schutzausrüstung zu tragen, ausschließlich unter einem Abzug zu arbeiten und Calciumgluconatgel zur ersten Hilfe bei HF-Verätzungen bereit zu halten!

Abscheidung von 2-[Methoxy(polyethylenoxy)propyl]trichlorosilan aus der Gasphase



Für die Experimente zur kolloidalen Lithographie wurde auf nanopartikelbeschichtete Siliciumsubstrate 2-[Methoxy(polyethylenoxy)propyl]trichlorosilan (OEG-Silan) aus der Gasphase abgeschieden. Bis zu 4 Proben gleichzeitig wurden hierfür in einen eigens angefertigten Halter aus Teflon gestellt und unter Schutzgasatmosphäre in einen 50 ml Schlenk Kolben gebracht. Unter den Teflonhalter, auf den Boden des Kolbens, wurde ein 10 μ l Tropfen des OEG-Silans gegeben und der Kolben anschließend zügig evakuiert. Bei einem Unterdruck von 3×10^{-3} mbar muss der Kolben mit Hilfe eines Ölbad zusätzlich konstant auf 50 °C gehalten werden um eine ausreichende Menge an OEG-Silan zu verdampfen. Die Gasphasenabscheidung erfolgt über Nacht.

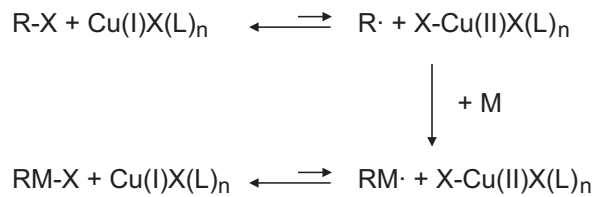
Anschließend werden die Proben kurz mit Wasser abgespült um physisorbierte OEG-Silan Moleküle zur Reaktion zu bringen. Dem folgt eine 10-minütige Ultraschallbehandlung in Ethylacetat um zum einen die nicht gebundenen Silan-Aggregate und zum anderen die Nanopartikel von der Oberfläche zu lösen. Zuletzt wurden alle Proben noch einmal gründlich mit Wasser und Isopropanol gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und bis zu ihrer Verwendung unter Inertgasatmosphäre aufbewahrt. Die Polyelektrolytbeschichtung der freigelegten Adsorptionsplätze erfolgt wie im Abschnitt 4.4.4 beschrieben.

4.4.3. Präparation von Poly(ethylenglykol)methacrylatfilmen auf Silicium

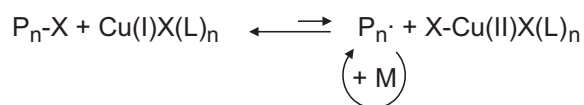
Die radikalische Polymerisation von Poly(ethylenglykol)methacrylat (PEGMA) an der Oberfläche (engl. Surface Initiated Atom Transfer Radical Polymerisation, SI-ATRP) er-

folgt in drei Schritten (Abb. 4.4): der Katalysator, in diesem Fall ein Kupfer(I)komplex, reagiert mit einem oberflächengebundenen, tertiären Alkylhalogenid (Initiator) und erzeugt so ein freies Radikal, an das ein PEGMA-Monomer gebunden wird. Die so an der Oberfläche entstandene aktive Spezies abstrahiert ein Halogenradikal des nunmehr oxidierten Kupfer(II)komplexes, der hierbei wieder zum Kupfer(I)komplex reduziert wird. Dieser Vorgang wiederholt sich so lange, bis kein Monomer mehr vorhanden ist. Die Kettenabbruchreaktion erfolgt entweder durch Rekombination zweier radikalischer Kettenenden oder das Alkylhalogenid an der Oberfläche wird durch Zugabe eines Kettenabbruchreagenzes inaktiviert (z. B. Hydrolyse) [151].

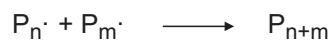
1. Initiierung



2. Kettenwachstum



3. Kettenabbruch

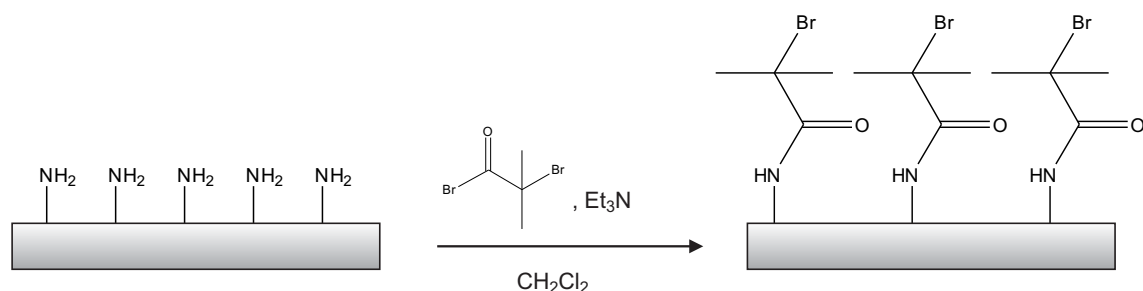


oder



Abb. 4.4.: Mechanismus der kupferkatalysierten ATRP

4.4.3.1. Veresterung der Aminosilanfilme mit Bromisobutyrylbromid



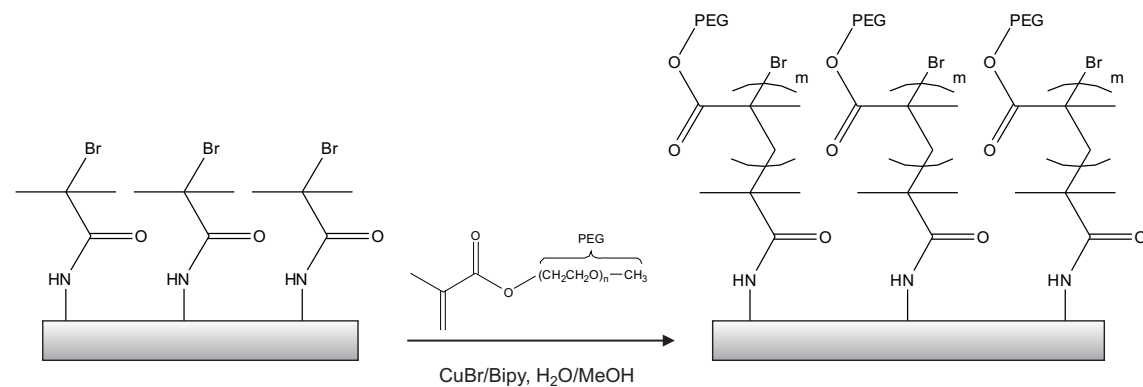
Reagenzien

Bromisobutyrylbromid	150 μ l (0.5 vol %)
Triethylamin	600 μ l (2.0 vol %)
Dichlormethan	30 ml

Durchführung

Die zuvor mit APTES silanisierten Proben wurden unter Inertgasatmosphäre in eine Lösung aus 600 μ l Triethylamin (über KOH getrocknet) in 30 ml Dichlormethan gebracht. Bei 0 °C wurden 150 μ l Bromisobutyrylbromid langsam zugetropft und die Reaktionsmischung 1 h lang bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde noch weitere 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurden alle Proben mit Ethylacetat und Ethanol gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und bis zu ihrer Verwendung unter Inertgasatmosphäre bei 4 °C gelagert.

4.4.3.2. Graftpolymerisation von Poly(ethylenglykol)methacrylat



Reagenzien

PEGMA	150 μ l (0.5 vol %)
2,2'-Bipyridyl	0.2 mmol (67 mg)
Kupfer(I)bromid	0.1 mmol (31 mg)
Wasser	15 ml
Methanol	15 ml

Durchführung

In 30 ml einer entgasten 1 : 1 Mischung aus Wasser und Methanol wurden 150 μ l (0.5 vol %) PEGMA und 67 mg (0.18 mmol) 2,2'-Bipyridyl gelöst. Anschließend wurden noch 31 mg (0.09 mmol) CuBr hinzugegeben, wobei sich die Lösung tiefrot verfärbt. Es wurde noch ca. 1 h bei Raumtemperatur gerührt, bis das CuBr vollständig gelöst war. Dann wurden die mit Bromisobutyrylbromid funktionalisierten Proben im Argongegenstrom hinzugegeben und die Reaktionslösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden die Proben 15 min lang in Wasser und 15 min lang in DMF gewaschen, noch einmal mit Wasser und Ethanol gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und bis zu ihrer Verwendung unter Inertgasatmosphäre aufbewahrt.

4.4.4. Polyelektrolytbeschichtungen auf Silicium

Die Polyelektrolyte PAH, PEI, PSS und PAA-PEG2000 wurden jeweils bei einer Konzentration von 1 mg/ml in Wasser gelöst und können mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Aus diesen Vorratslösungen wurde jeweils ein Aliquot 1 : 1 mit Kaliumphthalat-Pufferlösung, pH 4.0 gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur auf die Si-Substrate aufgetragen. PLL-PEG2000 wurde auch bei 1 mg/ml in Wasser gelöst, jedoch vor der Beschichtung nicht weiter mit Pufferlösung verdünnt. PVP wurde bei einer Konzentration von 20 mg/ml in Ethanol gelöst, die Beschichtung erfolgte ebenfalls über Nacht bei Raumtemperatur. Die Proben wurden anschließend mit Wasser und Ethanol gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und bis zu ihrer Verwendung unter Inertgasatmosphäre aufbewahrt.

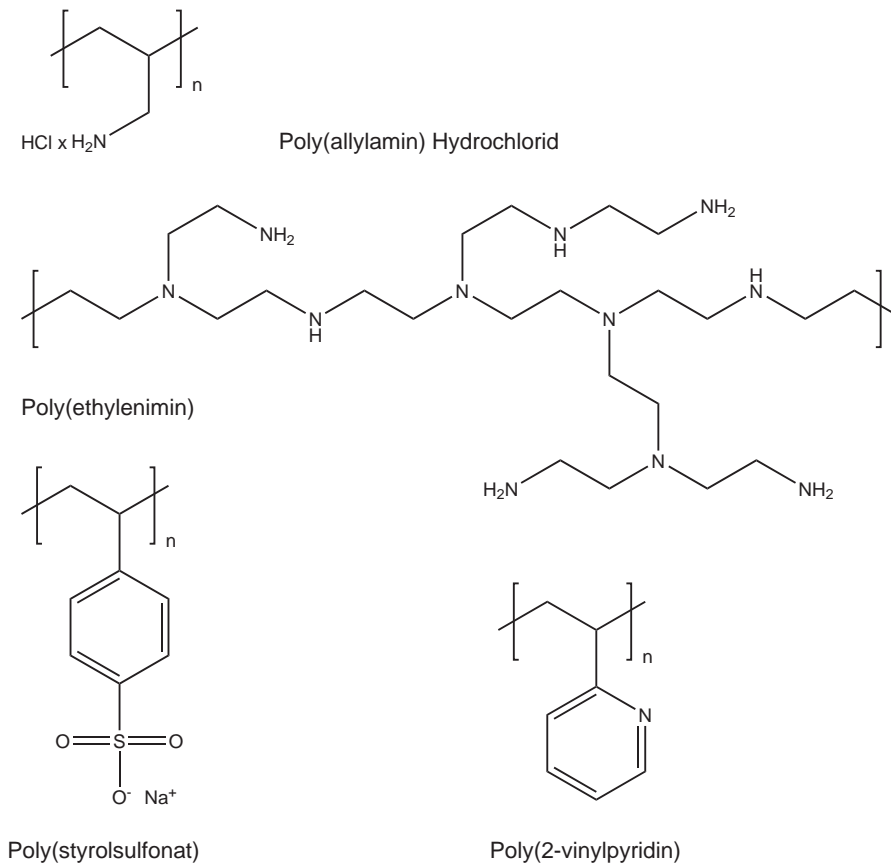


Abb. 4.5.: Strukturen der verwendeten Polyelektrolyte.

4.4.5. Adsorption von Nanopartikeln

4.4.5.1. Statistisch gepackte Monolagen- und Submonolagen

Die Abscheidung von statistisch gepackten Nanopartikelmonolagen kann auf 2 Arten erfolgen:

Adsorption in Gegenwart von NaCl

Die Oberflächenladung der ladungsstabilisierten PS- und Silica-Partikel sowie der verwendeten Substrate kann durch Zugabe eines Elektrolyten (hier NaCl) soweit abgeschirmt werden, dass die attraktiven van-der-Waals-Kräfte zwischen Partikel und Oberfläche überwiegen und die Partikel adsorbieren. Hierfür musste zunächst bestimmt werden, ab welcher NaCl-Konzentration die Partikel aggregieren. Die Partikelsuspensionen wurden im

Verhältnis 1 : 2 mit NaCl-Lösung aufsteigender Konzentration gemischt und für 1 h bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Partikelsuspensionen mit Wasser auf ein Endvolumen von 2 ml verdünnt und am Zetasizer vermessen. Die Bildung von Aggregaten und damit der Koagulationspunkt ist an der Verbreiterung der Größenverteilung der Partikel zu erkennen. Da der Partikelradius mit der 6. Potenz in die Streulichtintensität eingeht, muss für jede Partikelgröße ein geeigneter Verdünnungsfaktor experimentell bestimmt werden.

Die Adsorption der Partikel erfolgte schließlich bei einer NaCl-Konzentration, die für eine Koagulation der Partikel eben noch nicht ausreichend war. Zur Adsorption wurden die gereinigten Substrate für 1 h bei Raumtemperatur mit Partikel-/NaCl-Suspension bedeckt und anschließend vorsichtig mit Wasser gespült. Es ist darauf zu achten, dass das Waschwasser nur auf den äußersten Rand der Probe gespritzt wird, da sich sonst bereits adsorbierte Partikel wieder lösen können. Dabei wird die Probe leicht schräg gehalten, damit das herab laufende Wasser die Partikelsuspension abspülen kann. Die Proben wurden zum Trocknen auf ein Stück Zellstoffpapier gelegt und mit einer Glaspetrischale abgedeckt. Um die Oberflächenbedeckung zu optimieren, wurden - ausgehend vom oben gefundenen Konzentrationswert - wiederum Proben bei einer Reihe verschiedener NaCl-Konzentrationen präpariert und das Ergebnis am REM überprüft.

Elektrostatische Adsorption

Zwischen Partikel und Oberfläche herrschen attraktive, elektrostatische Wechselwirkungen, wenn diese entgegengesetzte Ladungen tragen. Zur Adsorption der negativ geladenen, citratstabilisierten AuNP wurden diese auf ein zuvor mit einem positiv geladenen PE bzw. ein mit APTES beschichtetes Si-Substrat gegeben. Mit einem positiv geladenem PE beschichtete PS- oder Silica-Nanopartikel wurden direkt auf das gereinigte Si-Substrat gegeben. Die Adsorption erfolgte jeweils über Nacht bei 4 °C. Die Proben wurden nach der Partikeladsorption gründlich mit Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die attraktiven Wechselwirkungen zwischen Partikel und Oberfläche sind bei der elektrostatischen Adsorption deutlich stärker ausgeprägt als bei der oben beschriebenen Methode der Adsorption in Gegenwart von NaCl, so dass hier ein Ablösen der Partikel während des Spülens nicht zu befürchten ist.

4.4.5.2. Hexagonal dichtest gepackte Monolagen

Zur Präparation von hexagonal dichtest gepackten Partikelmonolagen wurden 2 verschiedene Verfahren genutzt:

1. Die ca. 1 x 1 cm großen Substrate wurden auf einen um 9° geschrägten Metallblock gelegt und ein 10 µl Tropfen einer 0.125 % (w/v) Partikelsuspension darauf pipettiert. Die Proben wurden mit einer Glaspetrischale abgedeckt und bei konstanter Temperatur von 20 °C (Wasserbadkühlung) getrocknet [8]. Die Trocknung dauert etwa 2 Tage.
2. Die Partikel wurden abzentrifugiert und der Überstand durch 3 Teile Wasser und 1 Teil Isopropanol ersetzt. Die Proben mit einer Größe von 1.5 x 1.5 cm wurden auf den Drehteller eines Spin-Coaters gelegt und dort mit Unterdruck fixiert. Auf die Proben wurden 30 µl Partikelsuspension pipettiert und diese bei einer Umdrehungszahl von 100 rpm für 10 sec gleichmäßig verteilt. Schließlich wurden die Proben für weitere 60 sec bei 800 – 1000 rpm (abhängig von der Partikelgröße) gedreht um Wasser und Isopropanol zu verdampfen und überschüssige Partikel abzuschleudern.

4.5. Proteinquantifizierung

4.5.1. Quantifizierung in Lösung

Beim verwendeten GOx-Präparat handelte es sich um ein Lyophilisat mit Puffersalz, dessen Proteingehalt nicht exakt bekannt war. Um die Proteinadsorptionsexperimente immer bei gleicher Proteinkonzentration durchführen zu können, musste daher zunächst der Anteil an GOx im Lyophilisat bestimmt werden. Hierfür wurde die Methode nach Lowry verwendet, die auf zwei Teilreaktionen beruht [152]:

1. Peptidbindungen bilden in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} -Ionen einen blau-violett gefärbten, quadratisch-planaren Komplex (Biuretreaktion). Cu^{2+} wird im Protein-Komplex zu Cu^+ reduziert.

2. Die Cu^+ -Ionen reduzieren wiederum das Folin-Ciocalteu Reagenz, dessen reaktive Spezies hauptsächlich Mo^{6+} - und W^{6+} -Heteropolysäuren sind. Die Farbe der Lösung schlägt dabei von gelb nach tief blau um.

Reagenzien

Lösung A:	1 % (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Lösung B:	2 % (w/v) Dinatriumtartrat
Lösung C:	2 % (w/v) Na_2CO_3
Lösung D:	100 μl Lösung A 100 μl Lösung B 9.8 ml Lösung C

Durchführung

Das GOx-Lyophilisat wurde in 100 mM Acetat-/100 mM NaCl-Puffer gelöst und durch einen Spritzenvorsatzfilter der Porengröße 0.2 μm sterilfiltriert. 200 μl dieser Lösung wurden mit 1 ml Lösung D und 100 μl Folin-Ciocalteu Reagenz gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei $\lambda = 750\text{ nm}$ die Extinktion gemessen. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte durch Anpassung an eine Eichgerade, die mit einem BSA-Standard in verschiedenen Verdünnungen erstellt wurde (Abb. 4.6). Schließlich wurde von der selben GOx-Lösung, die zur Proteinbestimmung nach Lowry verwendet wurde, die Extinktion bei $\lambda = 280\text{ nm}$ gemessen. Bei dieser Wellenlänge absorbieren aromatische Aminosäureseitenketten. Mithilfe der einmal bestimmten Extinktion bei 280 nm kann später die Konzentration für jede neu angesetzte GOx-Lösung bestimmt werden. Der molare Extinktionskoeffizient von GOx bei 280 nm ist $\epsilon_{280} = 218369\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ bzw. $E_{280} = 1.67$ bei $c(\text{GOx}) = 1\text{ mg/ml}$ und einer Pfadlänge von 1 cm.

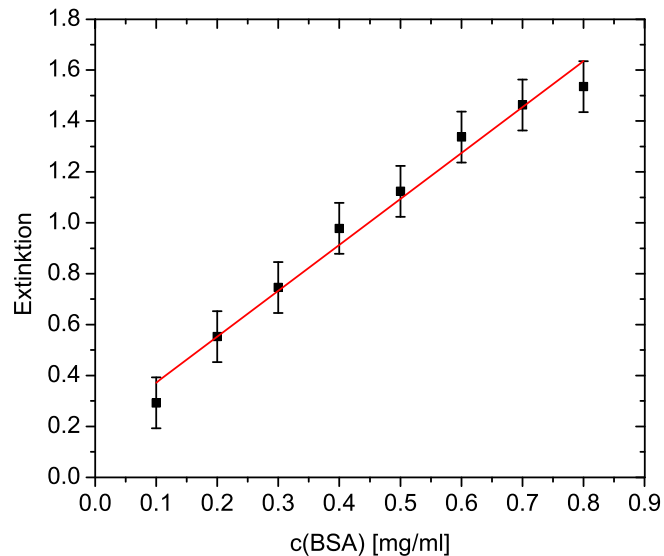


Abb. 4.6.: Eichgerade der Proteinbestimmung nach Lowry

4.5.2. Adsorbatquantifizierung - ELISA

4.5.2.1. Proteinadsorption

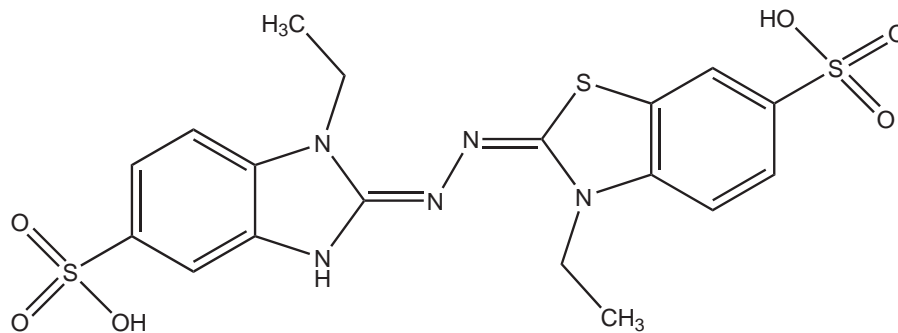
Alle Proben für die ELISA-Quantifizierung wurden vor der Proteinadsorption gewogen. Aus dem Gewicht wurde mit Hilfe der Dichte ρ des Substrats und dessen durchschnittlicher Höhe h die Fläche berechnet, auf der die Proteine adsorbiert wurden ($\rho_{Si} = 2.336 \text{ g/cm}^3$, $h = 500 \text{ }\mu\text{m}$). Dann wurde eine GOx-Lösung mit $c = 1 \text{ mg/ml}$ in 100 mM Acetat-/ 100 mM NaCl-Puffer (sterilfiltriert, s. o.) auf die Proben pipettiert und 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Substrat wurde zusätzlich eine Probe mit BSA inkubiert um später das Ergebnis der Quantifizierung bezüglich unspezifischer Antikörperadsorption korrigieren zu können. Da kein HRPO-konjugierter, gegen GOx spezifischer Antikörper (AK) erhältlich war, folgte nun die Inkubation mit einem anti-GOx spezifischen Antikörper ohne Markierung. Anschließend wurde mit einem HRPO-konjugierten, gegen den anti-GOx-AK spezifischen Zweitantikörper inkubiert. Die Antikörperlösungen wurden jeweils $1 : 600$ in 1% (w/v) BSA in PBS verdünnt und über Nacht bei Raumtemperatur adsorbiert. Alle Proteinlösungen wurden jeweils mit viel Wasser ausgespült und noch $3 \times$ für je 10 min mit PBS gewaschen.

4.5.2.2. Quantifizierung

Die ELISA-Quantifizierung beruht auf der enzymatischen Umsetzung des Farbstoffs ABTS zum Radikalkation durch HRPO in Gegenwart von H_2O_2 :



Diese Reaktion kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$ spektralphotometrisch verfolgt werden. Die Menge an umgesetztem Chromophor ist der Menge an HRPO proportional.



2,2'-Azino-di(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS)

Reagenzien

ABTS Diammoniumsalz	87 μmol (40 mg)
100 mM Acetat-/100 mM NaCl-Puffer, pH 5.5	50 ml
Wasserstoffperoxid (37 %-ige Lösung)	

Durchführung

Die nach obigem Protokoll präparierten Proben wurden in 1 x 1 cm Makroküvetten aus Polystyrol geklebt. Auf diese Weise wurde sicher gestellt, dass die Reaktion nur an der mit GOx beschichteten Seite der Probe stattfinden konnte und eventuell unspezifisch auf der Rückseite der Proben adsorbierte Antikörper das Messergebnis nicht beeinflussen konnten. Anschließend wurden in die Küvetten 3 ml einer 1.74 mM ABTS-Lösung in Acetat-Puffer, pH 5.5, pipettiert. Die Temperatur wurde während der Messung konstant bei 37 °C

gehalten. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μl Wasserstoffperoxid gestartet und anschließend bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ die Änderung der Extinktion verfolgt. Es wurde über einen Zeitraum von 3 min alle 15 sec ein Messpunkt aufgezeichnet, wobei die Reaktionslösung jeweils kurz vor Speicherung eines Messpunkts gut gerührt wurde. Pro Substrat wurden 3 Messungen durchgeführt, aus denen später der Mittelwert gebildet wurde. Die gemessenen Extinktionswerte wurden gegen die Zeit aufgetragen und die Geradensteigungen mittels linearer Regression errechnet. Diese Werte sind der Menge an adsorbiertem HRPO-AK proportional. Der Proportionalitätsfaktor wurde mit Hilfe einer Eichgerade bei HRPO-AK-Konzentrationen von 3 – 35 ng/ml ermittelt (Abb. 4.7). Die Eichung setzt voraus, dass die Aktivität der konjugierten HRPO in Lösung ähnlich der im immobilisierten Zustand ist. Weiterhin wurde davon ausgegangen, dass pro adsorbiertem Molekül GOx genau 1 HRPO-AK bindet. Die so ermittelte Menge an HRPO-AK Adsorbat wurde durch den Quotienten der Molekulargewichte des HRPO-AK und der GOx geteilt um die Menge an adsorbierter GOx zu bestimmen: $M(\text{HRPO-AK}) = 188 \text{ kDa}$, $M(\text{GOx}) = 131 \text{ kDa}$; $M(\text{HRPO-AK}) : M(\text{GOx}) = 1.4$. Schließlich wurden alle Werte noch um die Menge an unspezifisch adsorbierten AK korrigiert, die anhand der Blindprobe, die mit BSA anstelle von GOx inkubiert wurde, festgestellt wurde.

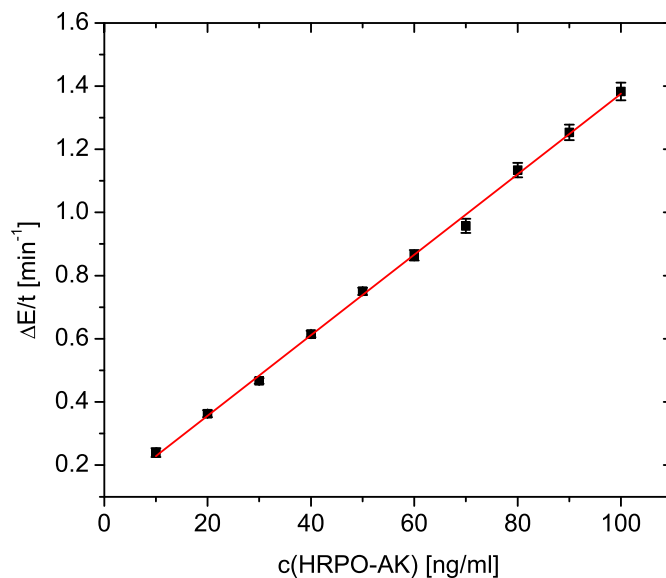


Abb. 4.7.: Eichgerade der ELISA-Quantifizierung

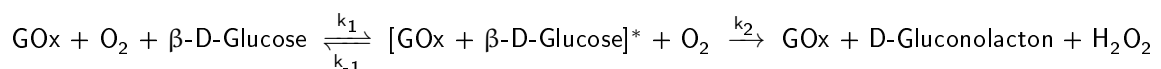
4.6. Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Glucose Oxidase

4.6.1. Proteinadsorption

GOx wurde bei einer Konzentration von 1 mg/ml in 100 mM Acetat-/100 mM NaCl-Puffer gelöst und durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von 0.2 μm sterilfiltriert[†]. Da es für die Bestimmung der Enzymaktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen nötig ist, mit einer konstanten Enzymkonzentration zu arbeiten, erfolgte die GOx-Adsorption für die Aktivitätsmessreihen auf eine definierte Fläche der jeweiligen Substrate. Hierfür wurden aus einem Siloxanprecursor und einem Vernetzer im Verhältnis 10 : 1 PDMS-Elastomere gegossen, aus denen nach dem Aushärten bei 60 °C über Nacht im Trockenschrank mit Hilfe eines Locheisens 0.5 x 1.0 cm große Aussparungen ausgestochen wurden. Die Schablonen wurden zurecht geschnitten, auf die Oberflächen gedrückt und schließlich 80 μl Proteinlösung durch die Aussparung pipettiert. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass die GOx immer auf der gleichen Fläche adsorbiert. Es wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, die Proteinlösung anschließend mit viel Wasser ausgespült und die Proben noch 3 x für je 10 min in PBS gewaschen.

4.6.2. Aktivitätsbestimmung

Da die enzymatische Umsetzung von Glucose durch GOx nicht direkt spektralphotometrisch detektiert werden kann, erfolgt die Bestimmung der Enzymaktivität indirekt durch Kopplung an die unter Abschnitt 4.5.2.2 genannte Umsetzung des Chromophors ABTS durch das Enzym HRPO:



[†]Die GOx-Lösung kann bis zu einer Woche im Kühlschrank aufbewahrt werden, ohne dass das Enzym merklich an Aktivität verliert. Die Lösung darf jedoch nicht eingefroren werden, dies führt zu nahezu vollständigem Aktivitätsverlust des Enzyms!

Bedingung für diese Methode ist, dass $c(\text{HRPO}) \gg c(\text{GOx})$, um zu gewährleisten, dass nicht HRPO sondern GOx das geschwindigkeitsbestimmende Enzym ist.

Durchführung

Die Proben wurden analog zur ELISA-Quantifizierung in 1 x 1 cm Makroküvetten geklebt. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung ist wie folgt:

1.74 mM ABTS in Acetat-Puffer, pH 5.5	2670 μl ($c(\text{Glucose}) \leq 250 \text{ mM}$) bzw. 2370 μl ($c(\text{Glucose}) > 250 \text{ mM}$)
10 mg/ml HRPO in Acetat-Puffer, pH 5.5	30 μl
β -D-Glucose, Verdünnung aus	300 μl ($c \leq 250 \text{ mM}$) bzw. 600 ($c > 250 \text{ mM}$)
2.5 M Vorratslösung	

Die Temperatur betrug während der Messung konstant 37 °C. Nach Zugabe des Substrats wurde über einen Zeitraum von 3 min alle 15 sec ein Messpunkt aufgezeichnet, wobei die Reaktionslösung jeweils kurz vor Speicherung eines Messpunkts gut gerührt wurde. Im Falle von GOx-Adsorbaten auf homogen beschichteten Substraten, wurden bei 15 Substratkonzentrationen von 1 – 500 mM die Extinktionswerte bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ gegen die Zeit aufgetragen und mittels linearer Regression die Geradensteigungen ermittelt. Für jedes Substrat wurde die Messreihe mindestens 1 x wiederholt um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Anschließend wurden die berechneten Geradensteigungen gegen die jeweiligen Substratkonzentrationen aufgetragen und an die so erhaltene Kurve eine inverse Hyperbel gemäß der Michaelis-Menten-Gleichung angepasst:

$$y = \frac{P_1 \cdot x}{P_2 + x}$$

Mit den Gleichungen 2.3 und 2.4 folgt:

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M ist direkt aus dem Fit-Parameter P_2 abzulesen. Der Fit-Parameter P_1 , der den Maximalwert der Extinktionsänderung mit der Zeit $(\Delta E/t)_{\max}$ darstellt, ist der Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} der GOx proportional. Die Proportionalitätskonstante errechnet sich gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gl. 3.1) aus dem

Produkt des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ des Farbstoffs ABTS bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ und der Pfadlänge der Küvette d . Zusätzlich muss der Reaktionsstöchiometrie mit einem Faktor 2 Rechnung getragen werden, da die Oxidation von Glucose ein Zweielektronenprozess ist und somit für jedes Mol Substrat 2 Mole ABTS oxidiert werden. Aus v_{\max} kann schließlich die spezifische Aktivität A in Abhängigkeit von der Menge des Enzyms berechnet werden:

$$A = \frac{(\Delta E/t)_{\max}}{2 \cdot \epsilon_{405} \cdot d \cdot [\text{GOx}]_0} \quad (4.1)$$

- ϵ_{405} : Extinktionskoeffizient des ABTS-Radikalkation bei $\lambda = 405 \text{ nm}$
($\epsilon_{405} = 36800 \frac{\text{l}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$)
- d : Pfadlänge der Küvette ($d = 1 \text{ cm}$)
- $[\text{GOx}]_0$: Gesamtkonzentration an Enzym

A wird üblicherweise in U/mg angegeben, wobei U ein Maß dafür ist, wie viele μmol Substrat pro Minute umgesetzt werden. Die Konzentration der GOx ist aus dem ELISA-Experiment bekannt.

Da auf strukturierten Substraten die bei kleinen Substratkonzentrationen gemessenen Enzymaktivitäten mit einem großen Fehler behaftet waren, wurde nur bei maximaler Substratkonzentration ($c(\text{Glucose}) = 500 \text{ mM}$) 3 x die Reaktionsgeschwindigkeit gemessen und hieraus die Aktivität bestimmt. Eine Bestimmung von K_M , die zuverlässige Messwerte im gesamten Konzentrationsbereich erfordert, war daher in diesem Fall nicht möglich, so dass keine Aussage über die Substrataffinität getroffen werden kann.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Kolloidale Lithographie

In der Literatur wurden in der Vergangenheit bereits Experimente veröffentlicht, die zeigen, dass mit Hilfe der kolloidalen Lithographie nanostrukturierte Oberflächen mit einer Strukturgröße von etwa 100 nm präpariert werden können [64, 69]. Michel et al. bzw. Denis et al. gehen jeweils von einer rcp-Monolage von 100 nm PS-Nanopartikeln auf den entsprechenden Substraten (Gold bzw. Titandioxid) aus, d. h. die Größe der Strukturen wird direkt durch den Partikeldurchmesser bestimmt. Bei Michel et al. wird weiterhin beschrieben, wie auf den erzeugten Strukturen selektiv Proteine deponiert werden, indem die Strukturumgebung gegenüber Proteinadsorption passiviert wird. Möchte man dieses Konzept nun dafür benutzen, einzelne Proteine unter Erhaltung ihrer nativen Konformation separiert voneinander auf einer Oberfläche abzuscheiden, so müssen Nanopartikel verwendet werden, deren Durchmesser gerade so groß ist wie das Protein, welches abgelegt werden soll. Hierfür kommen z. B. Polystyrolpartikel mit einem Durchmesser von 20 nm in Frage, die in guter Größenverteilung käuflich erwerblich sind und in etwa so groß sind wie die längste Achse des Modellproteins Glucose Oxidase (vgl. Kap. 2.5). Wählt man nun schrittweise den Durchmesser der zur Strukturierung verwendeten Partikel immer größer, so sollte es weiterhin möglich sein, das adsorbierte Protein gezielt zu entfalten.

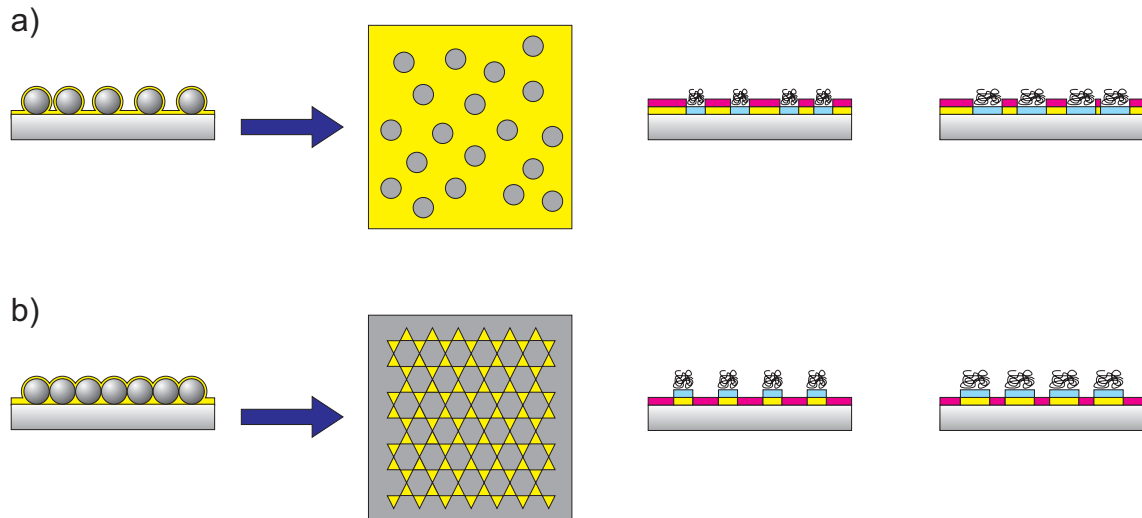


Abb. 5.1.: Präparation von nanostrukturierten Oberflächen zur gezielten Proteinadsorption. a) Eine rcp-Partikelmonolage dient als Maske zur Metallisierung. Die metallisierte Fläche wird gegenüber Proteinadsorption passiviert (magenta), die Proteine können nur an den Stellen adsorbieren, die zuvor mit Nanopartikeln bedeckt waren. b) Verwendet man einen hdp-Partikelfilm als Metallisierungsmaske, so können auch die metallisierten Bereiche als Adsorptionsplätze ausgelegt werden. Alternativ kann anstelle von Metall auch eine proteinresistente Verbindung, die gegenüber dem Substrat reaktiv ist, abgeschieden werden. Die Adsorptionsplätze können in beiden Fällen chemisch modifiziert werden (blau). Verwendet man größere Nanopartikel, so werden auch die Adsorptionsplätze größer und das Protein kann entfalten (siehe rechte Spalte der Abbildung).

Die Abbildung 5.1 a) veranschaulicht die Konfiguration mit rcp-Kolloidmasken als Grundlage. Hier sind die oxidischen Bereiche des Substrats als Adsorptionsplätze ausgelegt, die metallisierte Fläche wird mit OEG-terminierten Alkanthiolen proteinresistent beschichtet.

Alternativ können auch ausgehend von hdp-Partikelmonolagen, wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben, Dreiecksstrukturen präpariert werden (Abb. 5.1 b)). Die Höhe h der Dreiecke hängt mit dem Partikelradius R wie folgt zusammen:

$$h \approx R \cdot (2 \cdot \sin(60^\circ) - 1)$$

d. h. bei Verwendung von 100 nm Partikeln ist z. B. eine Höhe von etwa 37 nm zu erwarten, bei Verwendung von 50 nm Partikeln würde die Höhe in etwa 18 nm messen. In dieser Konfiguration ist die Dreiecksstruktur als Adsorptionsfläche ausgelegt, die oxidische

Umgebung muss proteinresistent funktionalisiert werden. Der Vorteil gegenüber der Verwendung von rcp-Monolagen als kolloidale Masken, ist, dass sowohl die experimentelle Handhabung etwas größerer Partikel (50 – 100 nm) einfacher ist und diese kommerziell auch in besseren Größenverteilungen erhältlich sind.

5.1.1. Adsorption von PS- und SiO₂-Nanopartikeln in Gegenwart von NaCl

Zur Präparation von rcp-Partikelfilmen sollte ursprünglich die Methode nach Himmelhaus und Takei gewählt werden [7, 153]. In ihren ersten Experimenten adsorbierten sie PS-Nanopartikel auf verschiedenen funktionalisierte Goldoberflächen in Gegenwart des Makromoleküls N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid (EDC). Ihren Überlegungen zufolge sollte bei kleinen EDC-Konzentrationen ein anderer Adsorptionsprozess dominieren, als bei hohen EDC-Konzentrationen. Himmelhaus und Takei fanden, dass bei kleinen EDC-Konzentrationen die Partikel bereits sehr dicht auf eine negativ geladen funktionalisierte Goldoberfläche adsorbiert werden können, wohingegen auf eine hydrophob und ungeladen funktionalisierte Oberfläche kaum Partikel adsorbierten. Da das EDC-Molekül unter den gewählten experimentellen Bedingungen positiv geladen und die PS-Partikel negativ geladen sind, gingen sie davon aus, dass ein Teil der EDC-Moleküle auf die Partikeloberfläche adsorbiert. Demzufolge müssten bei kleinen EDC-Konzentrationen attraktive Coulomb-Kräfte zwischen den nun positiv geladenen Partikeln und einer negativ geladenen Oberfläche herrschen. Da bei großen EDC-Konzentrationen die PS-Partikel gleichermaßen dicht auf die negativ geladene Oberfläche und auf die hydrophobe Oberfläche abgeschieden werden konnten, formulierten Himmelhaus und Takei die These, dass unter diesen Bedingungen entropische Kräfte das System dominieren. In weiterführenden Experimenten konnten sie zeigen, dass es für einige Kombinationen aus PS-Partikeln verschiedener Größe und metallischen, sowie oxidischen Substraten jeweils eine optimale EDC-Konzentration gibt, bei der die Maximalbedeckung von 54.7 % einer statistisch dicht gepackten Monolage erreicht wird. Ausgehend von der Theorie, dass bei hohen EDC-Konzentrationen hauptsächlich entropische Kräfte das System beherrschen, ist die Konzentration an Makromolekül, die für eine maximale Oberflächenbedeckung benötigt wird, lediglich abhängig von der Größe der Partikel sein, jedoch nicht von ihrer chemischen Beschaffenheit sowie der chemischen Natur des Substrats. In Abbildung 5.2 wird das Prinzip illustriert:

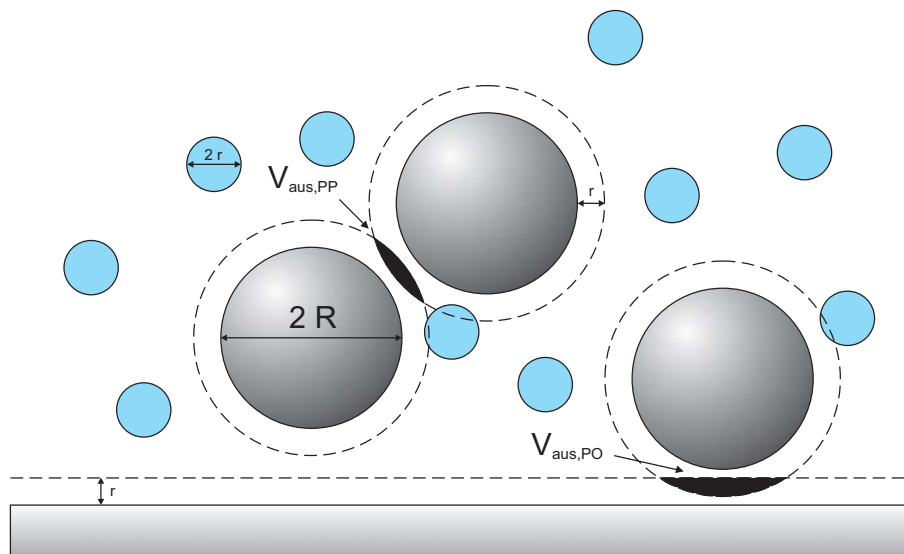


Abb. 5.2.: Veranschaulichung der entropischen Kräfte, die die Partikeladsorption verursachen.

Man betrachtet die Partikel mit dem Radius R und die Makromoleküle mit dem Radius r in der Nähe einer Oberfläche. Die Mittelpunkte der Makromoleküle können sich den Partikeln nur bis auf den Abstand r nähern, so dass es um jedes Partikel ein für die Makromoleküle ausgeschlossenes Volumen V_{aus} gibt. Nähern sich die Partikel untereinander oder der Oberfläche, so überlappen die Volumina V_{aus} und den Makromolekülen steht mehr Platz zur Verfügung. Für den Fall dass es sehr viel mehr Makromoleküle als große Partikel im System gibt, bedeutet diese Volumenvergrößerung eine Vergrößerung der Konfigurationsentropie, d. h. sowohl die Aggregation der Partikel als auch die Adsorption auf die Oberfläche sind für das System als entropisch günstig anzusehen. Aus rein geometrischen Gründen ist das Ausschlussvolumen zwischen Partikel und Oberfläche $V_{\text{aus,PO}}$ etwas größer als das Ausschlussvolumen zwischen 2 Partikeln $V_{\text{aus,PP}}$, was nichts anderes bedeutet, als dass bei einer bestimmten Konzentration an Makromolekülen die Adsorption der Partikel auf die Oberfläche entropisch günstiger ist als die Aggregation der Partikel untereinander. Zur Bildung einer möglichst dicht gepackten Monolage muss demnach die Konzentration der Makromoleküle knapp unterhalb der kritischen Konzentration der Partikelaggregation gewählt werden.

Aus der obigen Darstellung geht bereits hervor, dass die maximale Reichweite der entropischen Kräfte nur $2 \cdot r$ beträgt, da die Ausschlussvolumina nur bis zu diesem Wert überlappen können. Für EDC beträgt die maximale Reichweite beispielsweise etwa 0.9 nm. In einer weiterführenden Arbeit am Lehrstuhl für Angewandte Physikalische Chemie konnte bereits für die Kombination aus 365 nm PS-Partikeln und Au als Substrat sowohl rechnerisch als auch experimentell gezeigt werden, dass dispersive und elektrosta-

tische Kräfte sehr viel größere Reichweiten haben und entropische Kräfte demnach nur eine untergeordnete Rolle für das System spielen [65]. Den Experimenten von J. Berndt zufolge ist es möglich, durch Zusatz eines Elektrolyten wie Kochsalz die negativ geladenen PS-Partikel sowohl auf eine negativ geladene als auch auf eine hydrophobe, ungeladene Oberfläche zu adsorbieren. Die Salzkonzentration zur Erreichung der Maximalbedeckung ist dabei in etwa gleich. Da es sich bei Kochsalz um eine ionische Verbindung und nicht um ein Makromolekül handelt, kann der Adsorptionsprozess hier also nicht von entropischen Kräften beeinflusst werden. Wie bereits im Abschnitt 3.6.1 beschrieben, lagern sich die Ionen einer Elektrolytlösung in komplementären Schichten um ein geladenes Teilchen herum an. Die Elektrolytlösung vermag ab einer bestimmten Konzentration die repulsiven Kräfte zwischen den Partikeln bzw. den Partikeln und einer gleich geladenen Oberfläche soweit abzuschirmen, dass attraktive van-der-Waals-Wechselwirkungen überwiegen und die Partikel entweder aggregieren oder auf die Oberfläche adsorbieren. Im Falle einer ungeladenen Oberfläche kann man sich vorstellen, dass in Abwesenheit einer Elektrolytlösung zwar einige Partikel auf die Oberfläche adsorbieren, da von der Oberfläche keine repulsive Coulomb-Kraft ausgeht. Es können jedoch einige wenige Partikel, die sich auf dem Substrat befinden, mit ihrer Oberflächenladung eine weitere Adsorption von Partikeln verhindern, so dass keine dicht gepackten Monolagen entstehen können. Somit ist auch hier ein Zusatz von Elektrolyt nötig, um das repulsive Oberflächenpotential der Partikel abzuschirmen.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, PS- und SiO_2 -Nanopartikel in Gegenwart von NaCl auf Gold- und Siliciumoberflächen zu adsorbieren. Hierfür ist es zunächst nötig, die kritische NaCl-Konzentration zu finden, ab der die Partikel beginnen zu aggregieren, da genau an diesem Punkt die repulsiven Kräfte zwischen den Partikeln am kleinsten sind und dann auch die Adsorption auf eine Oberfläche energetisch günstig sein sollte. Die Koagulationspunkte von 20 nm und 100 nm PS-Partikeln sowie 50 nm und 100 nm SiO_2 -Partikeln wurden mit Hilfe der DLS experimentell bestimmt.

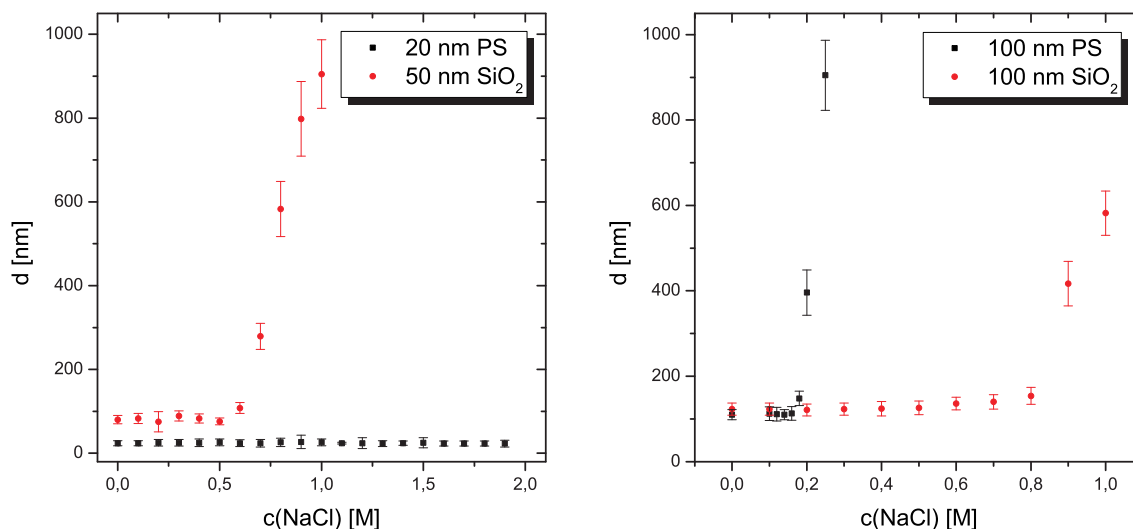


Abb. 5.3.: Koagulationspunkte der verwendeten Nanopartikel.

Die Abbildung 5.3 zeigt, dass die kritische Konzentration an NaCl, bei der die Partikel zu aggregieren beginnen, für die verwendeten 100 nm PS-Partikel bei etwa 0.18 M liegt, wohingegen die Silica-Partikel erst bei höheren NaCl-Konzentrationen koagulieren (etwa 0.6 M für 50 nm SiO₂ bzw. 0.8 M für 100 nm SiO₂). Die 20 nm PS-Partikel konnten bei keiner experimentell realisierbaren NaCl-Konzentration zur Koagulation gebracht werden. Die Koagulationspunkte schwanken bei Verwendung verschiedener Chargen Nanopartikel gleicher Größe, was darauf schließen lässt, dass die chemische Zusammensetzung der Partikel nicht immer exakt identisch ist. Laut Herstellerangabe ist den 20 nm PS-Partikeln das Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) als Stabilisator zugesetzt, welches sich auch durch Zentrifugation nicht vollständig abtrennen ließ. Solche Additive beeinflussen die effektive Oberflächenladung der Partikel und folglich auch die Menge an NaCl, die bis zur Aggregation zugesetzt werden kann.

Anhand von REM-Aufnahmen wurde anschließend die optimale Menge an NaCl bestimmt, bei der die Partikel in größt möglicher Dichte auf einer Gold- bzw. Siliciumoberfläche adsorbieren. Wie oben bereits erwähnt, sollte die entsprechende NaCl-Konzentration knapp unterhalb des Koagulationspunktes der jeweiligen Partikel liegen. Die Abbildung 5.4 zeigt exemplarisch für 100 nm SiO₂-Partikel, die auf Silicium adsorbiert wurden, wie mit steigender NaCl-Konzentration auch die Oberflächenbedeckung zunimmt, bis an einigen Stellen schließlich die Ausbildung von Multilagern beginnt.

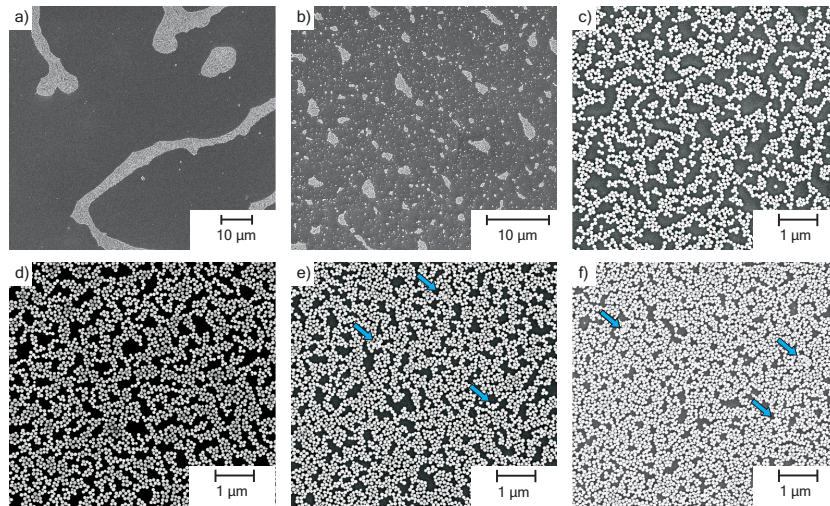


Abb. 5.4.: Adsorption von 100 nm SiO_2 -Partikel bei steigender NaCl-Konzentration auf Silicium. Die Bedeckungsdichte steigt mit zunehmender NaCl-Konzentration von a) 0.1 M, b) 0.2 M, c) 0.3 M bis d) 0.35 M auf den Maximalwert von etwa 54 % an. Bei Zugabe von e) 0.4 M und f) 0.5 M NaCl ist bereits leichtes Multilagenwachstum erkennbar (mit blauen Pfeilen markiert).

In Abbildung 5.5 sind die Ergebnisse für die jeweilige Maximalbedeckung der verwendeten Nanopartikel auf den Substraten Silicium bzw. Gold zusammengefaßt.

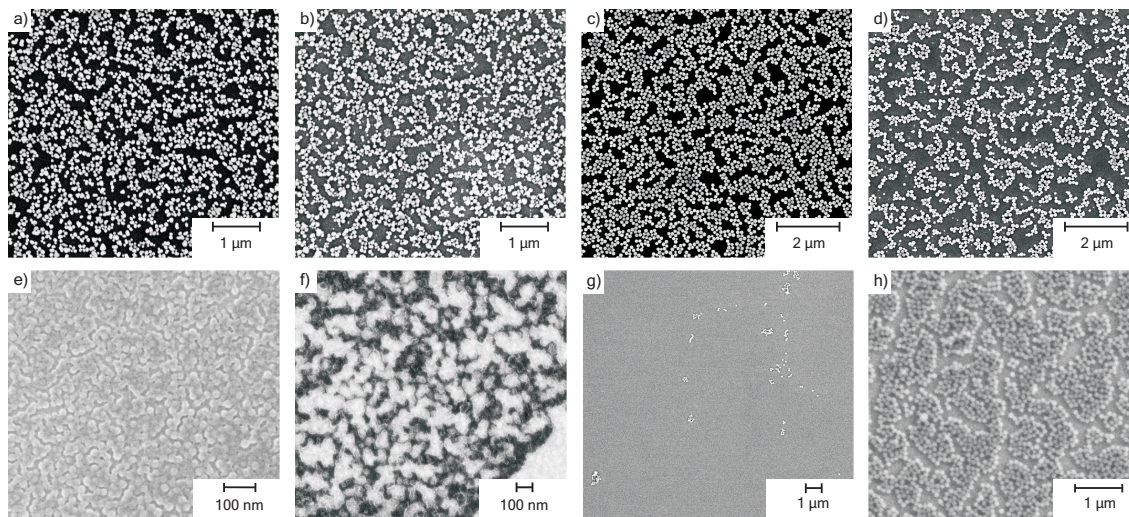


Abb. 5.5.: SiO_2 - und PS-Partikel bei maximaler Bedeckung auf Au bzw. Si adsorbiert: 50 nm SiO_2 auf a) Si bzw. b) Au, 100 nm SiO_2 auf c) Si bzw. d) Au, 20 nm PS auf e) Si bzw. f) Au, 100 nm PS auf g) Si bzw. h) Au.

Für die 50 nm SiO_2 -Partikel wird auf Si eine maximale Bedeckung von 43 % bei 0.32 M NaCl erreicht, auf Au beträgt die Maximalbedeckung etwa 43 % bei 0.20 M NaCl. Die 100 nm SiO_2 -Partikel adsorbieren bei 0.35 M NaCl mit einer Bedeckung von 54 % auf Si

und bei 0.24 M NaCl mit einer Bedeckung von 46 % auf Au. Auf den REM-Bildern ist auch die schlechte Größenverteilung der kommerziell erhältlichen 50 nm SiO₂-Partikel zu erkennen (Abb. 5.5 a) und b)).

Die 20 nm PS-Partikel können auf Silicium ab einer NaCl-Konzentration von etwa 1.4 M adsorbiert werden, auf Au werden etwa 0.6 M NaCl benötigt. Um eine gute Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, müssen die 20 nm PS-Partikel allerdings in leicht gepufferter Lösung (10 mM Kaliumphosphat-Puffer) bei neutralem pH Wert adsorbiert werden. Im Falle der 100 nm PS-Partikel wird in Gegenwart von 0.15 M NaCl die maximale Oberflächenbedeckung auf Au erreicht. Die 100 nm PS-Partikel konnten bei keiner NaCl-Konzentration auf Si adsorbiert werden, auch nicht in gepufferter Lösung. Aufgrund des schlechten Kontrastes der REM-Bilder konnte die genaue Oberflächenbedeckung der adsorbierten PS-Partikel nicht bestimmt werden, sie wird jedoch für die 20 nm PS-Partikel auf Si sowie die 100 nm PS-Partikel auf Au auf über 50 % geschätzt. Die Bedeckungsdichte der 20 nm PS-Partikel auf Au ist etwas schlechter und wird auf etwa 40 % geschätzt.

Betrachtet man die vorliegenden Ergebnisse, so zeigt sich, dass in Gegenwart von NaCl nur die 100 nm SiO₂-Partikel auf Si, die 20 nm PS-Partikel auf Si, sowie die 100 nm PS-Partikel auf Au in etwa bis zur erwarteten Maximalbedeckung einer statistisch dicht gepackten Partikelmonolage adsorbieren. Die 50 nm SiO₂-Partikel adsorbieren auf beiden Substraten deutlich weniger dicht, die 20 nm PS- sowie die 100 nm SiO₂-Partikel bilden auf Au keine optimal gepackten Monolagen aus und die 100 nm PS-Partikel lassen sich auf Si gar nicht adsorbieren. Eine theoretische Erklärung der Resultate sollen die nachfolgenden Berechnungen der Wechselwirkungspotentiale zwischen 2 Partikeln bzw. einem Partikel und einer Oberfläche liefern.

Berechnung der Wechselwirkungsenergie zwischen 2 Partikeln bzw. zwischen Partikel und Oberfläche

Die einfachste Berechnung der dispersiven Kräfte zwischen zwei Partikeln bzw. einem Partikel und einer Oberfläche basiert auf dem Lennard-Jones-Potential Ψ_{LJ} zwischen 2 Dipolen (Gl. 5.1). Der attraktive Term, die van-der-Waals-Wechselwirkung, ist reziprok proportional zur 6. Potenz des Abstandes zwischen den beiden Dipolen. Nähert man die beiden Dipole einander an, so sinkt das Potential zunächst auf ein Minimum ab, um ab einem bestimmten Minimalabstand σ steil anzusteigen, d. h. dann überwiegen repulsive Kräfte, die im Falle von Atomen und Molekülen auf die Pauli-Abstoßung zurück zu füh-

ren sind (Elektronen mit gleichem Spin stoßen sich ab, wenn die Orbitale überlappen). Häufig wird der abstoßende Term reziprok proportional zur 12. Potenz des Dipolabstands beschrieben, dieser Wert ist allerdings empirisch.

$$\Psi_{LJ} = 4 \cdot \chi \cdot \left\{ \left(\frac{\sigma}{d} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{d} \right)^6 \right\} = \frac{C_B}{d^{12}} - \frac{C_{vdW}}{d^6} \quad (5.1)$$

$$\text{mit } C_B = 4 \cdot \chi \cdot \sigma^{12} \quad \text{und} \quad C_{vdW} = 4 \cdot \chi \cdot \sigma^6$$

- χ : Tiefe der Potentialmulde
- d : Abstand der beiden Dipole
- σ : Abstand, bei dem das Potential eine Nullstelle aufweist
- C_B : Born-Konstante
- C_{vdW} : van-der-Waals-Konstante

Um die van-der-Waals-Kräfte zwischen ausgedehnten Körpern zu berechnen, hatte Hamaker die Idee, die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen paarweise zu summieren und über alle Dipolpaare in den beiden Körpern zu integrieren [154]. Feke et al. ergänzten diese Näherung später noch um den repulsiven Term, der Born-Repulsion zwischen 2 Partikeln [155]. Zur Berechnung der Born-Repulsion zwischen Partikel und Oberfläche wurde in der vorliegenden Arbeit ausgehend vom Pauli-Term des Lennard-Jones-Potentials der gleiche Ansatz gewählt wie von Hamaker zur Berechnung der van-der-Waals-Attraktion (die Herleitung mit den wichtigsten Näherungen findet sich im Anhang). Im Folgenden sind nur die Endergebnisse der Rechnungen zusammengefasst.

Van-der-Waals-Potential

Wechselwirkung zwischen 2 Partikeln

$$\Psi_{\text{vdW}}(\bar{D}) = -\frac{1}{6} \cdot A_{\log}(D) \cdot \left(\frac{2}{\bar{D}^2 - 4R^2} + \frac{2}{\bar{D}^2} + \ln \frac{\bar{D}^2 - 4}{\bar{D}^2} \right) \quad (5.2a)$$

Wechselwirkung zwischen Partikel und Oberfläche

$$\Psi_{\text{vdW}}(D) = -\frac{A_{\log}(D) \cdot R}{6 \cdot D} \quad \text{für } D \ll R \quad (5.2b)$$

- A: Hamaker-Konstante [J]
 R: Partikelradius [nm]
 D: Abstand der Partikeloberflächen (D = 0 bis R)
 \bar{D} : Abstand der Partikelmittelpunkte, normiert auf R ($\bar{D} = \frac{D+2R}{R}$)

mit der effektiven Hamaker-Konstante

$$A_{\log}(D) = -\frac{A}{\log 100} \cdot \log \frac{D}{\text{nm}} + A$$

Born-Repulsion

Wechselwirkung zwischen 2 Partikeln

$$\Psi_{\text{BR}}(\bar{D}) = 2.65 \cdot 10^{-5} \cdot \left(\frac{\sigma}{R}\right)^6 \cdot \frac{A}{\bar{D}} \cdot \left[\frac{\bar{D}^2 - 14\bar{D} + 54}{(\bar{D}-2)^7} + \frac{60 - 2\bar{D}^2}{\bar{D}^7} + \frac{\bar{D}^2 + 14\bar{D} + 54}{(\bar{D}+2)^7} \right] \quad (5.3a)$$

Wechselwirkung zwischen Partikel und Oberfläche

$$\Psi_{\text{BR}}(D) = \frac{A \cdot \sigma^6 \cdot R}{1260 \cdot D^7} \quad \text{für } D \ll R \quad (5.3b)$$

Die Hamaker-Konstante A ist eine materialspezifische Proportionalitätskonstante, die entweder (bei bekannten optischen Eigenschaften des betreffenden Materials) berechnet oder

aber auch z. B. aus Kraft-Abstands-Messungen mittels AFM experimentell bestimmt werden kann [156, 157]. Im Wesentlichen ist sie ein Maß dafür, wie stark die attraktive Kraft ist, die von einem Material ausgeht und beinhaltet die van-der-Waals-Konstante C_{vdW} (Gl. 5.1) sowie die Moleküldichte des entsprechenden Materials. Die Hamaker-Konstante für die Wechselwirkung zwischen zwei oder mehreren verschiedenen Materialien berechnet sich aus der Quadratwurzel des Produktes der individuellen Hamaker-Konstanten:

$$A_{12} \approx \sqrt{A_1 \cdot A_2}$$

Alle hier benötigten Werte für A sind der Literatur zu entnehmen [28, 158]. Die effektive Hamaker-Konstante $A_{log}(D)$ berücksichtigt die Abschirmung der van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen 2 Dipolen, sofern sich diese nicht im Vakuum, sondern in einem Medium, wie z. B. Wasser, befinden. Dieser sogenannte Retardationseffekt ist darauf zurückzuführen, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit der elektromagnetischen Wellen, die die wechselwirkenden Dipole aussenden, mitunter gegen die Zeit einer Molekülschwingung nicht vernachlässigbar klein ist. Ändert sich nun der Molekülschwingungszustand während der Zeit, die die elektromagnetische Welle auf dem Weg zwischen 2 Molekülen zurücklegt, so stehen Welle und induzierter Dipol nicht mehr unbedingt parallel zueinander und die Wechselwirkungsenergie ist kleiner. Der Parameter σ wurde vergleichend mit Literaturdaten für die Lennard-Jones-Konstanten verschiedener Materialien zu $\sigma = 0.5$ nm angenommen [159, 160].

Tab. 5.1.: Hamaker-Konstanten für die verwendeten Materialkombinationen.

Materialien	$A \cdot 10^{-20}$ [J]
Au-H ₂ O-PS	7.5
Au-H ₂ O-SiO ₂	4.5
SiO ₂ -H ₂ O-PS	0.8
PS-H ₂ O-PS	1.4
SiO ₂ -H ₂ O-SiO ₂	0.5

Elektrisches Potential

Zwischen geladenen Teilchen herrschen nicht nur dispersive Kräfte, es müssen auch elektrische Kräfte berücksichtigt werden. Nanopartikel sind in Suspension ladungsstabilisiert und weisen üblicherweise ein negatives Oberflächenpotential auf. Auch die meisten Substratoberflächen, wie z. B. Metalle oder oxidische Materialien, sind negativ geladen. Sowohl zwischen den Partikeln untereinander als auch zwischen den Partikeln und der Substratoberfläche herrscht daher ein repulsives elektrisches Potential. Befindet sich ein elektrisch geladener Körper in einer Elektrolytlösung, so lagern sich die Ionen des Elektrolyten um diesen Körper in einer Doppelschicht an (vgl. Abschnitt 3.6.1). Zur Berechnung der Wechselwirkungsenergie der elektrischen Doppelschichten zweier Partikel bzw. eines Partikels und einer Oberfläche berechnet man den osmotischen Druck, der zwischen den beiden Körpern herrscht. In diese Berechnung geht die Debye-Hückel-Näherung ein, die die Ionenverteilung um geladene Körper in einer Elektrolytlösung beschreibt [28]. Das Endergebnis ist:

Wechselwirkung zwischen 2 Partikeln

$$\Psi_{el}(D) = 2\pi\epsilon\epsilon_0 \cdot R \cdot \Psi_\zeta^2 \cdot \ln(1 + e^{-\kappa D}) \quad (5.4a)$$

Wechselwirkung zwischen Partikel und Oberfläche

$$\Psi_{el}(D) = 4\pi\epsilon\epsilon_0 \cdot R \cdot \Psi_\zeta^2 \cdot \ln(1 + e^{-\kappa D}) \quad (5.4b)$$

- ϵ_0 : Dielektrizitätskonstante im Vakuum ($\epsilon_0 = 8.85 \cdot 10^{-21} \frac{C}{V \cdot m}$)
- ϵ : relative Dielektrizitätskonstante von Wasser ($\epsilon = 78.5$ bei $T = 298$ K)
- Ψ_ζ : ζ -Potential [V]
- κ : inverse Debyesche Abschirmlänge $\left(\kappa = \sqrt{\frac{e^2 N_A \sum_i n_i z_i^2}{\epsilon_0 \epsilon k_B T}} \right)$
- e : Elementarladung ($e = 1.6 \cdot 10^{-19}$ C)
- n_i : Ionenkonzentration $[\frac{mol}{l}]$
- z_i : Ionenladungszahl
- k_B : Boltzmannkonstante ($k_B = 1.39 \cdot 10^{-23} \frac{J}{K}$)
- N_A : Avogadro-Konstante ($N_A = 6.022 \cdot 10^{23} \frac{1}{mol}$)
- T : Temperatur

Die ζ -Potentiale der verwendeten Substratoberflächen wurden der Literatur entnommen,

die ζ -Potentiale der verwendeten Nanopartikel wurden mit Hilfe der ELS experimentell bestimmt (Tab. 5.2). Zur Berechnung von Ψ_{el} zwischen einem Partikel und einer Oberfläche (Gl. 5.4b) wurden in den quadratischen Term Ψ_{ζ} die individuellen ζ -Potentiale der beiden Materialien eingesetzt. Zur Adsorption der Partikel wurde ausschließlich NaCl verwendet. Die Ionenlandungszahl z ist daher ± 1 .

Tab. 5.2.: ζ -Potentiale der verwendeten Materialien.

Material	ζ -Potential
Au	- 61 mV
Si	- 25 mV [161]
20 nm PS	- 45 mV*
100 nm PS	- 45 mV
50 nm SiO ₂	- 36 mV
100 nm SiO ₂	- 47 mV

Es wurde nun die gesamte Wechselwirkungsenergie, d. h. die Summe aus van-der-Waals-Attraktion, Born-Repulsion und elektrischer Repulsion, zwischen 2 Partikeln bzw. einem Partikel und der Substratoberfläche in Anwesenheit von Kochsalz im Konzentrationsbereich von 0.001 – 2.0 M berechnet. Dabei wurde angenommen, dass die attraktive Wechselwirkung überwiegt, sobald das Potential unter den Wert der mittleren thermischen Energie $3/2 k_B T$ ($\approx 6.21 \cdot 10^{-21}$ J bei $T = 298$ K) fällt. Ab der entsprechenden Salzkonzentration ist also entweder Aggregation zwischen den Partikeln oder Adsorption auf die Oberfläche zu erwarten. Ferner wurden im Falle von Si als Substrat alle Rechnungen unter der Annahme ausgeführt, dass die Oberfläche mit einer natürlichen Oxidschicht terminiert ist. Die Abbildungen 5.6 und 5.7 zeigen das Ergebnis der Rechnungen für die verwendeten Nanopartikel, die Tabelle 5.3 stellt die theoretisch berechneten Werte für die NaCl-Konzentrationen, die zur Aggregation der Partikel sowie zu deren Adsorption auf Si bzw. Au benötigt werden, den jeweils experimentell ermittelten Werten gegenüber.

Vergleicht man die Abbildungen 5.6 a) und d) bzw. 5.7 a) und d) miteinander, so fällt auf, dass zwischen den kleineren Partikeln des jeweils gleichen Materials erst bei deutlich

*Das gemessene ζ -Potential liegt bei - 25 mV. Das den Partikeln zugesetzte SDS (s. o) schirmt die tatsächliche Oberflächenladung der Partikel ab, so dass das ζ -Potential anhand von Vergleichsmessungen an PS-Partikeln verschiedener Größe auf - 45 mV abgeschätzt wurde.

Tab. 5.3.: Vergleich zwischen theoretisch und experimentell ermittelten NaCl-Konzentrationen zur Koagulation von Nanopartikeln sowie deren Adsorption auf Si bzw. Au bei maximaler Oberflächenbedeckung.

Partikel		50 nm SiO ₂	100 nm SiO ₂	20 nm PS	100 nm PS
Koagulationspunkt	theor.	1.0 – 2.0 M	0.5 – 1.5 M	> 1.0 M	0.15 – 0.5 M
	exp.	0.6 ± 0.1 M	0.8 ± 0.1 M	> 2.0 M	0.18 ± 0.02 M
Adsorption auf Si	theor.	0.5 – 1.0 M	0.15 – 0.5 M	0.5 – 1.0 M	0.10 – 0.25 M
	exp.	0.32 ± 0.02 M	0.35 ± 0.02 M	1.4 ± 0.2 M	–
	Bed.	43 ± 5 %	53 ± 2 %	> 50 %	–
Adsorption auf Au	theor.	0.05 – 0.10 M	0.01 – 0.10 M	> 0.05 M	0.01 – 0.10 M
	exp.	0.20 ± 0.02 M	0.24 ± 0.02 M	> 0.6 M	0.15 ± 0.02 M
	Bed.	43 ± 5 %	46 ± 5 %	≈ 40 %	> 50 %

Abkürzungen: theor. - theoretisch, exp. - experimentell, Bed. - Bedeckung.

höheren NaCl-Konzentrationen attraktive Kräfte vorherrschen als zwischen den größeren Partikeln. Dies lässt sich einfach damit erklären, dass bei kleiner werdendem Radius einer Kugel die Oberflächeneigenschaften gegenüber den Volumeneigenschaften mehr und mehr dominieren. Da das attraktive Potential zwischen zwei Partikeln aus dem Volumenintegral über alle Dipol-Dipol-Wechselwirkungen berechnet wird, muss es bei gleichem Abstand für größere Kugeln stärker anziehend sein, als für kleinere Kugeln. Demnach wird für die kleineren Partikel mehr Elektrolyt zur Abschirmung der repulsiven Oberflächenladung benötigt. Diesbezüglich stimmen Theorie und Experiment für die 100 nm SiO₂-Partikel, sowie die 20 nm und 100 nm PS-Partikel recht gut überein.

Es fällt jedoch auf, dass die 50 nm SiO₂-Partikel im Experiment schon bei deutlich geringeren NaCl-Konzentrationen koagulieren als theoretisch berechnet wurde. Diese Diskrepanz könnte darin begründet liegen, dass die chemische Zusammensetzung der verwendeten Nanopartikel nicht exakt bekannt ist und die in der Literatur angegebenen Hamaker-Konstanten für verschiedene Silicatmaterialien zwischen $0.46 - 0.86 \cdot 10^{-20}$ J für Silica, $1.02 - 1.51 \cdot 10^{-20}$ J für Quartz und $1.34 - 1.93 \cdot 10^{-20}$ für Glimmer variieren [158]. Die auffällig unterschiedlichen ζ -Potentiale der 50 bzw. 100 nm SiO₂-Partikel (vgl. Tab. 5.2) lassen vermuten, dass die chemische Beschaffenheit der Partikel verschieden ist und

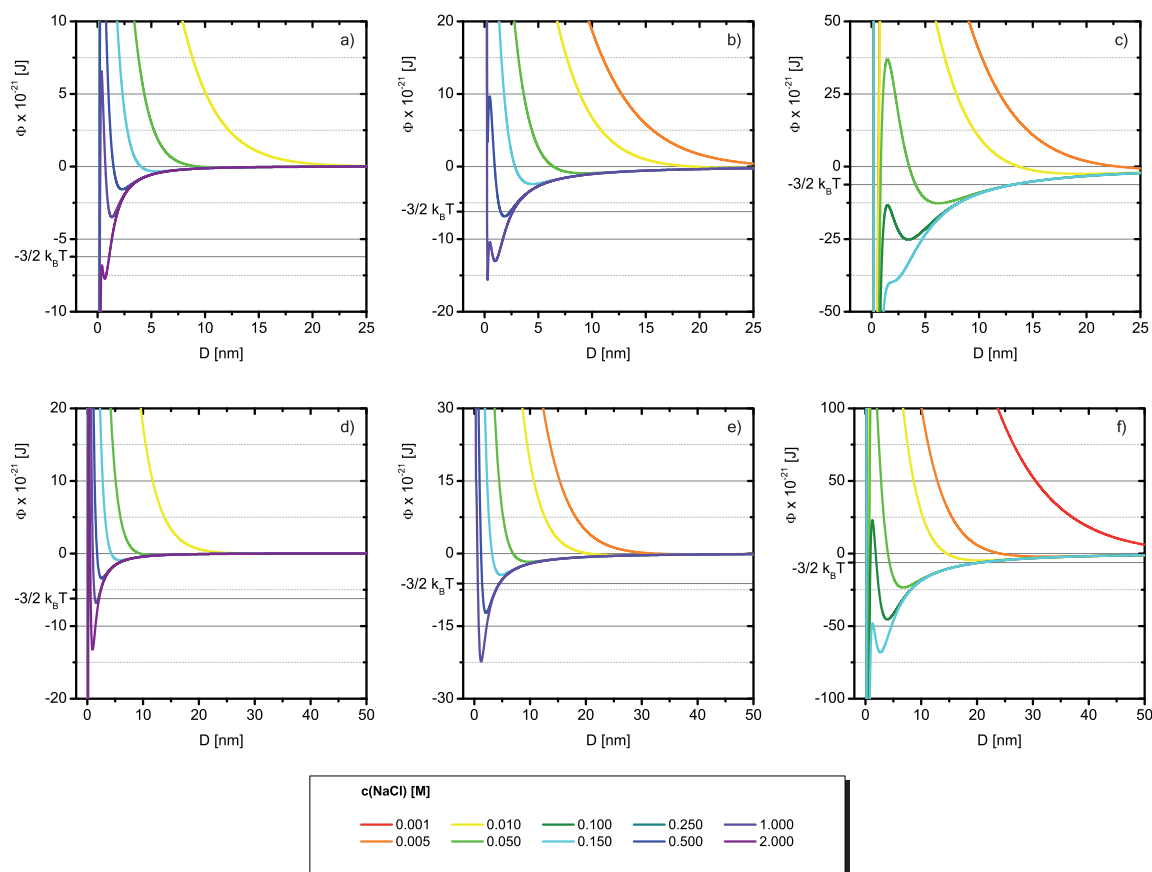


Abb. 5.6.: Summe des attraktiven und repulsiven Potentials der Partikel-Partikel- bzw. Partikel-Oberflächen-Wechselwirkung für die verwendeten SiO₂-Nanopartikel. Oben: 50 nm a) Partikel-Partikel, b) Partikel-Si, c) Partikel-Au. Unten: 100 nm a) Partikel-Partikel, b) Partikel-Si, c) Partikel-Au.

somit sind auch die Hamaker-Konstanten nicht identisch. Eine weitere Fehlerquelle ist die schlechte Größenverteilung der kleineren SiO₂-Partikel. Während der Hersteller diesbezüglich 50 ± 10 nm angibt, wurden mittels DLS 75 ± 20 nm bestimmt und auf den REM-Bildern finden sich Partikel mit etwa 20 – 80 nm Durchmesser. Ein höherer Wert der Hamaker-Konstante, sowie ein größerer Partikelradius bedeuten stärkere attraktive Wechselwirkung und führen letztendlich dazu, dass der Koagulationspunkt sich zu einer kleineren NaCl-Konzentration verschiebt. Die Auswirkungen einer Veränderung der Hamaker-Konstante auf den jeweiligen Potentialverlauf sind der Abbildung 5.8 zu entnehmen. Erhöht man schrittweise die Hamaker-Konstante der Partikel von $0.5 \cdot 10^{-20}$ J auf $1.5 \cdot 10^{-20}$ J, so verschiebt sich der Koagulationsbereich der 50 nm SiO₂-Partikel von 1.0 – 2.0 M NaCl zu 0.5 – 1.0 M NaCl. Ebenso verhält es sich hinsichtlich der Adsorption der Partikel auf eine Si-Oberfläche, hier verschiebt sich der Bereich, ab dem Adsorption zu

erwarten ist, von 0.5 – 1.0 M NaCl zu 0.25 – 0.5 M NaCl. Für die Potentialberechnungen werden die gemischten Hamaker-Konstanten verwendet, die aus der Quadratwurzel des Produkts der Hamaker-Konstanten beider beteiligter Materialien berechnet werden. Da die Hamaker-Konstante von Au in jedem Fall um ein Vielfaches größer ist, als die der SiO₂-Partikel, bleibt der Bereich der Menge an NaCl, die zur Adsorption der Partikel auf Au benötigt wird, bei den betrachteten Variationen der Hamaker-Konstante der Partikel, annähernd gleich bei 0.05 – 0.1 M. Zusammenfassend bleibt diesbezüglich festzuhalten, dass mit einer Erhöhung der Hamaker-Konstante der Partikel von $0.5 \cdot 10^{-20}$ J auf etwa $1.0 \cdot 10^{-20}$ J die Übereinstimmung zwischen Theorie und Experiment erheblich besser wird.

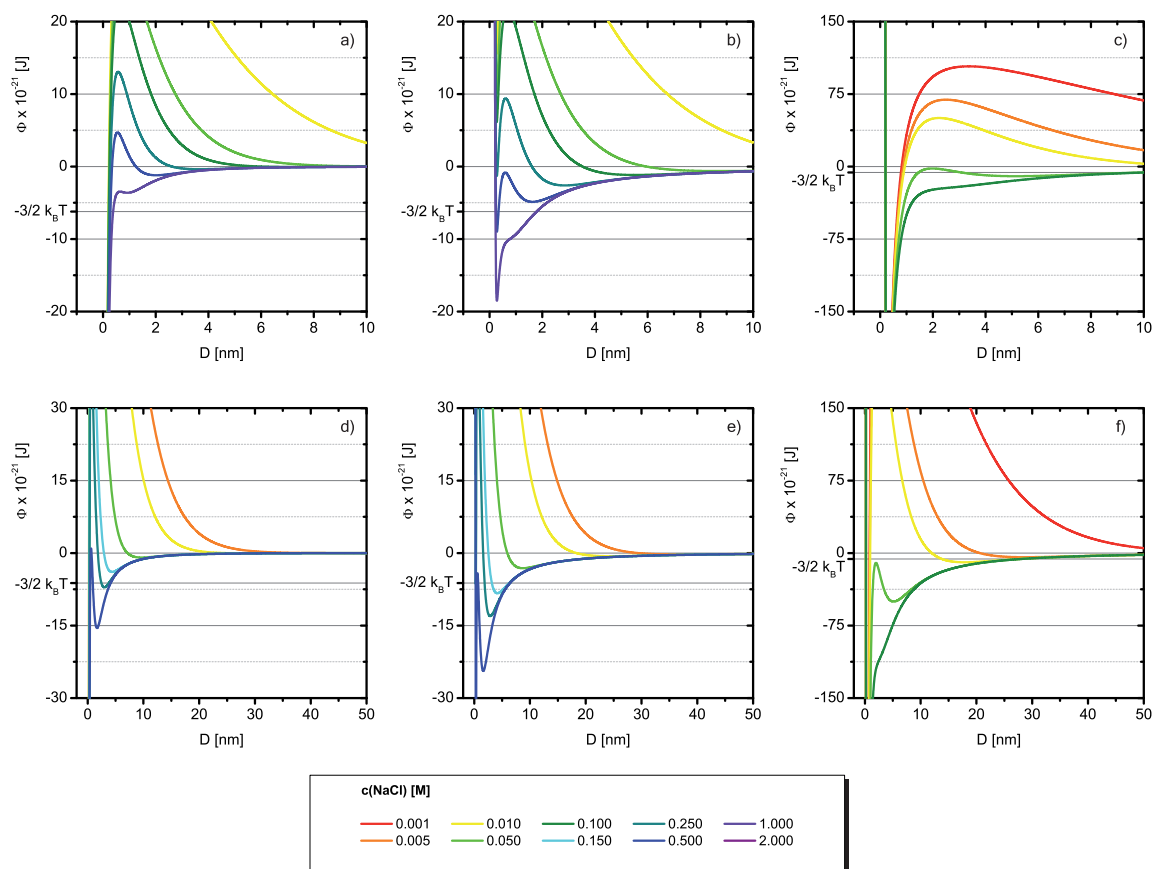


Abb. 5.7.: Summe des attraktiven und repulsiven Potentials der Partikel-Partikel- bzw. Partikel-Oberflächen-Wechselwirkung für die verwendeten PS-Nanopartikel. Oben: 20 nm a) Partikel-Partikel, b) Partikel-Si, c) Partikel-Au. Unten: 100 nm d) Partikel-Partikel, e) Partikel-Si, f) Partikel-Au.

Ein Vergleich der Abbildungen 5.6 b) und c) bzw. e) und f), sowie der Abbildungen 5.7 b) und c) bzw. e) und f) illustriert, dass das Potential zwischen den Partikeln und Au jeweils

erheblich stärker attraktiv ist als zwischen den Partikeln und einer Si-Oberfläche. Es ist allerdings zu beachten, dass zwischen den Partikeln und einer Au-Oberfläche nicht nur stärker anziehende Wechselwirkungen herrschen, sondern dass auch die Born-Repulsion stärker wird, da die Hamaker-Konstante sowohl in die Berechnung des attraktiven van-der-Waals-Potentials als auch in die Berechnung des repulsiven Born-Potentials eingeht (vgl. Gl. 5.2b und 5.3b). Dies hat zur Folge, dass der Gleichgewichtsabstand zwischen Partikel und Au-Oberfläche bei vergleichbaren Werten für das Potential größer ist, als zwischen Partikel und Si-Oberfläche. Für das Experiment bedeutet dies letztendlich, dass man davon ausgehen kann, dass einmal adsorbierte Partikel auf einer Au-Oberfläche leichter wieder abzuspülen sind als adsorbierte Partikel auf einer Si-Oberfläche, was tatsächlich auch so vorgefunden wurde.

Die Abbildungen 5.6 f) und 5.7 f) zeigen ferner, dass bei gleicher Partikelgröße und ähnlicher Potentialtiefe der Gleichgewichtsabstand zwischen den SiO_2 -Partikeln und Au kleiner ist, als zwischen den PS-Partikeln und Au, was wiederum anhand der größeren Hamaker-Konstante von PS gegenüber SiO_2 zu erklären ist. Demnach sollten PS-Partikel gegenüber Spülen generell empfindlicher sein als SiO_2 -Partikel. Auch dies lässt sich experimentell bestätigen.

Schließlich liefern die theoretischen Berechnungen auch eine mögliche Erklärung dafür, warum es experimentell nicht gelungen ist, die 100 nm PS-Partikel in Gegenwart von NaCl auf Si zu adsorbieren. Aus den Abbildungen 5.7 d) und e) geht hervor, dass die NaCl-Konzentrationsbereiche, bei denen entweder Koagulation oder Adsorption auf Si zu erwarten ist, sehr eng beieinander liegen. So würde man zwar ab etwa 0.15 M NaCl Adsorption auf Si erwarten, jedoch liegt der Gleichgewichtsabstand der entsprechenden Potentialkurve mit etwa 4 nm noch recht hoch, so dass man von einer leichten Abspülbarkeit der Partikel ausgehen muss. Wählt man die NaCl-Konzentration aber mit 0.25 M nur etwas höher, so fällt auch das Potential für die Koagulation der Partikel schon unter den Wert der mittleren thermischen Energie. Auf dem REM-Bild in Abbildung 5.5 g) ist genau dies zu erkennen: bei einer NaCl-Konzentration von 0.15 M, die noch knapp über der kritischen Koagulationskonzentration liegt, scheinen zwar einige Partikel zu adsorbieren, jedoch werden diese beim Spülen der Probe weitestgehend wieder abgelöst.

Insgesamt stimmen die theoretischen Berechnungen mit den experimentellen Beobachtungen recht gut überein. Abweichungen ergeben sich zum einen aus den oben schon genannten Unsicherheiten bzgl. der Größe der Partikel sowie deren chemischer Beschaffenheit, die einen deutlichen Einfluß auf die entsprechende Hamaker-Konstante hat. Wei-

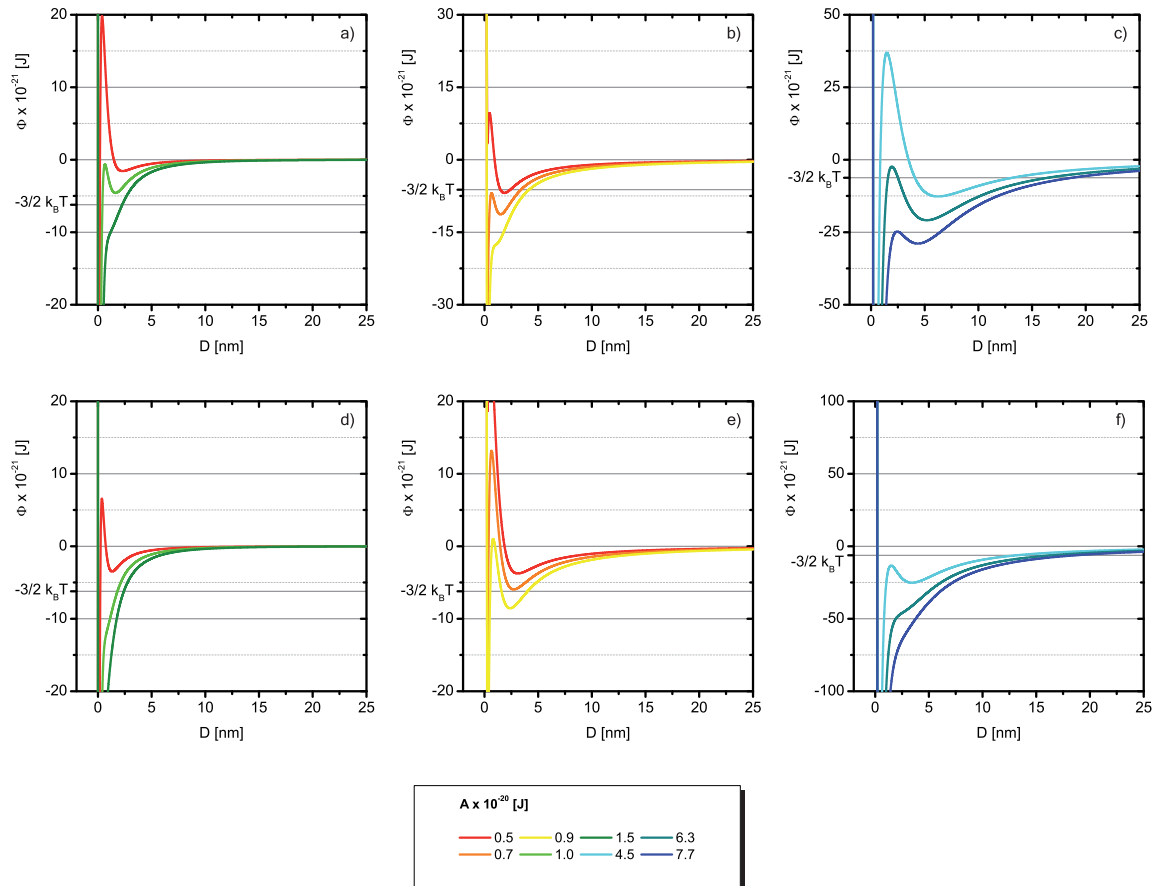


Abb. 5.8.: Auswirkung der Hamaker-Konstante auf den Potentialverlauf am Beispiel der Partikel-Partikel- bzw. Partikel-Oberflächen-Wechselwirkung von 50 nm SiO_2 -Partikeln mit den Substraten Si und Au. Oben: a) Partikel-Partikel bei 0.5 M NaCl, b) Partikel-Si bei 0.25 M NaCl, c) Partikel-Au bei 0.05 M NaCl. Unten: d) Partikel-Partikel bei 1.0 M NaCl, e) Partikel-Si bei 0.5 M NaCl, f) Partikel-Au bei 0.1 M NaCl.

terhin sind die ζ -Potentiale für die Substrate ausschließlich der Literatur entnommen, da sie nicht selbst gemessen werden konnten. Größere Schwankungen sind hier insbesondere im Falle der verwendeten Silicium-Wafer zu erwarten, da deren Dotierung einer gewissen Varianz unterliegt, was wiederum Auswirkungen auf die Oberflächenladung und damit das ζ -Potential hat. Der Fehler wird auf etwa ± 5 mV geschätzt. Temperaturschwankungen während der Experimente zur Koagulation bzw. Adsorption der Partikel sind als eine eher geringe Fehlerquelle zu betrachten. Eine Temperaturerhöhung oder -erniedrigung von 5 K verändert den Wert der thermischen Energie lediglich um $\pm 0.1 \cdot 10^{-21}$ J. Die Temperaturabhängigkeit der Hamaker-Konstante wird erst in der Nähe eines Phasenübergangs des betreffenden Materials signifikant und kann daher gänzlich vernachlässigt werden [156].

Die grösste Näherung, die in die theoretische Berechnung der Potentiale eingeht, ist aber sicherlich die Berechnung der Pauli-Abstoßung als Volumenintegral über alle im Festkörper enthaltenen Moleküle (Gl. 5.3a und 5.3b). Während es sich beim van-der-Waals-Potential um eine elektrostatische Dipol-Dipol-Wechselwirkung handelt, ist die Ursache der Pauli-Abstoßung rein quantenmechanischer Natur (s. o.). Die Born-Repulsion wirkt deshalb streng genommen immer nur zwischen 2 direkt benachbarten Molekülen und es können z. B. nicht 2 Moleküle im Zentrum zweier unterschiedlicher Festkörper über diese Kraft miteinander wechselwirken. Eine detaillierte Auseinandersetzung mit dieser Näherung findet sich jedoch in der Literatur z. B. bei Feke et al. und soll deshalb hier nicht weiter diskutiert werden [155].

5.1.2. Präparation von hdp-Nanopartikelmonolagen

Die Präparation hexagonal dichtest gepackter Nanopartikelmonolagen erfordert während des Adsorptionsprozesses eine größt mögliche Beweglichkeit der Partikel entlang der Oberfläche. Die Kraft, die bewirkt, dass die Partikel so dicht packen, dass sie sich gegenseitig berühren, muss außerdem größer sein als die elektrostatische Repulsion der Partikel untereinander. Hier kann man sich z. B. die Kapillarkraft von verdampfendem Lösungsmittel zu Nutze machen, indem man entweder das Substrat mit der Partikelsuspension während des Trocknungsvorgangs schräg stellt, so dass sich ein zurückziehender Flüssigkeitsmeniskus bildet, oder die Partikelsuspension mit Hilfe eines Spin Coaters aufbringt und die Probe so lange rotieren läßt, bis das Lösungsmittel vollständig abgetrocknet ist. Die erst genannte Methode wird in der Literatur z. B. bei Micheletto et al. beschrieben [8]. Wie in der Abbildung 5.9 zu sehen ist, konnten nach diesem Verfahren auf kleinen Bereichen des Substrats sehr dicht gepackte Partikelmonolagen mit einem Bedeckungsgrad von etwa 90 % präpariert werden, jedoch sind die größten, vollständig bedeckten Areale nur etwa $10 \times 10 \mu\text{m}$ groß. Dazwischen sind immer wieder auf großflächigen Bereichen gar keine Partikel adsorbiert.

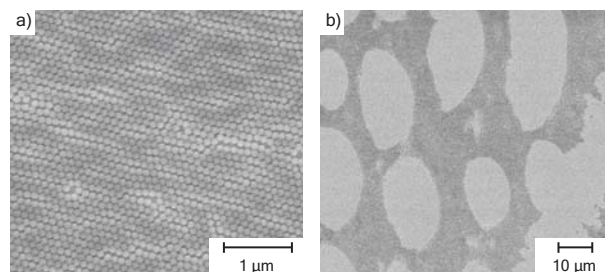


Abb. 5.9.: 100 nm PS hdp-Nanopartikelmonolagen präpariert nach der Methode von Micheletto et al. [8]. Auf das Substrat wurde ein kleiner Tropfen einer verdünnten Nanopartikelsuspension gegeben und unter einem Winkel von 9° bei konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit über ca. 2 Tage lang getrocknet. a) Es entstehen Domänen von max. $10 \times 10 \mu\text{m}$ hexagonal dichtest gepackter Partikelmonolagen. b) Die helleren Bereiche zeigen unbedeckte Substratfläche.

Weitaus bessere Resultate konnten mit Spin Coating erzielt werden. Hierbei muss zunächst die Geschwindigkeit, mit der die Proben rotiert werden, an die jeweilige Partikelgröße angepasst werden. Die Abbildung 5.10 verdeutlicht am Beispiel von 200 nm PS-Partikeln den Einfluß der Rotationsgeschwindigkeit auf die Bedeckungsdichte. Bei 1200 rpm werden noch viele Partikel mit abgeschleudert, die Bedeckung liegt nur bei etwa 30 %. Verringert man die Umdrehungszahl auf 1000 rpm, steigt die Bedeckungsdichte auf etwa 50 % und erreicht bei 800 rpm ein Maximum von etwa 70 % bevor sich schließlich Multilagen bilden.

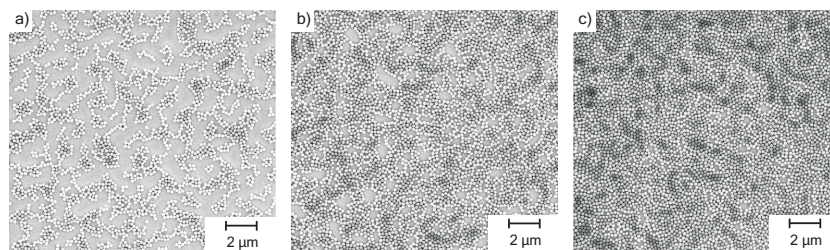


Abb. 5.10.: 200 nm PS hdp-Nanopartikelmonolagen. Der Partikelsuspension wurden zur besseren Benetzbarkeit des Substrats 25 vol % Isopropanol zugesetzt und die Proben so lange rotiert bis das Lösungsmittelgemisch vollständig verdampft war. Die Proben wurden bei a) 1200 rpm, b) 1000 rpm und c) 800 rpm rotiert.

Die Methode kann im Prinzip auf beliebige Partikelgrößen angewandt werden, jedoch ist zu beachten, dass die Resultate mit kleiner werdendem Partikeldurchmesser immer schlechter werden. Wie auf den REM-Bildern in Abbildung 5.11 zu sehen ist, müssen die Proben bei kleiner werdendem Partikeldurchmesser schneller rotiert werden, um das Entstehen von Multilagen zu verhindern. Im Falle der 50 nm PS-Partikel konnten allerdings unter keinen der experimentell getesteten Bedingungen vollständig multilagenfreie

Nanopartikelschichten präpariert werden.

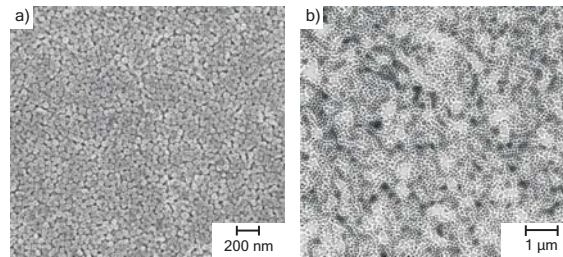


Abb. 5.11.: hdp-Monolagen von PS-Nanopartikeln mit verschiedenem Durchmesser. a) 50 nm bei 1200 rpm, b) 100 nm bei 1000 rpm aufgeschleudert.

5.1.3. Metallisierung

Die nach den obigen Schemata präparierten Nanopartikelmonolagen wurden im folgenden Schritt metallisiert, um so gemäß dem in Abbildung 5.1 illustriertem Prinzip nanoskalierte Adsorptionsplätze für Proteine herzustellen. Da ausgehend von rcp-Partikelmonolagen die oxidischen Bereiche des Substrats als Adsorptionsplätze ausgelegt werden und deren Größe somit unmittelbar durch den Partikeldurchmesser bestimmt wird, müssen die verwendeten Nanopartikel, wie oben bereits erwähnt, möglichst klein sein. Nachfolgende REM-Aufnahmen zeigen die Resultate der Metallisierung von 20 nm PS rcp-Monolagen mit unterschiedlichen Schichtdicken an Gold, nachdem versucht wurde, die Partikel mit Hilfe von Ultraschallbehandlung wieder abzulösen, um so Poren in der Goldschicht zu erzeugen (Abb. 5.12). Die Partikel lassen sich auch durch Ultraschallbehandlung in Lösungsmitteln wie Chloroform oder Ethylacetat, in denen Polystyrol gut löslich sein sollte, nicht wieder von der Oberfläche entfernen.

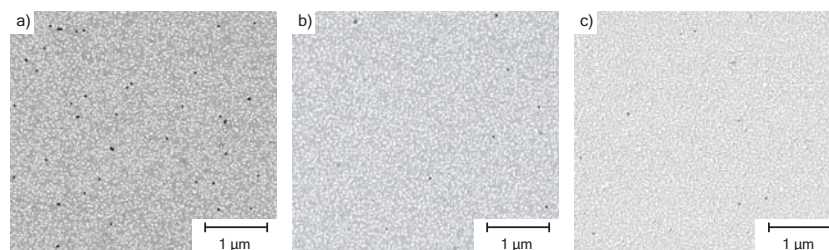


Abb. 5.12.: 20 nm PS rcp-Nanopartikelmonolagen nach der Metallisierung mit Au. Die Partikel wurden wie unter Abschnitt 5.1.1 beschrieben auf die Si-Substrate aufgebracht und anschließend mit je 1 nm Ti sowie a) 5 nm Au, b) 10 nm Au und c) 15 nm Au bedampft. Danach sollten die Partikel durch Ultraschallbehandlung wieder abgelöst werden.

Die dünnste Schichtdicke an Gold betrug 5 nm, da ein durch thermische Verdampfung aufgebracht Goldfilm etwa ab dieser Dicke vollständig geschlossen ist. Allerdings muss auf die Substrate zuerst immer Titan als Haftvermittler aufgebracht werden. Um die gesamte Metallschichtdicke so dünn wie möglich zu halten, wurde jeweils 1 nm Titan aufgedampft, so dass die geringste Gesamtschichtdicke etwa 6 nm Metall betrug. Da sowohl die Metallschichtdicke als auch der Partikeldurchmesser mit einem Fehler von etwa $\pm 25\%$ behaftet sind, kann man also davon ausgehen, dass selbst bei der kleinsten gewählten Goldschichtdicke die Partikel fast vollständig mit Metall umhüllt sind. Dies erklärt, warum weder die rein mechanische Behandlung mit Ultraschall in Wasser noch der Versuch, die Partikel chemisch zu lösen, zu einem positiven Ergebnis führten.

Größere Partikel sollten sich demnach besser wieder entfernen lassen, jedoch müssen dann der Abbildung 5.1 b) zufolge hdp-Partikelmonolagen als Metallisierungsmasken benutzt werden, so dass die dreieckförmigen, metallbedeckten Zwischenräume zwischen den Partikeln als Adsorptionsplätze für Proteine fungieren können. Im Hinblick auf analytische Methoden wie z. B. die IR-Spektroskopie erfordert dieses Konzept allerdings über eine Probenfläche von etwa 1×1 cm (dies entspricht ungefähr der Größe des Messflecks) perfekt geordnete, hexagonal dichtest gepackte Partikelmonolagen. Wie man auf den REM-Aufnahmen in Abbildung 5.13 erkennen kann, ist dies experimentell nicht gelungen. Die Domänen, innerhalb derer die Partikel perfekt gepackt sind, sind bestenfalls ca. 1×1 μm groß. In diesen Bereichen sind nach der Metallisierung und dem Ablösen der Partikel auch sehr schön die dreiecksförmigen Metallstrukturen zu erkennen. An den Domänengrenzen sind die Abstände zwischen den Partikeln aber etwas größer, so dass die metallisierten Dreiecke hier nicht voneinander getrennt sind, sondern sich Linienstrukturen ausbilden. Auf solchen Substraten könnte man auf keinen Fall den Großteil der Proteine separat voneinander adsorbieren bzw. eine Entfaltung über einen bestimmten Adsorptionsplatz hinaus verhindern.

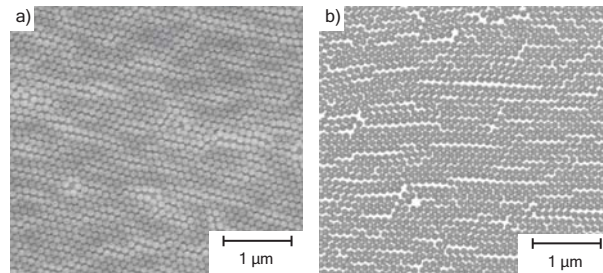


Abb. 5.13.: 100 nm PS hdp-Nanopartikelmonolagen auf Si a) vor und b) nach der Metallisierung mit Au. Die Partikel wurden nach der Methode von Micheletto et al. auf das Si-Substrat aufgebracht und anschließend mit 1 nm Ti sowie 10 nm Au bedampft [8]. Danach wurden die Partikel durch Ultraschallbehandlung wieder abgelöst.

5.1.4. Abscheidung von OEG-Silan aus der Gasphase und Proteinadsorption

Neben der Metallisierung durch Nanopartikelmasken ist die Gasphasenabscheidung von oberflächenreaktiven Molekülen eine weitere Möglichkeit, nanostrukturierte Substrate zur Proteinadsorption herzustellen. 2-[Methoxy(polyethylenoxy)propyl]trichlorosilan (OEG-Silan) ist z. B. so eine Substanz, die über die Trichlorosilangruppen an eine Si-Oberfläche angebunden werden kann und gleichzeitig eine kurze OEG-Endgruppe trägt, die die Umgebung der zu erzeugenden Adsorptionsplätze proteinresistent macht. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode gegenüber der Metallisierung ist, dass die OEG-Silanmoleküle aus der Gasphase praktisch aus allen 3 Raumrichtungen das Substrat erreichen können. Somit wird ein Schattenwurf der Partikel verhindert und es sollte tatsächlich nur die unmittelbare Kontaktstelle der Partikel mit der Oberfläche frei von Silan bleiben. Aus diesem Grund können sowohl rcp- als auch hdp-Partikelmonolagen als Masken Verwendung finden, die entstehenden Adsorptionsplätze sollten in jedem Fall gut voneinander separiert sein. Die Größe der Adsorptionsplätze in Abhängigkeit von der verwendeten Partikelgröße, kann anhand einfacher geometrischer Überlegungen berechnet werden und ergibt sich zu

$$2 \cdot x = 2 \cdot \sqrt{2rd - d^2} \quad (5.5)$$

- x: halber Durchmesser des Adsorptionsplatzes
- r: Partikelradius
- d: Schichtdicke des Silans

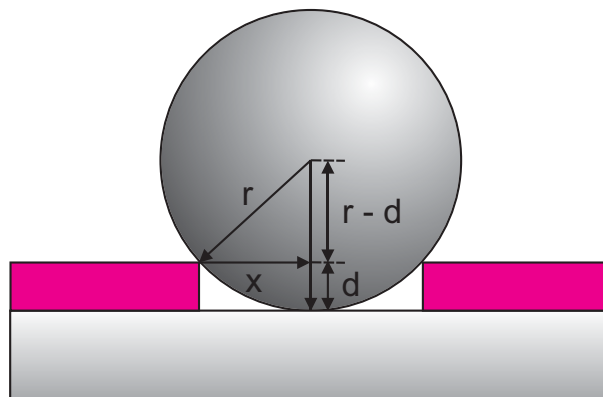


Abb. 5.14.: Berechnung der Größe eines Adsorptionsplatzes in Abhängigkeit von der Partikelgröße.

Die Schichtdicke des Silans wurde ellipsometrisch zu etwa 0.8 nm bestimmt. Demnach würde man bei einem Partikeldurchmesser von 50 nm einen Adsorptionsplatz mit einem Durchmesser von etwa 12.5 nm erwarten, bei einem Partikeldurchmesser von 100 nm beträgt der Durchmesser des Adsorptionsplatzes etwa 17.8 nm. Die Strukturen, die in den AFM-Aufnahmen der Abbildung 5.15 zu erkennen sind, wurden mit diesen beiden Partikelgrößen erzeugt. Da die Nanopartikel aus wässriger Suspension abgeschieden werden, kann man annehmen, dass auch nach dem Trocknen der Proben einige Wassermoleküle an der Oberfläche zurück bleiben, die sich aufgrund von Kapillarkräften besonders an den direkten Kontaktstellen zwischen den Partikeln und der Oberfläche sammeln. Diese Wassermoleküle verursachen eine Polykondensation der Silanmoleküle, worauf vermutlich die Ringstrukturen zurück zu führen sind. Wie dem Höhenprofil der AFM-Bilder in Abbildung 5.15 zu entnehmen ist, entsprechen die Durchmesser der Ringe, gemessen ab dem links- bzw. rechtsseitigem Mittelpunkt des Walls, in etwa den Durchmessern der verwendeten Nanopartikel, also ca. 50 bzw. 100 nm. Letztendlich ist die Größe eines Adsorptionsplatzes also deutlich größer als nach Gleichung 5.5 zu erwarten wäre.

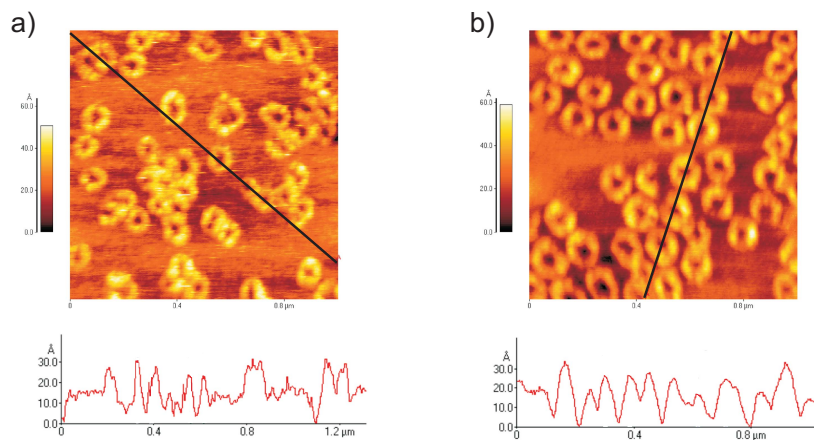


Abb. 5.15.: Gasphasenabscheidung von OEG-Silan durch kolloidalen Masken unter Verwendung einer a) 50 nm SiO₂ rcp-Nanopartikelmonolage b) 100 nm SiO₂ rcp-Nanopartikelmonolage.

Wie die Abbildung 5.16 zeigt, ist es tatsächlich gelungen, Proteine wie BSA (Abb. 5.16 a) und b)) oder Lysozym (Abb. 5.16 c) und d)) auf solchen Nanostrukturen selektiv abzulegen. Hierfür wurden die Proteine einerseits direkt auf die erzeugten Ringstrukturen adsorbiert (Abb. 5.16 a) und c)), zum anderen wurden die freien Silicium-Areale, die von den Ringstrukturen eingeschlossen werden, vor der Proteinadsorption mit PAH funktionalisiert (Abb. 5.16 b) und d)). Das AFM-Höhenprofil belegt, dass die Proteine zumindest innerhalb einer Fläche von etwa 1 x 1 μm nicht außerhalb der Ringstrukturen adsorbieren bzw. über diese hinaus entfalten. Lysozym ist ein globuläres Protein mit einem Durchmesser von etwa 5 nm und auch BSA ist mit einer Größe von etwa 4 x 10 x 14 nm noch deutlich kleiner als der Durchmesser der Adsorptionsplätze (50 bzw. 100 nm), so dass innerhalb der Ringstrukturen vermutlich mehrere Proteine als Aggregate adsorbiert sind.

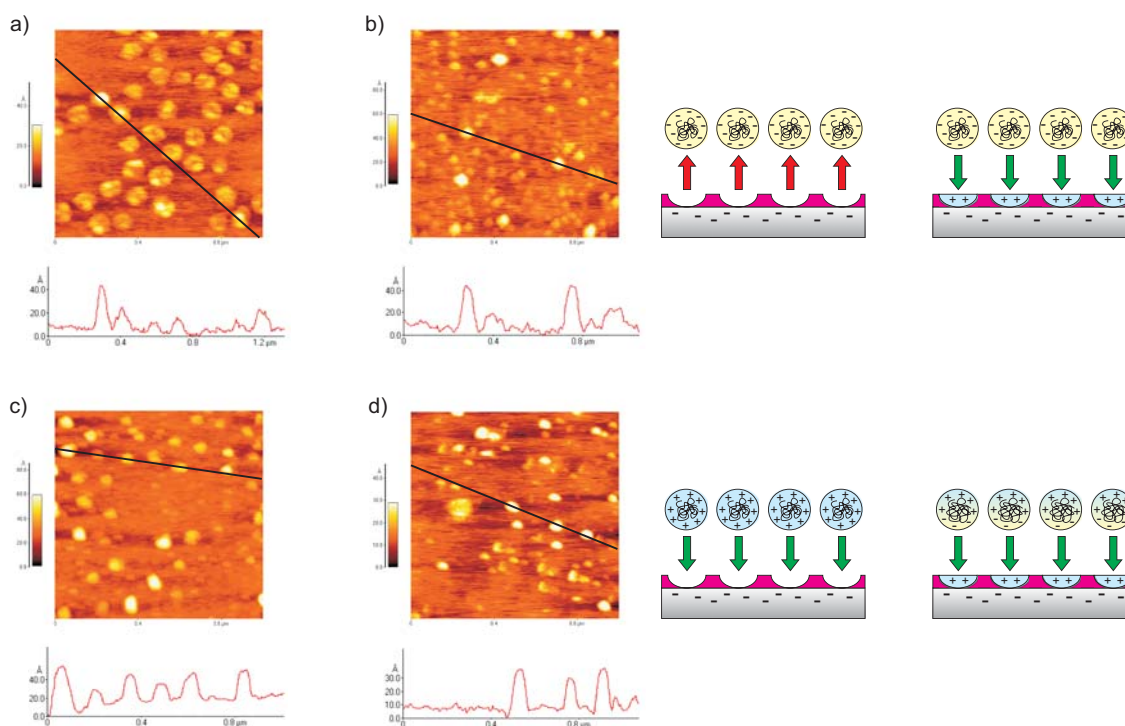


Abb. 5.16.: Adsorption von a) + b) BSA und c) + d) Lysozym auf nanostrukturierte Oberflächen. Die Strukturen wurden mittels Gasphasenabscheidung von OEG-Silan durch kolloidalen Masken unter Verwendung einer 100 nm SiO₂ rcp-Nanopartikelmonolage präpariert. Die Proteine wurden a) + c) entweder direkt auf die Ringstrukturen adsorbiert oder b) + d) die freien Si-Areale vor der Proteinadsorption mit PAH funktionalisiert.

Die Oberfläche, auf der die Proteine adsorbieren, ist einmal negativ geladen (Silicium) und einmal positiv geladen (PAH). Das Gleiche gilt für die beiden verwendeten Proteine: BSA ist bei pH 7 negativ geladen, Lysozym trägt bei pH 7 hingegen eine positive Nettoladung. Demzufolge herrschen zwischen der Si-Oberfläche und den BSA-Molekülen abstoßende Coulomb-Kräfte, was erklärt, dass in dieser Kombination nur wenige Proteinemoleküle auf der Oberfläche zu finden sind (Abb. 5.16 a)). Die PAH-funktionalisierten Adsorptionsplätze hingegen üben auf BSA eine attraktive Coulomb-Kraft aus, so dass die Proteine gut adsorbieren (Abb. 5.16 b)). Lysozym scheint hingegen eine höhere Flexibilität in seiner Struktur aufzuweisen, denn es adsorbiert sowohl auf die Si-Oberfläche, die ihm gegenüber elektrostatisch anziehend erscheint, als auch auf die elektrostatisch abstoßende PAH-Oberfläche. Im zweiten Fall muss sich das Protein strukturell so verändern, dass negativ geladene Aminosäurereste bzw. unpolare Seitenketten in Richtung der Oberfläche zeigen, so dass sich elektrostatisch und/oder dispersive, attraktive Wechselwirkungen ausbilden können.

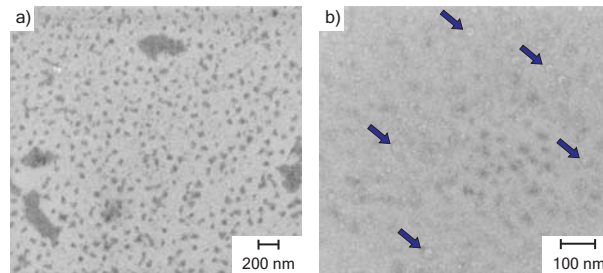


Abb. 5.17.: Grenzen der kolloidalen Lithographie mittels Gasphasenabscheidung von OEG-Silan. a) Die Strukturen wurden unter Verwendung einer Kolloidmaske von 100 nm SiO₂-Partikeln präpariert. Die dunklen Stellen zeigen adsorbiertes Protein, welches an einigen Stellen inselförmige Aggregate über mehrere Adsorptionsplätze bildet. b) Die blauen Pfeile markieren 20 nm PS-Partikel, die sich nach der Gasphasenabscheidung des Silans nicht mehr von der Oberfläche ablösen liessen.

Anhand der REM-Aufnahmen in Abbildung 5.17 werden 2 signifikante Schwächen der Methode deutlich. Zum einen findet man auf den Proben immer wieder Bereiche, auf denen größere Proteinaggregate über mehrere Adsorptionsplätze hinweg Inseln bilden (die Bereiche mit Proteinadsorbat erscheinen auf REM-Bildern dunkler gegenüber dem Hintergrund). Vermutlich passiert dies an Stellen, die im ersten Schritt der Oberflächenpräparation besonders dicht mit Nanopartikeln bedeckt waren und deshalb das OEG-Silan lediglich zwischen den Partikeln kondensiert ist und nicht mit der Si-Oberfläche reagiert hat. Solche unkontrolliert adsorbierten Proteinaggregate verfälschen später z. B. IR-spektroskopische Messungen zur Sekundärstrukturanalyse. Abgesehen davon ist die Methode praktisch auf nur 2 Partikelgrößen beschränkt, da mit einem Durchmesser von $d \leq 100$ nm und einer akzeptablen Größenverteilung lediglich 50 und 100 nm SiO₂-Nanopartikel käuflich erwerblich sind, wobei die Größenverteilung der 50 nm Partikel bereits grenzwertig ist. Der Durchmesser der Ringstrukturen liess sich aus o. g. Gründen nicht unter den Partikeldurchmesser verkleinern und ist damit etwa 3 – 6 mal so groß wie das Modellprotein Glucose Oxidase. PS-Partikel, die in einer Vielzahl an Größen und in guter Verteilung erhältlich sind, sind als kolloidale Masken nicht geeignet, da die Gasphasenabscheidung des OEG-Silans eine Temperatur von mind. 50 °C verlangt und PS bei dieser Temperatur bereits anfängt zu schmelzen. Infolgedessen lassen sich PS-Partikel nur schwer bzw. nicht rückstandslos wieder von der Oberfläche ablösen, wie in Abbildung 5.17 b) zu sehen ist.

5.2. Glucose Oxidase auf homogen beschichteten Oberflächen

5.2.1. Charakterisierung der Oberflächen

Zur Untersuchung der Aktivität von adsorbierter Glucose Oxidase auf homogen beschichteten Oberflächen wurden je 4 verschiedene Beschichtungen auf Polyelektrolyt- bzw. Thiolbasis verwendet. Die Ergebnisse der spektroskopischen Charakterisierung der Oberflächen sind den Tabellen 5.4 und 5.5 zu entnehmen.

Tab. 5.4.: Charakterisierung der verwendeten Oberflächenbeschichtungen - Thiolat-SAM.

Oberfläche	IR-Schwingungsbanden [cm^{-1}]	Schichtdicke [\AA]	Kontaktwinkel [$^{\circ}$]	ζ -Potential [mV]
DDT	1381, 1463 C-H (δ) 2851, 2878, 2921, 2964 C-H (ν)	16 ± 2	102 ± 1	0
PyUDT	1284 C-N _{al} (ν) 1453 C-H (δ) 1512, 1551, 1683 C-C _{ar} (ν) 1748 C-N _{ar} (ν) 2854, 2926 C-H _{al} (ν)	23 ± 2	84 ± 1	0
AUDT	1455 C-H (δ) 1512, 1551 N-H (δ) 2852, 2923 C-H (ν)	19 ± 1	53 ± 3	+
MDDS	1419 C-H (δ) 1512, 1551 O-H (δ) 1716 C=O (ν) 2851, 2920 C-H (ν)	17 ± 1	38 ± 2	-

Abkürzungen: δ Deformationsschwingung, ν Streckschwingung, al aliphatisch, ar aromatisch.

Da am Lehrstuhl keine Möglichkeit zur ζ -Potentialbestimmung an planaren Oberflächen gegeben ist, kann für die Oberflächenladung der Thiolbeschichtungen auf Gold nur eine qualitative Aussage getroffen werden. Der pK_B -Wert für primäre, aliphatische Amine liegt zwischen 3.3 und 3.5 [162], also kann man davon ausgehen, dass ein AUDT-SAM

in Acetat-Puffer bei pH 5.5 vollständig protoniert vorliegt und somit eine positive Oberflächenladung aufweist. Der pK_S -Wert für einfache, aliphatische Carbonsäuren liegt zwischen 4.7 und 4.9, so dass ein MDDS-SAM teilweise deprotoniert und damit negativ geladen sein sollte. Das freie Elektronenpaar am Stickstoff des Pyrrolrings ist Teil des aromatischen Systems, daher ist Pyrrol nur eine sehr schwache Base. Demnach soll ein PyUDT-SAM als elektrisch neutrale Oberfläche betrachtet werden, was auch im Einklang mit den hydrophoben Eigenschaften der Beschichtung steht. Die DDT-Beschichtung ist ebenfalls hydrophob und ungeladen.

Tab. 5.5.: Charakterisierung der verwendeten Oberflächenbeschichtungen - PE-SAM.

Oberfläche	IR-Schwingungsbanden [cm^{-1}]	Schichtdicke [Å]	Kontaktwinkel [$^\circ$]	ζ -Potential [mV]
PAH	1119, 1203 C-N (ν)	10 ± 1	44 ± 3	$+ 38 \pm 2$
	1395 C-H (δ)			
	1457, 1557, 1653 N-H (δ)			
	2863, 2926, 2963 C-H (ν)			
PEI	1078, 1125, 1169 C-N (ν)	10 ± 1	19 ± 1	$+ 48 \pm 1$
	1379 C-H (δ)			
	1563, 1697 N-H (δ)			
	2925, 2936 C-H (ν)			
PVP	937, 991, 1076 C-H _{ar} (δ)	15 ± 1	55 ± 3	$+ 19 \pm 3$
	1436, 1473 C-H (δ)			
	1570, 1591 C-C _{ar} (δ)			
	1704 C-N (ν)			
	2855, 2933 C-H _{al} (ν)			
	3009, 3074 C-H _{ar} (ν)			
PSS	1008, 1037 S=O (ν)	15 ± 1	31 ± 2	$- 41 \pm 2$
	1128, 1179, 1212 S-O (ν)			
	1372, 1407, 1456 C-H (δ)			
	1538, 1633 C-C _{ar} (ν)			
	2858, 2925, 2959 C-H _{al}			

Abkürzungen: δ Deformationsschwingung, ν Streckschwingung, al aliphatisch, ar aromatisch.

Im Falle der Polyelektrolytbeschichtungen auf Silicium wurden für eine grobe Abschät-

zung 500 nm SiO₂-Partikel entsprechend funktionalisiert und deren ζ -Potential mit Hilfe der ELS bestimmt. Die Salzkonzentration des Acetat-Puffers, aus dem das Protein abgetrennt wurde, ist für die Messmethode zu groß, so dass kein verlässliches Resultat zu erwarten wäre. Dementsprechend wurden die Partikel in Reinstwasser suspendiert. PEI zeigt mit + 48 mV das stärkste positive ζ -Potential. Das verwendete PEI ist ein hoch verzweigtes Molekül, das sowohl primäre als auch sekundäre und tertiäre Aminogruppen trägt, das lineare PAH trägt hingegen nur primäre Aminogruppen. Sekundäre und tertiäre aliphatische Amine sind stärkere Basen als primäre aliphatische Amine, was das mit + 38 mV etwas schwächere positive Zetapotential der PAH-beschichteten Partikel im Vergleich zu den PEI-beschichteten Partikeln begründet. Da das aromatische Pyridin mit einem pK_B -Wert von 8.9 viel schwächer basisch reagiert als aliphatische Amine ist auch das ζ -Potential der PVP-beschichteten Partikel mit + 19 mV noch schwächer positiv. Styrolsulfonsäure ist mit einem pK_S -Wert von 0.7 eine starke Säure, so dass die PSS-funktionalisierten Partikel ein negatives ζ -Potential von - 41 mV aufweisen.

5.2.2. Quantifizierung

Die Menge an adsorbiertem Protein auf den verschiedenen Oberflächen wurde ellipsometrisch, IR-spektroskopisch sowie mit Hilfe eines enzymgekoppelten Immunoassays (ELISA) bestimmt. Um einen ungefähren Eindruck vom Adsorptionsverhalten der GOx und ihrer Affinität zur jeweiligen Oberfläche zu erhalten, wurde die Proteinlösung nach der Inkubationszeit zunächst mit einem großen Überschuß an Reinstwasser ausgewaschen und anschließend noch 3 x mit PBS gespült. Nach jedem Waschvorgang wurde die Proteinschichtdicke ellipsometrisch gemessen. Die Abbildung 5.18 zeigt, wie die Schichtdicke der adsorbierten GOx nach jedem der 3 Waschzyklen in PBS sukzessive abnimmt. Auffällig ist hierbei, dass, bezogen auf die Schichtdicke nach dem initialen Spülen der Proben mit Wasser, insgesamt umso weniger Protein abgewaschen wird, je hydrophober die Oberfläche ist.

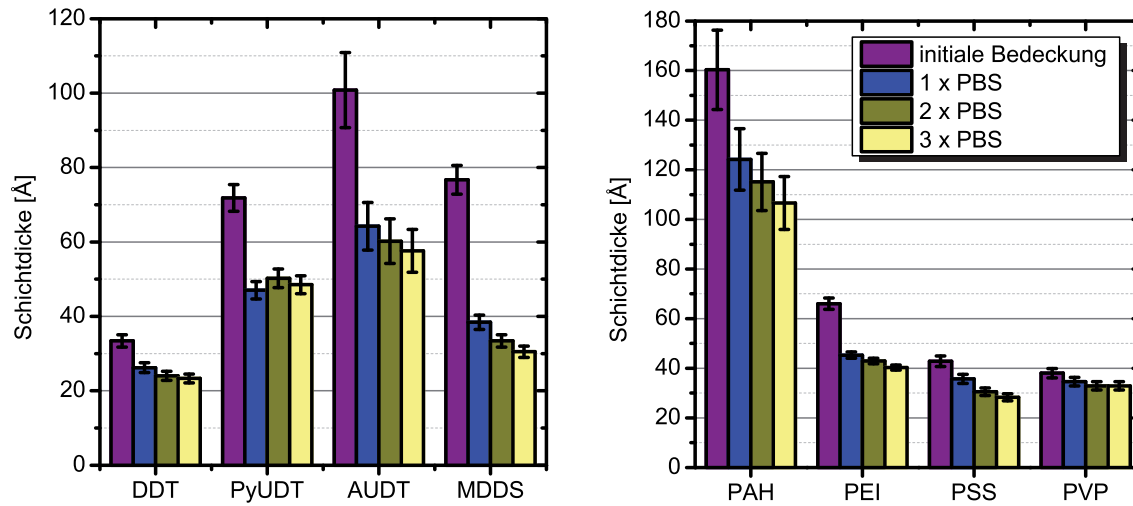


Abb. 5.18.: Ellipsometrische Schichtdickenbestimmung der adsorbierten GOx nach dem initialen Spülschritt mit Wasser, sowie nach jedem der 3 zehnminütigen Waschzyklen in PBS.

Dies wird deutlich, wenn man den relativen Schichtdickenverlust nach dem dreimaligen Spülen mit PBS gegen den Wasserkontaktwinkel der Oberflächenbeschichtungen aufträgt (Abb. 5.19). Hierbei ist jeweils die Reihe der Thiol- sowie Polyelektrolytbeschichtungen in sich konsistent, das heißt, der Verlust an Protein mit jedem Waschzyklus korreliert innerhalb einer Reihe nur mit dem Wasserkontaktwinkel, nicht aber mit dem Vorzeichen der Oberflächenladung. Der Schichtdickenverlust ist bei ähnlichem Kontaktwinkel jedoch auf den Thiol-SAM etwas höher als auf den Polyelektrolyt-SAM.

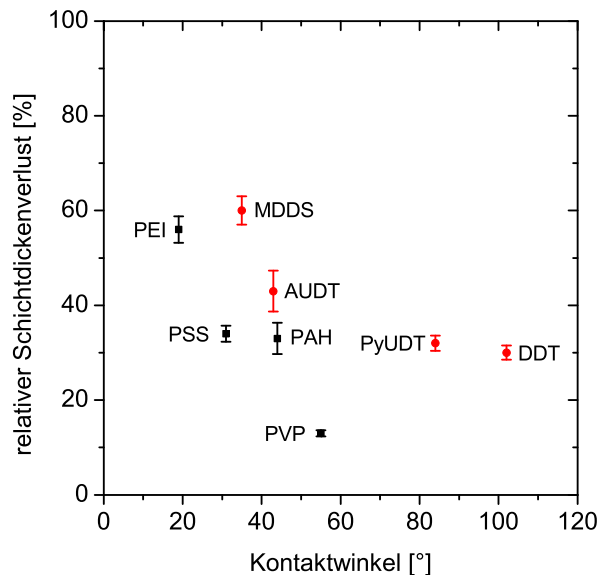


Abb. 5.19.: Relativer Schichtdickenverlust der adsorbierten GOx nach den 3 Waschzyklen in PBS in Abhängigkeit vom Wasserkontaktwinkel der jeweiligen Oberfläche.

Die Menge an adsorbierten Protein ist demnach auf hydrophilen, geladenen Oberflächen zunächst höher als auf hydrophoben, ungeladenen bzw. schwach geladenen (PVP) Oberflächen. Durch das Spülen in salzhaltiger Pufferlösung wird jedoch die attraktive Coulombkraft zwischen Protein und einer hydrophilen Oberfläche abgeschirmt, so dass das Protein bis zu einem Anteil von 60 % der initial gemessenen Schichtdicke wieder abgelöst werden kann (Abb. 5.18). Zurück bleiben diejenigen Proteinmoleküle, die besonders viele Kontaktpunkte zur Oberfläche ausgebildet haben bzw. zusätzlich über dispersive Kräfte von der Oberfläche angezogen werden. Wird das Protein auf eine hydrophobe Oberfläche abgeschieden, so dominieren von Beginn des Adsorptionsprozesses an dispersive Kräfte die attraktive Wechselwirkung. Darüber hinaus wird das Protein dehydriert, was einen Gewinn an Entropie für das Gesamtsystem bedeutet (vgl. Abschnitt 2.4.1). Hier wird also bereits durch das Spülen mit Wasser die größte Menge an schwach gebundenem Protein wieder abgelöst und der Massenverlust durch das Waschen mit Pufferlösung ist nur noch gering. Die auf der Oberfläche verbleibende Menge an Protein ist erwartungsgemäß auf positiv geladenen Beschichtungen deutlich größer, als auf negativ geladenen Beschichtungen, da die GOx selbst bei pH 5.5 schwach negativ geladen ist (gemessenes ζ -Potential von GOx in Reinstwasser bei pH \approx 6.0 ist - 4 mV).

Mit Hilfe des o. g. Experiments können zwar relativ einfach qualitative Aussagen über die Affinität der GOx zu einer bestimmten Oberfläche getroffen werden, jedoch wird zur

Berechnung der spezifischen Enzymaktivität die Konzentration des Proteins im entsprechenden Reaktionsvolumen benötigt, was die Ermittlung der absoluten Adsorbatmenge pro Flächeneinheit erfordert. Diese Werte liefert ein ELISA, bei dem zunächst ein GOx-spezifischer Antikörper adsorbiert wird, der in einem zweiten Schritt von einem gegen den Erstantikörper spezifischen, HRPO-markierten Antikörper gebunden wird. Die enzymatische Aktivität der HRPO kann direkt spektralphotometrisch detektiert werden, so dass mittels einer Eichgerade ihre Oberflächenkonzentration bestimmt werden kann. Im Idealfall ist das Bindungsverhältnis von GOx zum Zweitantikörper und damit zur HRPO 1 : 1, so dass aus der Menge an gebundenem Zweitantikörper auf die Menge an adsorbierter GOx geschlossen werden kann. Der Abbildung 5.20 ist zu entnehmen, dass auf den positiv geladenen SAM AUdT und PAH, sowie der aromatischen SAM PyUDT die absoluten Adsorbatmengen im Bereich von ca. 80 ng/cm² liegen. Auf PEI adsorbiert mit 88 ± 10 ng/cm⁻¹ am meisten GOx. Auf PVP adsorbieren 76 ± 5 ng/cm², auf den negativ geladenen SAM MDDS und PSS beträgt die Adsorbatmenge ca. 55 – 60 ng/cm² und auf DDT adsorbiert mit 51 ± 5 ng/cm² am wenigsten GOx.

Ein gewisser Anteil der beiden Antikörper adsorbiert aber auch unspezifisch auf die Oberflächen. Die Masse an unspezifisch gebundenem HRPO-Antikörper wurde jeweils anhand einer Blindprobe ermittelt, auf die initial BSA anstelle von GOx abgeschieden wurde. Die Werte, um die die quantifizierte GOx demnach korrigiert werden muss, liegen je nach Oberflächenbeschichtung im Bereich von 5 – 15 % der absoluten Menge an GOx (gelbe Balken in Abb. 5.20 a) und b)).

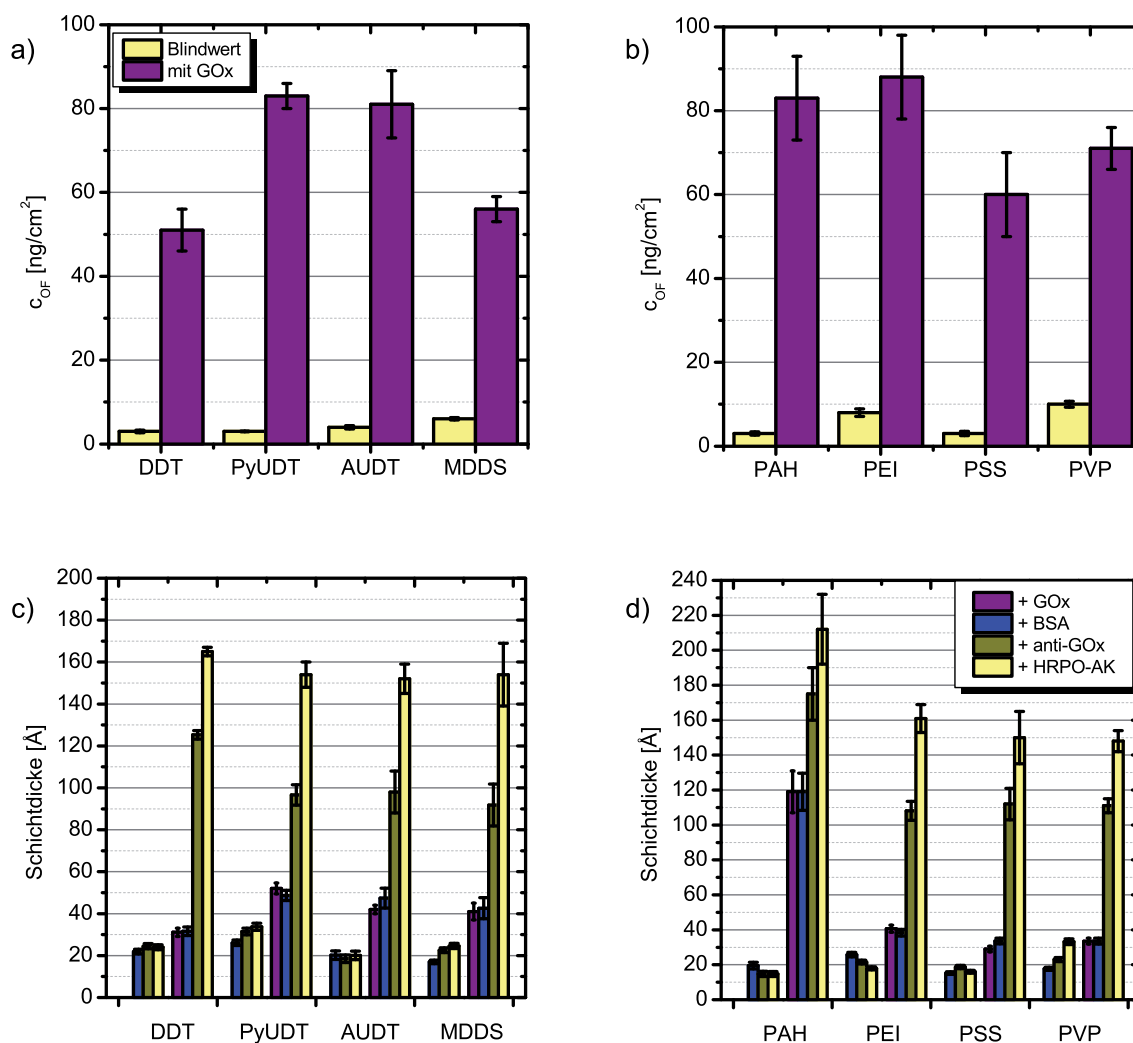


Abb. 5.20.: Absolute Massenbelegung der adsorbierten GOx auf den verwendeten a) Thiol- bzw. b) Polyelektrolytbeschichtungen gemäß ELISA. Die Abbildungen c) und d) zeigen die ellipsometrisch bestimmte Veränderung der Schichtdicken nach jedem Inkubationsschritt. In allen Abbildungen zeigt die jeweils linke Grafik das Verhalten der Blindprobe, die rechte Grafik das Verhalten GOx-bedeckter Oberflächen.

Die ellipsometrische Kontrolle der Schichtdicken nach jedem Inkubationsschritt des ELISA (Abb. 5.20 c) und d)) zeigt ferner, dass auch dann unspezifisch gebundener HRPO-Antikörper detektiert werden kann, wenn die Adsorbatmenge auf der Blindprobe nach Inkubation in den Antikörperlösungen scheinbar nicht zugenommen hat (vgl. PAH und PEI). Dies bedeutet nichts anderes, als dass neben der unspezifischen Adsorption von Antikörpern auch ein Austausch von Antikörpermolekülen mit BSA- bzw. GOx-Molekülen an den Oberflächen stattfindet. Offenbar ist also die Affinität der Antikörper zu den Oberflächenbeschichtungen größer, als die des BSA sowie der GOx, was eine weitere

Fehlerquelle der Quantifizierungsmethode ist.

Die Hauptfehlerquelle des Experiments liegt jedoch darin begründet, dass die spezifische Bindekapazität der Antikörper nicht genau bekannt ist. Der polyklonale Erstantikörper, welcher spezifisch an GOx bindet, ist kommerziell nur als Antikörperserum erhältlich. Das heißt, das Präparat besteht aus einer Mischung verschiedener Immunglobuline (Ig), von denen es insgesamt 5 verschiedene Klassen gibt [130]. Dabei beträgt das Molekulargewicht von IgG z. B. etwa 144 kDa, bei IgM handelt es sich dagegen um ein Pentamer mit einem Molekulargewicht von ca. 900 kDa. IgG verfügt über zwei Antigenbindungsstellen, wobei man davon ausgehen kann, dass aus sterischen Gründen nur ein Molekül GOx gebunden wird. IgM ist jedoch ein sehr viel größeres Molekül als GOx, so dass von den insgesamt 10 Antigenbindungsstellen auch mehrere besetzt werden können und damit wäre das Bindungsverhältnis von GOx zum spezifischen Antikörper größer als 1 : 1. Die Zusammensetzung des verwendeten Antikörperserums wird aber vom Hersteller nicht genau spezifiziert, es ist also nicht bekannt, welche Art von Antikörpern zu welchen Anteilen enthalten sind.

Ein monoklonaler Antikörper wäre als reines IgM-Präparat erhältlich, allerdings erkennen monoklonale Antikörper nur ein bestimmtes Epitop ihres Antigens. Ein Epitop ist ein kleiner Molekülabschnitt des Antigens (meist ein Protein), an den ein Antikörper spezifisch bindet. Bei Proteinen unterscheidet man zwei Arten von Epitopen: ein *kontinuierliches Epitop* besteht aus einer Reihe von Aminosäuren, die in der Sequenz direkt aufeinander folgen. Ein *diskontinuierliches Epitop* wird hingegen von mehreren Aminosäuren, die in der Sequenz weit entfernt voneinander liegen, aber durch die Faltung des Proteins in unmittelbare räumliche Nähe zueinander gebracht werden, gebildet. Da die GOx infolge der Adsorption ihre Struktur verändern wird und der Grad der Denaturierung auf den verschiedenen Oberflächen auch unterschiedlich sein wird, ist es für das ELISA-Experiment also nicht sinnvoll mit einem monoklonalen Antikörper zu arbeiten, da dieser an ein teilweise denaturiertes Protein nicht oder nur wenig binden würde.

Betrachtet man die Abbildungen 5.20 c) und d), so ist eine Proportionalität zwischen dem Schichtdickenzuwachs nach Inkubation mit dem GOx-spezifischen Erstantikörper und der Schichtdicke der adsorbierten GOx nicht erkennbar. Das Verhältnis von Erst- zu Zweitantikörper ist ebenfalls nicht konstant. Da allerdings, wie oben erwähnt, die Art des Erstantikörpers nicht bekannt ist, sind diese Werte wenig aussagekräftig. Es ist sogar denkbar, dass aus einem Gemisch aus verschiedenen Antikörpern je nach Grad der Denaturierung des Antigens (in diesem Fall GOx) unterschiedliche Arten von Ig bevorzugt

Tab. 5.6.: Bindekapazitäten des HRPO-konjugierten Antikörpers.

Beschichtung	Bindekapazität nach Ellispometrie
PAH	0.2 ± 0.1
PEI	0.9 ± 0.1
PSS	0.9 ± 0.2
PVP	0.8 ± 0.1
DDT	0.9 ± 0.1
PyUDT	0.9 ± 0.1
AUDT	0.9 ± 0.2
MDDS	1.1 ± 0.2

adsorbieren. Entscheidend für eine korrekte Quantifizierung ist aber, dass die Menge an adsorbiertem HRPO-konjugiertem Antikörper proportional der adsorbierten GOx ist, da die enzymatische Aktivität der HRPO letztendlich das Messsignal bestimmt. Die gesamte Molekülmasse des Zweitantikörpers ist bekannt und etwa 1.4 mal höher als die der GOx. Im Idealfall müsste man also genau dieses Verhältnis finden, wenn man den Schichtdickenzuwachs, der durch den Zweitantikörper verursacht wird, durch die Schichtdicke des GOx-Adsorbats teilt. Verrechnet man den Unterschied der Molekulargewichte von Zweitantikörper und GOx mit den gefundenen Verhältnissen, so erhält man schließlich die Bindekapazität des HRPO-konjugierten Antikörpers, die der Tabelle 5.6 zu entnehmen sind.

Die ermittelten Bindekapazitäten des HRPO-konjugierten Zweitantikörpers stimmen innerhalb der Fehlergrenzen recht gut mit dem Idealwert von 100 % überein. Lediglich auf PAH findet man eine Bindekapazität von nur 20 %. Vergleicht man aber die absolute Oberflächenkonzentration der GOx auf PAH mit der gemessenen Adsorbatschichtdicke auf dieser Oberfläche, so fällt auf, dass die beiden Werte offensichtlich völlig widersprüchlich zueinander sind. Obwohl die Dicke der Adsorbatschicht auf PAH mit $107 \pm 11 \text{ \AA}$ etwa 67 \AA mehr beträgt als auf PEI, ist der absolute Wert auf PAH mit $83 \pm 10 \text{ ng/cm}^2$ innerhalb der Fehlergrenzen ähnlich dem auf PEI mit $88 \pm 10 \text{ ng/cm}^2$. Eine Ursache für diese augenscheinliche Diskrepanz könnte eine stärkere Hydratisierung der GOx-Schichten auf PAH sein, die ein Aufquellen der Proteinfilme und damit eine höhere,

gemessene Schichtdicke zur Folge hat. Damit wäre auch die ermittelte Bindekapazität des HRPO-konjugierten Antikörper gegen GOx auf PAH nicht aussagekräftig.

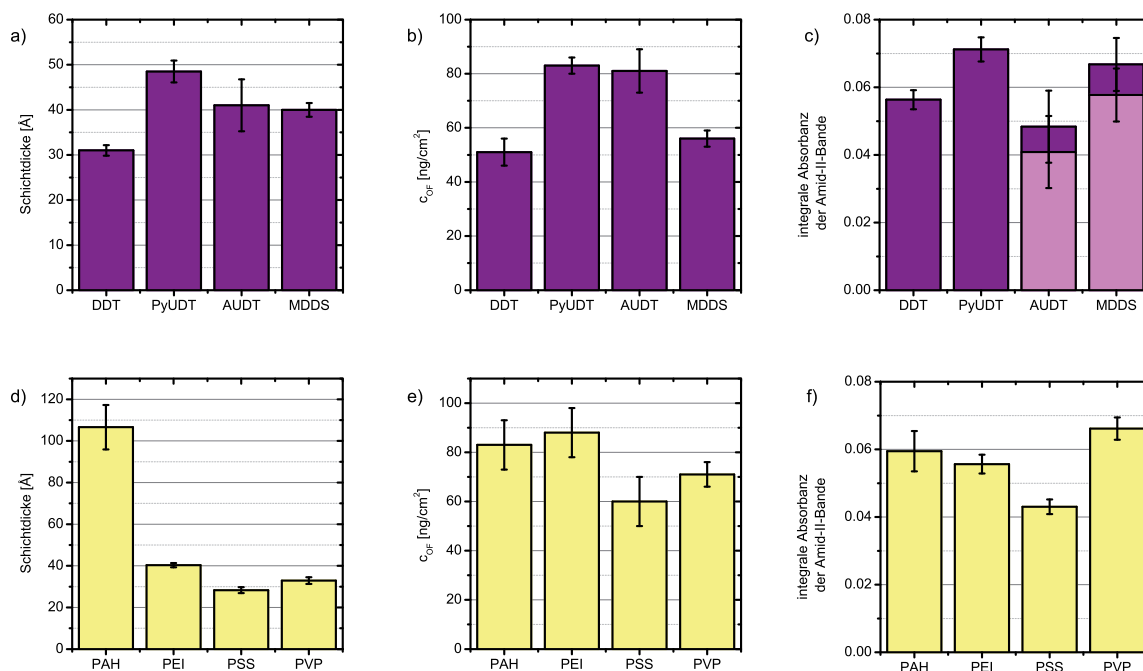


Abb. 5.21.: Vergleich der quantifizierten Mengen an adsorbierter GOx auf Thiol- (oben) bzw. Polyelektrolytbeschichtungen (unten) mit Hilfe der a) + d) Ellipsometrie, eines b) + e) ELISA sowie der c) + f) IR-Spektroskopie. In c) sind die integralen Absorbanzen der Amid-II-Banden von GOx auf AUDT bzw. MDDS jeweils unter Berücksichtigung zweier Extremwerte von spektralen Anteilen der SAM im Amid-II-Bereich in magenta bzw. lila dargestellt (vgl. Text).

Unterstützt wird diese Vermutung durch die IR-spektroskopische Quantifizierung der Adsorbatsmengen anhand der integralen Absorbanz der Amid-II-Bande (Abb. 5.21 c) und f)). Die Amid-II-Bande liegt mit einem durchschnittlichen Absorptionsmaximum von 1540 cm^{-1} deutlich außerhalb des Bereichs der Deformationsschwingungsbande von Wasser (Maximum bei 1650 cm^{-1}) und wird damit in ihrer Intensität vom Hydratwassergehalt nicht beeinflusst. Vergleicht man die Abbildungen 5.21 d) und f) miteinander, so wird klar, dass für den Fall der adsorbierten GOx auf PAH ein erhöhter Hydratwassergehalt für ein Aufquellen der Proteinschicht verantwortlich sein könnte. Die integralen Absorbanzen der Amid-II-Bande sind auf PAH und PEI recht ähnlich und stimmen damit gut mit den ELISA-Ergebnissen überein, wohingegen die gemessene Adsorbatschichtdicke auf PAH etwa 2.7 x so hoch ist wie auf PEI. Die direkte Vergleichbarkeit der mittels IR-Spektroskopie bestimmten Adsorbatsmengen ist jedoch durch den Umstand eingeschränkt, dass mit Ausnahme von DDT alle Oberflächenbeschichtungen in dem spektralen Bereich, in dem auch die Amid-II-Schwingung absorbiert (ca. $1480 - 1600\text{ cm}^{-1}$), Schwingungsban-

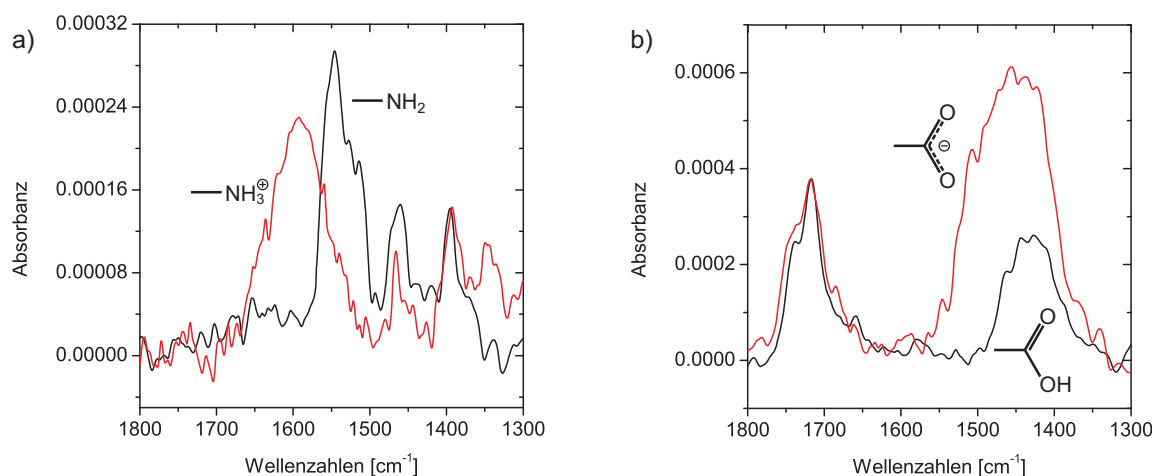


Abb. 5.22.: AUDT- bzw. MDDS-SAM im fingerprint-Bereich. a) Die AUDT-beschichtete Oberfläche wurde 1 h lang in 0.1 M HCl eingelegt. Die Schwingungsbande der protonierten Aminogruppen ist um ca. 50 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen verschoben, die Bande wird breiter. b) Die MDDS-beschichtete Oberfläche wurde 1 h lang in 0.1 M NaOH eingelegt. Aufgrund der Deprotonierung der Carboxygruppe ist die Schwingungsbande der Hydroxylgruppe um ca. 20 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen verschoben. Darüber hinaus sind die Halbwertsbreite und Bandenhöhe deutlich gestiegen.

den zeigen (vgl. Tab. 5.4 und 5.4). Die Flächenintegrale der Amid-II-Banden wurden zwar um den Anteil der jeweiligen darunterliegenden SAM korrigiert, es ist jedoch zu beachten, dass die NH_2 -Gruppe einer AUDT-Monolage beispielsweise im Kontakt mit der Proteinlösung protoniert wird und damit die Schwingungsfrequenz der funktionellen Gruppe eine Blauverschiebung um etwa 20 – 50 cm^{-1} erfährt. Folglich sinkt der spektrale Anteil der AUDT-SAM im Bereich der Amid-II-Schwingungsbande. Der umgekehrte Fall liegt bei der Proteinadsorption auf eine MDDS-Beschichtung vor. Die Säuregruppe zeigt ihre Bandenmaxima im fingerprint-Bereich bei etwa 1420 cm^{-1} (δ O-H) und 1700 cm^{-1} (ν C=O), wobei sich die OH-Schwingungsbande infolge der Deprotonierung zum Carboxylatanion stark verbreitert und deutlich in den Bereich der Amid-II-Schwingungsbande hineinreicht (Abb. 5.22). Die Abbildung 5.21 zeigt für diese beiden Oberflächenbeschichtungen jeweils beide Extremwerte der Spektrensubtraktion. Das heißt, von den integralen Absorbanzen der Amid-II-Banden wurde einmal der spektrale Anteil des roten Spektrums und einmal der Flächeninhalt des schwarzen Spektrums gemäß Abbildung 5.22 subtrahiert. Das tatsächliche Ergebnis wird zwischen diesen Werten liegen, da der Grad der Protonierung der AUDT-SAM bzw. der Grad der Deprotonierung der MDDS-SAM im Kontakt mit der Proteinlösung nicht genau bekannt ist. Da die beiden Polyelektrolytbeschichtungen mit Aminogruppen (PAH und PEI) aus leicht saurer, wässriger Pufferlösung präpariert

wurden, wird angenommen, dass eine entsprechende Korrektur der SAM-Spektren im Amid-II-Bereich hier nicht vorgenommen werden muss.

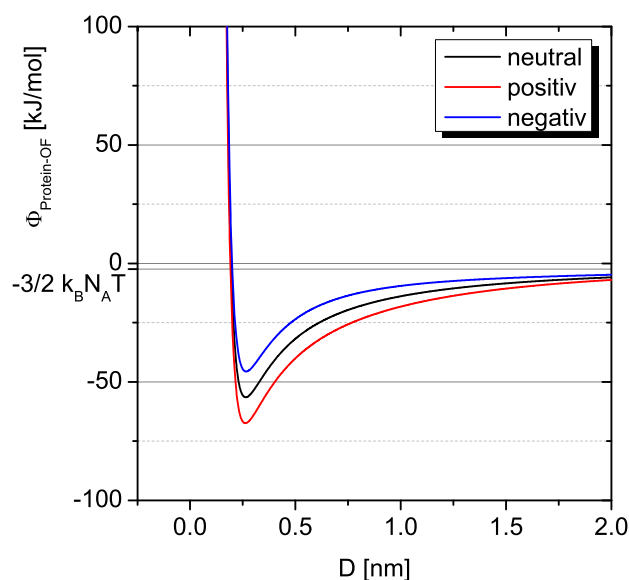


Abb. 5.23.: Wechselwirkungspotential der GOx mit 3 verschiedenen Modelloberflächen. Die positiv geladene Oberfläche (rot) soll ein ζ -Potential von + 40 mV, die negativ geladene Oberfläche (blau) soll ein ζ -Potential von - 40 mV haben. Die weiteren Annahmen sind: Partikelradius $R = 10$ nm, Ionenkonzentration $n = 0.2$ M, $\Psi_{\zeta}(\text{GOx}) = -4$ mV und Hamaker-Konstante $A = 1.0 \times 10^{-20}$ J [163].

Man kann mit Hilfe der unter Kapitel 5.1 vorgestellten Rechnungen abschätzen, dass sich die gesamte Wechselwirkungsenergie der GOx mit einer positiv geladenen Oberfläche, deren ζ -Potential etwa + 40 mV beträgt, zu etwa - 65 kJ/mol ergibt (Abb. 5.23). Bei negativem Vorzeichen der Oberflächenladung steigt dieser Wert auf etwa - 45 kJ/mol. Die Wechselwirkungsenergie zwischen dem Protein und einer ungeladenen Oberfläche liegt genau zwischen diesen beiden Werten. Allerdings wurde der Entropiegewinn durch die Dehydrierung des Proteins in Kontakt mit der hydrophoben Oberfläche hier nicht berücksichtigt. Weiterhin wird bei der Berechnung das Potential zwischen einer idealen Kugel und einer planaren Oberfläche betrachtet, das GOx-Molekül ist jedoch selbst im nativen Zustand des Enzyms keineswegs kugelsymmetrisch und wird im Kontakt mit der Oberfläche seine Gestalt noch weiter verändern. Insgesamt korreliert diese grobe Abschätzung jedoch recht gut mit den bestimmten Mengen an adsorbierter GOx auf den getesteten Oberflächen und zeigt außerdem, dass dispersive Kräfte das System offenbar stärker beeinflussen, als elektrostatische Kräfte, da der Hauptanteil des attraktiven Potentials

van-der-Waals-Wechselwirkungen zuzuschreiben ist.

Interessant ist jedoch, dass die Oberflächenkonzentration auf den beiden Beschichtungen mit den höchsten Wasserkontaktwinkeln (DDT und PyUDT) völlig unterschiedlich ist: PyUDT ($\theta = 84 \pm 1^\circ$) adsorbiert mit $83 \pm 3 \text{ ng/cm}^2$ etwa 1.6 x so viel GOx wie DDT ($\theta = 102 \pm 1^\circ$) mit $51 \pm 5 \text{ ng/cm}^2$. Dies legt die Vermutung nahe, dass zwischen dem Protein und der pyrrolylterminierten Oberfläche noch eine weitere Art der Wechselwirkung vorliegen muss, die bisher nicht in Betracht gezogen wurde. Burley und Petsko konnten durch ihre Berechnungen zeigen, dass π - π -Wechselwirkungen zwischen aromatischen Seitenketten etwa 3 – 6 kJ/mol zur Stabilisierung der nativen Proteinkonformation beitragen [164]. Die auffällig hohe Oberflächenkonzentration der GOx auf der PyUDT-Monolage könnte also durch eine attraktive Wechselwirkung aromatischer Proteinseitenketten mit den Pyrrolringen der Oberflächenbeschichtung verursacht werden, deren Beitrag zum Gesamtpotential ähnlich dem der attraktiven Coulomb-Wechselwirkung auf positiv geladenen Oberflächen sein sollte.

5.2.3. Aktivität

Zunächst wurde die spezifische Aktivität und Substrataffinität der GOx in Lösung bestimmt. Die Substrataffinität eines Enzyms kann man allgemein aus der Michaelis-Menten-Konstanten K_M ableiten. Es gilt, je kleiner der Wert für K_M , desto niedriger ist die Substratkonzentration, die benötigt wird um die halbe Maximalgeschwindigkeit der Reaktion zu erreichen, und desto höher ist die Substrataffinität des Enzyms. Bezüglich der GOx fällt auf, dass die spezifische Aktivität, d. h. der Anteil an katalytisch aktiven Enzymmolekülen im gesamten Probenvolumen, im Konzentrationsbereich von 10 – 1000 ng/ml mit steigender Proteinkonzentration sinkt (vgl. Tab. 5.7). Möglicherweise wird dies durch eine zunehmende Aggregation des Enzyms mit steigender Konzentration verursacht, die dazu führt dass sich die Enzymmoleküle gegenseitig blockieren. Andererseits verschlechtert sich aber mit abnehmender Enzymkonzentration die Substrataffinität, das heißt die Werte für K_M steigen von $K_M = 8 \pm 4 \text{ mM}$ bei $c = 1000 \text{ ng/ml}$ auf $K_M = 22 \pm 2 \text{ mM}$ bei $c = 10 \text{ ng/ml}$, so dass man davon ausgehen kann, dass bei kleinen Konzentrationen partiell denaturierte Enzymmoleküle die Kinetik bestimmen. Als Referenz zum Vergleich mit den Aktivitäten der adsorbierten GOx wird im Folgenden daher jeweils die Aktivität bei einer Konzentration von 100 ng/ml herangezogen. Sie beträgt $141 \pm 19 \text{ U/mg}$.

Die gemessenen Aktivitäten und Substrataffinitäten der adsorbierten GOx, sowie die quan-

Tab. 5.7.: Aktivität von GOx in Lösung bei verschiedenen Konzentrationen.

c [ng/ml]	A [U/mg]	K _M [mM]
1000	100 ± 5	8 ± 4
500	128 ± 2	12 ± 2
100	141 ± 3	19 ± 2
50	158 ± 2	17 ± 2
10	216 ± 3	22 ± 2

tifizierten Mengen an Adsorbat, sind in der Tabelle 5.8 zusammengefasst. Demnach ist die enzymatische Aktivität auf den Oberflächen in allen Fällen niedriger als in Lösung bei $c = 100$ ng/ml. Auf den beiden positiv geladenen Oberflächen AUDT und PEI beträgt die spezifische Aktivität mit 85 ± 9 U/mg bzw. 81 ± 10 U/mg allerdings immer noch ca. 60 % der Aktivität in Lösung, auf PAH bleiben mit 115 ± 10 U/mg sogar ca. 80 % der Aktivität in Lösung erhalten. Da die GOx, wie weiter oben bereits erwähnt, bei pH 5.5 selbst schwach negativ geladen ist, ist davon auszugehen, dass der Adsorptionsprozess auf positiv geladene Oberflächen nur vergleichsweise geringe Veränderungen der Struktur des Proteins erfordert. Somit bleibt die Bindungstasche für das Substrat weitestgehend intakt und das Enzym verliert nur wenig an Aktivität. Die weiter oben schon erwähnte, vermutete starke Hydratisierung der GOx auf PAH wird zusätzlich für eine Stabilisierung der Tertiärstruktur des Proteins sorgen, so dass hier die höchste Aktivität von allen Adsorbaten gemessen werden konnte.

Es ist auch vorstellbar, dass die katalytische Reaktion der GOx durch den Kontakt mit der positiv geladenen Oberfläche beeinflusst wird. Die Oxidation von Glucose zu Glucolacton erfordert eine Reduktion des Flavinadeninucleotids (FAD) im katalytischen Zentrum des Enzyms, was mit einem doppelten Protonentransfer zur Isoalloxazingruppe des FAD einhergeht (Abb. 5.24). Als Protonendonoren agieren im nativen Enzym die basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und insbesondere Histidin. Im Falle der adsorbierten GOx könnten die Aminogruppen der PAH-, PEI- und AUDT-Beschichtungen die Reaktion durch Diffusion von Protonen von der Oberfläche zum Zentrum des Enzymmoleküls indirekt begünstigen.

Tab. 5.8.: Aktivität von GOx auf homogen beschichteten Oberflächen.

Beschichtung	A [U/mg]	K _M [mM]	c _{OF} [ng/cm ²]
DDT	69 ± 7	19 ± 2	51 ± 5
PyUDT	12 ± 1	8 ± 2	83 ± 3
AUDT	85 ± 9	12 ± 4	81 ± 8
MDDS	49 ± 3	18 ± 6	56 ± 3
PAH	115 ± 10	12 ± 1	83 ± 10
PEI	81 ± 10	12 ± 7	88 ± 10
PVP	13 ± 1	17 ± 8	76 ± 5
PSS	29 ± 4	49 ± 13	60 ± 10

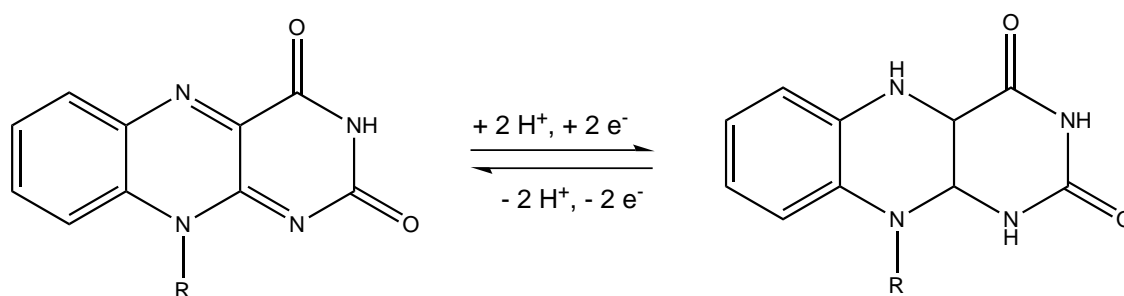


Abb. 5.24.: Redoxreaktion des FAD. Hier ist nur die Isoalloxazingruppe dargestellt, R symbolisiert den Adenindiphosphatrest.

Mit 69 ± 7 U/mg liegt die Aktivität der GOx auf der hydrophoben, ungeladenen Oberflächenbeschichtung DDT mit knapp 50 % des Referenzwerts etwas unter den Werten auf den positiven Oberflächen. Da das Enzym einen recht hohen Anteil an hydrophoben Seitenketten aufweist, sind auch hier nur geringe Veränderungen der Sekundärstruktur nötig, um attraktive Wechselwirkungen mit der Oberfläche ausbilden zu können. Allerdings kommt es durch die Adsorption auf eine hydrophobe Oberfläche, wie bereits erwähnt, zu einer Dehydrierung des Enzyms. Der Entzug von Hydratwasser wird insbesondere die Tertiärstruktur der GOx stören, so dass hier die Aktivität etwas schlechter wird.

Im Kontakt mit einer negativ geladenen Oberfläche muss das Protein positiv geladene Aminosäureseitenketten zur Oberfläche hin ausrichten um attraktive Coulomb-Wechselwirkungen ausbilden zu können. Demzufolge sind größere strukturelle Veränderungen zu

erwarten und die Aktivität der adsorbierten GOx sinkt auf den beiden negativ geladenen Oberflächen MDDS und PSS mit 49 ± 3 U/mg bzw. 29 ± 4 U/mg auch auf 35 % bzw. 20 % des Referenzwerts.

Besonders niedrige Aktivitätswerte von 12 ± 1 U/mg bzw. 13 ± 1 U/mg zeigt die GOx adsorbiert auf den beiden rein aromatischen Oberflächenbeschichtungen PyUDT und PVP. Hier bleiben lediglich ca. 9 % der Enzymaktivität in Lösung erhalten. Eine Ursache hierfür könnte die weiter oben schon erwähnte Ausbildung von π - π -Wechselwirkungen der aromatischen Aminosäureseitenketten Tryptophan (Trp), Phenylalanin (Phe), Histidin (His) und Tyrosin (Tyr) mit den aromatischen Gruppen der Oberflächenbeschichtung sein. Es ist anzunehmen, dass eine derartigen Interaktion mit größeren konformativen Veränderungen der Proteinstruktur einhergeht, da sich ein Großteil der aromatischen Seitenketten der GOx im Innern des Proteins befindet bzw. dem Kern des Moleküls zugewandt ist. Ferner liegen die aromatischen Seitenketten im Enzymmolekül häufig paarweise gegenüber und stabilisieren durch ihre gegenseitige Wechselwirkung insbesondere die Tertiärstruktur des Proteins.

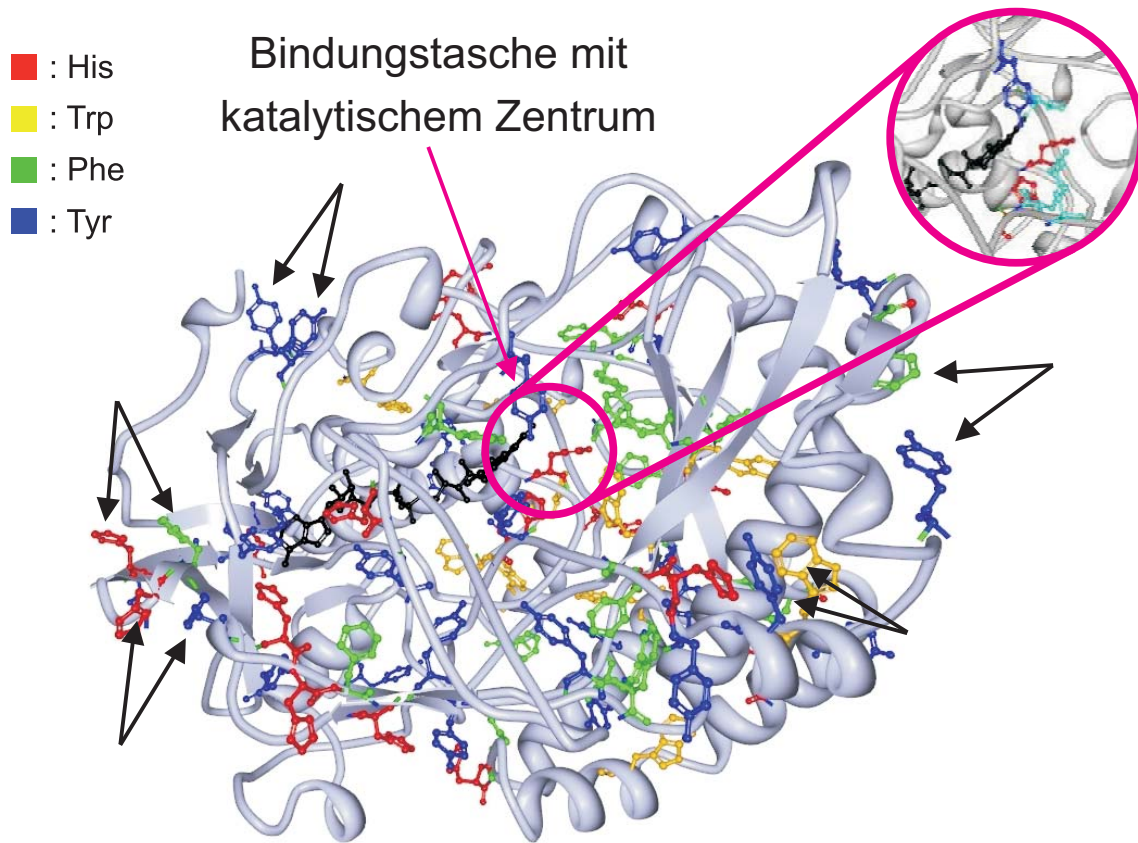


Abb. 5.25.: Schematische Darstellung einer Untereinheit von GOx mit allen aromatischen Seitenketten [125]. His ist rot, Trp gelb, Phe grün und Tyr blau markiert. Der vergrößerte Ausschnitt des katalytischen Zentrums zeigt ferner die aliphatischen Seitenketten Asn, Arg und Thr in hellblau. Die Aminosäuren Asn, Arg, Thr, Tyr und 2 x His fixieren über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen das Substrat am katalytischen Zentrum. Die schwarzen Pfeile markieren exemplarisch einige Aromatenpaare.

Die Abbildung 5.25 zeigt ein Modell einer Untereinheit der GOx mit allen aromatischen Seitenketten farbig markiert sowie dem katalytischen Zentrum mit dem FAD in schwarz eingezeichnet. Einige der Aromatenpaare sind exemplarisch mit Pfeilen gekennzeichnet. Im Bereich der Bindungstasche sind besonders viele der hydrophoben, aromatischen Aminosäuren Phe und Trp vorzufinden, was nach Burley und Betsko häufig bei Enzymen zu beobachten ist und der Proteinstruktur um das katalytische Zentrum spezielle Stabilität verleiht [164]. G. Wohlfahrt et al. konnten in ihrer Kristallstrukturanalyse der GOx zeigen, dass das Substrat Glucose in der Bindungstasche von insgesamt 6 Aminosäureseitenketten über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen fixiert wird [165]. Neben den aliphatischen Aminosäuren Asparagin (Asn), Arginin (Arg) und Threonin (Thr) sind an der Substratbindung auch die aromatischen Aminosäuren His-

tidin (2 x) und Tyrosin beteiligt. Richten sich die aromatischen Seitenketten nun zur Oberfläche hin aus, so bricht die die Proteinstruktur stabilisierende Wechselwirkung der Aromatenpaare im Enzym zusammen bzw. das Substrat kann nicht mehr richtig fixiert werden und die enzymatische Aktivität geht verloren.

Bezüglich der Substrataffinität der adsorbierten GOx stellt sich heraus, dass das Enzym sein Substrat lediglich auf PSS deutlich schlechter bindet, als im nativen Zustand ($K_M = 49 \pm 13$ mM im Vergleich zu $K_M = 19 \pm 2$ mM). In diesem Fall scheinen also tatsächlich stark denaturierte Proteine die Kinetik zu bestimmen. Auf PyUDT und PVP ist zwar die spezifische Aktivität sehr gering, diejenigen Enzymmoleküle, die die Substratoxidation katalysieren, bleiben aber offenbar intakt. Es könnte sich hierbei um Enzyme handeln, die nicht direkt auf der Oberfläche adsorbiert sind sondern mit einem dort bereits anhaftendem Protein ein Aggregat gebildet haben und in ihrer Konformation relativ unverändert geblieben sind. Da die Mengen an adsorbierter GOx auf diesen beiden Oberflächen vergleichsweise hoch sind (vgl. Abb. 5.21 und Tab. 5.8), sind offenbar die meisten der adsorbierten Enzyme gar nicht mehr aktiv und beeinflussen somit auch nicht den Wert der Michaelis-Menten-Konstante.

5.2.4. Sekundärstruktur

Die Sekundärstruktur des Enzyms in seiner nativen Konformation sowie als Oberflächenadsorbat wurde mit Hilfe der Infrarotspektroskopie anhand der FSD-aufgelösten Feinstruktur der Amid-I-Bande bestimmt. Die ermittelten Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente an der Gesamtstruktur der GOx sind in der Tabelle 5.9 zusammengefasst. Der Fehler der prozentualen Werte liegt im Bereich von $\pm 1 - 3$ %, die Wellenzahlengenauigkeit der Bandenlage beträgt etwa ± 2 cm^{-1} . Die Bandenzuordnung erfolgte anhand von Literaturangaben [80, 81]. Eine Besonderheit der Amid-I-Bande von GOx ist jedoch, dass in den meisten Spektren eine Komponente unterhalb von 1620 cm^{-1} sichtbar ist, die keinem Sekundärstrukturelement zuzuordnen ist, sondern durch die Absorption der aromatischen Aminosäureseitenketten His, Phe, Tyr und Trp verursacht wird (vgl. Tab. 5.10).

Die IR-spektroskopisch ermittelte native Konformation stimmt mit 37 % α -Helix und 21 % β -Faltblatt recht gut mit den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse überein. Nach Hecht et al. besteht die native Struktur der GOx zu 34 % aus α -Helices und zu 23 % aus β -Faltblättern [124]. Die Strukturanalyse der oberflächengebundenen GOx er-

Tab. 5.9.: Sekundärstruktur von GOx auf homogen beschichteten Oberflächen.

Beschichtung	α -Helix		β -Faltblatt		β - und γ -Schleifen		ungeordnet	
	[%]	[cm ⁻¹]	[%]	[cm ⁻¹]	[%]	[cm ⁻¹]	[%]	[cm ⁻¹]
nativ	37	1654	21	1627, 1678	14	1669, 1693	28	1640
DDT	25	1653	29	1630, 1677	21	1663, 1692	25	1642
PyUDT	23	1655	34	1630, 1678	18	1665, 1694	25	1644
AUDT	26	1655	28	1628, 1677	18	1665, 1691	28	1642
MDDS	23	1653	33	1632, 1679	16	1665, 1696	24	1643
PAH	25	1652	26	1627, 1674	25	1662, 1681, 1689	24	1640
PEI	24	1654	29	1629, 1675	20	1665, 1690	27	1642
PVP	21	1654	37	1625, 1633, 1674	20	1665, 1683	22	1643
PSS	22	1655	33	1631, 1678	18	1666, 1695	27	1644

gibt, dass der Anteil an α -Helix im Vergleich zur nativen Konformation in jedem Fall deutlich gesunken ist, wohingegen der Anteil an β -Faltblatt ebenso deutlich zugenommen hat. Die Abbildung 5.26 zeigt die Korrelation zwischen der spezifischen Enzymaktivität und den prozentualen Anteilen des jeweiligen Sekundärstrukturelements. Dabei ist der nahezu lineare Abfall der Aktivität mit steigendem Anteil an β -Faltblattstrukturen noch deutlicher ausgeprägt als der Zusammenhang zwischen Aktivität und dem Anteil an α -helicalen Elementen. Man findet die geringsten Anteile an β -Faltblättern mit rund 28 % auf positiv geladenen Oberflächen, auf denen die GOx auch die höchste Aktivität aufweist. Dann steigt der Anteil an β -Faltblatt auf der hydrophoben, ungeladenen DDT-Beschichtung leicht an, um auf der negativ geladenen Oberfläche MDDS bereits 33 % und auf den aromatischen Oberflächen PVP und PyUDT schließlich 34 bzw. 36 % zu erreichen. PSS ist sowohl aromatisch als durch die Sulfonsäuregruppe auch negativ geladen und nimmt daher eine Sonderstellung zwischen den Oberflächenbeschichtungen ein, die das Enzym über Coulomb- und van-der-Waals-Wechselwirkungen beeinflussen, sowie den Oberflächenbeschichtungen die das Enzym hauptsächlich durch aromatische π - π -Wechselwirkungen beeinflussen. Die schwach positive Ladung der PVP-Beschichtung scheint sich weder auf die enzymatische Aktivität der GOx noch auf ihre Struktur als Adsorbat wesentlich auszuwirken.

Tab. 5.10.: Absorptionen der aromatischen Aminosäureseitengruppen im Amid-I-Bereich in D₂O [140].

Aminosäure	Wellenzahl [cm ⁻¹]	Zuordnung der Schwingung
Histidin (His)	1600 – 1623	C-C _{ar} (ν)
Phenylalanin (Phe)	≈ 1607	C-C _{ar} (ν)
Tyrosin (Tyr)	1612 – 1618	C-C _{ar} (ν); C-H (δ)
Tryptophan (Trp)	≈ 1618	C-C _{ar} (ν)

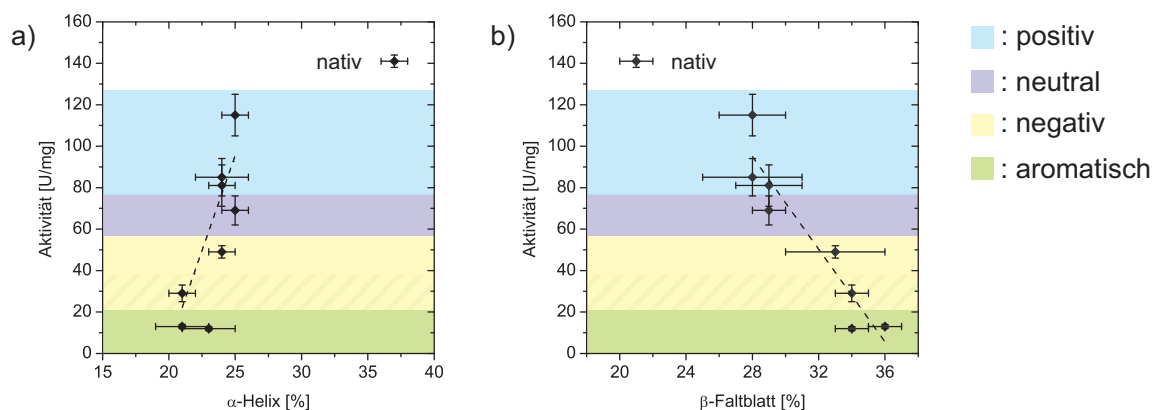


Abb. 5.26.: Korrelation der spezifischen Aktivität von adsorbierter GOx mit dem Anteil an a) α -Helix und b) β -Faltblatt. Der jeweils oberste Datenpunkt entspricht der nativen Konformation in Lösung bei $c = 100$ ng/ml und wurde für die lineare Anpassung (gestrichelte Linie) nicht berücksichtigt. Die farbige Unterteilung der Graphen bezieht sich auf die Eigenschaften der Oberflächen, auf denen das Enzym adsorbiert ist.

Um den Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität genauer erläutern zu können, ist es wichtig, sowohl die Verteilung der einzelnen Sekundärstrukturelemente, als auch die Verteilung basischer, saurer und hydrophober Aminosäuren innerhalb des Enzymmoleküls zu kennen. Die Abbildung 5.27 a) zeigt, dass die Bindungstasche hauptsächlich von ungeordneten Strukturen sowie einer Gruppe von β -Faltblattsträngen umgeben ist. In dem Bereich, in dem die beiden Untereinheiten über eine Reihe von Kohlenhydraten (blau markiert) miteinander verknüpft werden, finden sich jedoch überwiegend α -Helixsegmente, so dass man davon ausgehen kann, dass eine partielle Auflösung dieser Helixstrukturen die Wechselwirkung zwischen den beiden Enzymuntereinheiten empfindlich stört. Akhtar et al. konnten zeigen, dass die Dimerstruktur der GOx in hochkonzentrierten Lösungen divalenter Kationen aufgelöst wird und das Enzym hierbei seine Aktivität nahezu voll-

ständig verliert [127]. Ihrer Vermutung zu folge verliert das FAD im Monomeren des Enzyms seine Verankerung und kann sogar aus diesem heraus gelöst werden. Wird die Wechselwirkung der beiden GOx-Untereinheiten also durch konformative Veränderungen beeinträchtigt, so wird sich hieraus ein Aktivitätsverlust des Enzyms ergeben.

Betrachtet man die Abbildung 5.27 b), so wird klar, dass sowohl die sauren und hydroxyli-schen Aminosäuren (gelb), als auch die hydrophoben Aminosäuren (violett) sehr gleich-mäßig über die Proteinstruktur verteilt sind. Demnach sind nur vergleichsweise geringe strukturelle Veränderungen nötig, um attraktive Wechselwirkungen zu positiv geladenen (PAH, PEI, AUDT) bzw. hydrophoben (DDT) Oberflächen ausbilden zu können. Da sich die basischen Aminosäuren (hellblau) hauptsächlich im Kern des Enzymmoleküls befinden bzw. diesem zugewandt sind, müssen sich größere Teile der Proteinstruktur auflösen um diese Aminosäurereste zur Oberfläche hin ausrichten zu können.

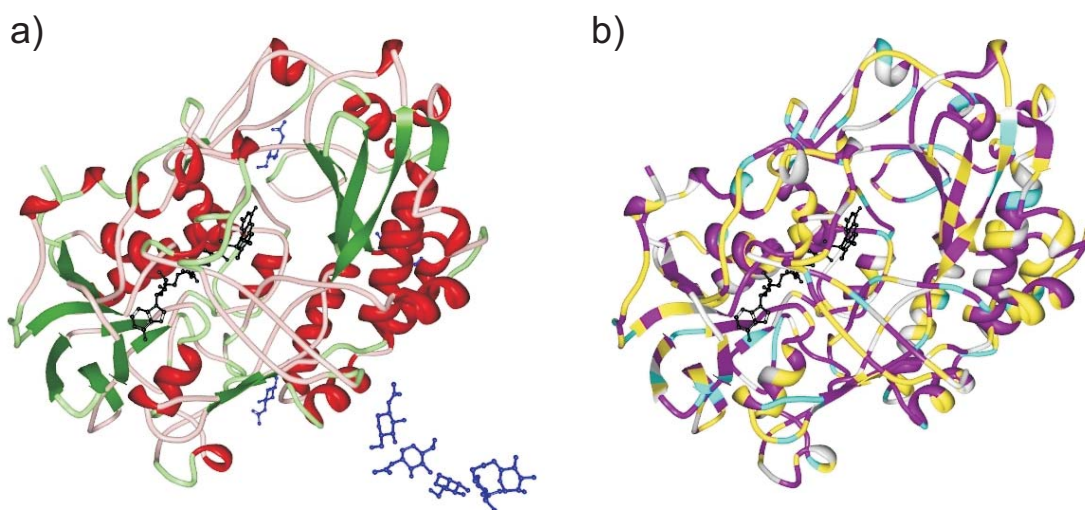


Abb. 5.27.: Sekundärstruktur der GOx und Verteilung der Aminosäuren innerhalb der Struktur [125]. a) α -Helices sind rot, β -Faltblätter grün, ungeordnete Strukturen hellrot und Schleifen hellgrün dargestellt. Das FAD ist schwarz eingezeichnet, die blau markierten Moleküle sind Kohlenhydrate, die die Dimerstruktur zwischen den beiden Untereinheiten der GOx stabilisieren. b) Die sauren Aminosäureseitenketten Asp und Glu, sowie die hydroxylicen Seitenketten Tyr, Ser und Thr sind gelb, die hydrophoben Seitenketten Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp sowie Met violett, die basischen Seitenketten Lys, Arg und His hellblau gekennzeichnet.

Die Ausbildung von Faltblattstrukturen infolge der Absorption auf negativ geladene und aromatische Oberflächen lässt sich damit erklären, dass in einem β -Faltblatt schon die Seitenkette jeder zweiten Peptidgruppe wieder in die gleiche Richtung zeigt, wohingegen eine vollständige Windung einer α -Helix 3.6 Peptidbindungen umfasst [166]. Somit erlaubt ei-

ne β -Faltblattstruktur zum einen mehr Kontaktpunkte zwischen Aminosäureseitenketten und einer Oberfläche, was für die Kombination von positiv geladenen AS-Seitenketten und negativ geladenen Oberflächen vorteilhaft ist, da in der Struktur von GOx nur wenige positiv geladene AS vorkommen. Die Ausbildung möglichst vieler π - π -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen AS-Resten und den aromatischen Oberflächenbeschichtungen PyUDT und PVP erfordert außerdem eine gewisse Ausrichtung der aromatischen AS-Seitenketten bezüglich der Oberfläche, die in einem β -Faltblatt besser gewährleistet ist, als in einer α -Helix.

Die β -Faltblattstruktur wird durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen C=O- und NH-Gruppen verschiedener Polypeptidstränge stabilisiert. Werden diese Wasserstoffbrücken ganz oder teilweise gebrochen, weil sich ein β -Faltblatt beispielsweise zu einer Oberfläche hin ausrichtet, so erhöht dies die Elektronendichte in der C=O-Gruppe, was die leichte Blauverschiebung der niederfrequenten β -Faltblattbande mit wachsendem Anteil an β -Faltblattstrukturen erklären könnte. Eine besondere Auffälligkeit zeigt das FSD-Spektrum der GOx auf PVP. Hier werden im niederfrequenten Bereich der β -Faltblatt-Absorptionen zwischen 1620 und 1635 cm^{-1} zwei Banden aufgelöst. Das Aufspalten der niederfrequenten β -Faltblattbande findet man häufig in Proteinen mit einem hohen Anteil dieses Sekundärstrukturelements und wird damit erklärt, dass es sich hierbei um die Absorptionen parallel bzw. antiparallel verlaufender β -Faltblattstränge handelt [80]. Eine genaue Zuordnung ist aber offenbar nicht möglich.

Die Lage der α -Helixbande ist innerhalb der Fehlergrenzen in allen Fällen relativ ähnlich. Lediglich das Proteinadsorbat auf PAH zeigt hier ein leicht rotverschobenes Bandenmaximum. Literaturangaben zufolge ist dies ein weiteres Indiz für den höheren Hydratwassergehalt der GOx-Schicht auf PAH, da zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen vom Hydratwasser zu den Peptidbindungen der α -Helix die Elektronendichte in den C=O-Gruppen reduzieren und sich deren Schwingungsfrequenz schließlich zu kleineren Wellenzahlen verschiebt.

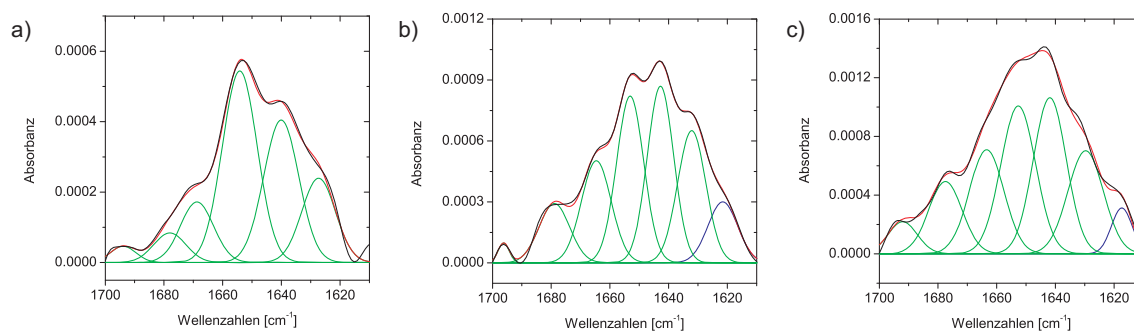


Abb. 5.28.: FSD-Spektren der a) nativen GOx im Vergleich zum Adsorbat auf b) MDDS und c) DDT. Die schwarze Kurve ist das Original der entfalteten Amid-I-Bande, die rote Bande der kumulative Fit der grünen Gaußkurven. Die Aromatenbande in den FSD-Spektren der GOx auf MDDS und DDT ist jeweils blau eingezeichnet.

Die Aromatenbande erscheint in allen FSD-Spektren mit Ausnahme der nativen Konformation sowie den Adsorbaten auf PAH und AU DT. Ihr durchschnittliches Bandenmaximum liegt bei 1617 cm^{-1} und sie trägt mit 2.5 – 6 % zur Gesamtfläche der Amid-I-Bande bei. Auf MDDS hat der Aromatenpeak mit 1621 cm^{-1} ein deutlich höherfrequentes Maximum und ist mit einem Flächenanteil von 6 % im Vergleich zu allen anderen Spektren auch am stärksten ausgeprägt (Abb. 5.28 b)). Ursächlich hierfür könnte eine gerichtete Anordnung von positiv geladenen His-Resten des Enzyms bezüglich der negativ geladenen Oberfläche sein. Im Gegensatz zur IRRA-Spektroskopie sind in der ATR-Konfiguration mit Bezug auf die Einfallsebene sowohl parallel als auch senkrecht gerichtete Schwingungen spektroskopisch zugänglich, jedoch ist auch die ATR-Spektroskopie orientierungssensitiv. Die Amplitude der elektrischen Feldkomponente parallel zur Einfallsebene ist unter den gegebenen experimentellen Bedingungen (Kristallmaterial ist Silicium mit $n = 3.4$, Einfallswinkel ist 45°) etwa 1.15 x höher als die Feldamplitude senkrecht zur Einfallsebene (vgl. Gl. 3.16). Ist nun die Orientierung der His-Reste zur Oberfläche nicht mehr statistisch verteilt sondern so ausgerichtet, dass die aromatischen C-C-Moden senkrecht bezüglich der Grenzfläche zwischen Reflexionselement und Probenflüssigkeit und damit parallel zur Einfallsebene des IR-Strahls schwingen, sollte die entsprechende Schwingungsbande im Spektrum auch stärker sichtbar sein. Ähnliches findet man im FSD-Spektrum der GOx auf DDT (Abb. 5.28 c)). Auch hier ist die Aromatenbande mit 5 % Flächenanteil sehr deutlich ausgeprägt, allerdings tragen hier offenbar hauptsächlich Tyr- und Trp-Reste zur spektralen Intensität bei, da das Peakmaximum bei etwa 1618 cm^{-1} liegt. Dies könnte auf eine starke hydrophobe Wechselwirkung zwischen Tyr- und Trp-Resten mit der Oberfläche zurückzuführen sein.

5.3. Glucose Oxidase auf nano-strukturierten Oberflächen

5.3.1. Optimierung der strukturierten Oberflächen

Die kolloidale Lithographie stellt, wie unter Abschnitt 5.1.4 beschrieben wurde, keine geeignete Methode dar, um einzelne Proteine großflächig und selektiv auf strukturierten Oberflächen abzulegen. Daher wurden letztendlich Monolagen aus monodispersen Goldpartikeln auf Silicium als strukturierte Substrate verwendet. Die Abbildung 5.29 zeigt schematisch das Gesamtkonzept zur Präparation von nanostrukturierten Oberflächen zur gezielten Proteinadsorption ausgehend von AuNP-Monolagen.

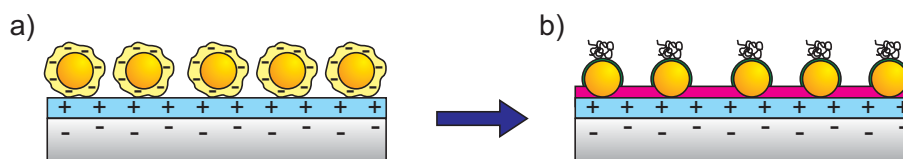


Abb. 5.29.: AuNP-Monolagen zur gezielten Proteinadsorption. a) Die citratstabilisierten AuNP werden auf ein positiv geladenes funktionalisiertes Siliciumsubstrat adsorbiert. b) Die AuNP müssen in ein proteinresistentes Matrixmaterial (magenta) eingebettet werden und können vor der Proteinadsorption zusätzlich mit Hilfe von Thiolen (grün) chemisch modifiziert werden.

Die AuNP können in verschiedenen Größen durch Reduktion von HAuCl_4 mit Natriumcitrat synthetisiert werden und sind infolge des Herstellungsprozesses von einer negativ geladenen Citrathülle umgeben. Daher ist es naheliegend, die negativ geladenen AuNP auf eine positiv geladene Oberfläche elektrostatisch zu adsorbieren. Dies erfordert wiederum eine Funktionalisierung des Siliciumsubstrats, welches an sich ein negatives Oberflächenpotential aufweist. Die gängigen, literaturbekannten Methoden sind hierfür die elektrostatische Beschichtung des Substrats mit einem positiv geladenen Polyelektrolyten oder die kovalente Anbindung eines aminoterminierten Silans [14, 15]. Die Abbildung 5.30 zeigt REM-Bilder von 20 nm AuNP, die auf a) APTES, sowie die Polyelektrolyte b) PVP, c) PEI und d) PAH adsorbiert wurden. Die Bedeckungsdichte beträgt dabei auf APTES $20 \pm 3 \%$, auf PVP $12 \pm 1 \%$ und auf PAH $35 \pm 1 \%$. Die PEI-Beschichtung induziert eine Aggregation der Partikel. Im Hinblick auf die Oberflächenbedeckung mit AuNP stellt PAH auf Silicium also das optimale Substrat dar, die APTES-Beschichtung wäre auch noch akzeptabel.

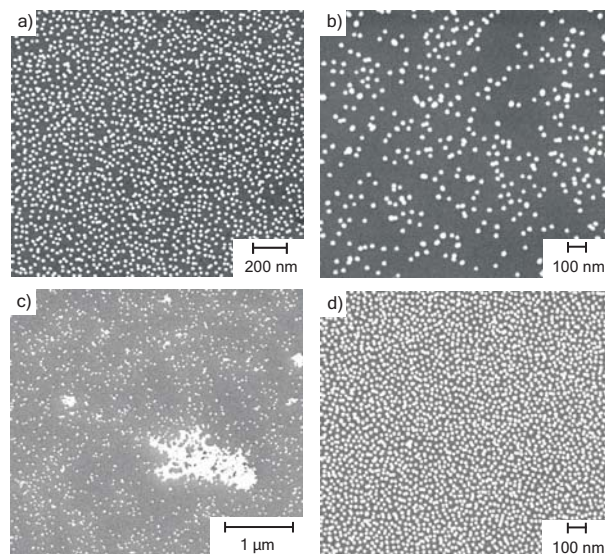


Abb. 5.30.: 20 nm AuNP auf verschiedenen Oberflächenbeschichtungen: a) APTES, b) PVP, c) PEI und d) PAH jeweils auf Silicium.

Die AuNP-Schichten müssen noch in ein proteinresistentes Matrixmaterial eingebettet werden um zu gewährleisten, dass die Proteine nur auf den Partikeln adsorbieren. Die radikalische Polymerisation von PEGMA an aminosilanfunktionalisierten Glas- und Halbleitersubstraten ist beispielsweise eine zuverlässige Methode um Oberflächen gegenüber Proteinadsorption zu passivieren [167]. Bei einem minimalen AuNP-Durchmesser von etwa 11 nm sollte die PEGMA-Schicht ungefähr 5 nm dick sein, um einerseits eine unspezifische Proteinadsorption in der Umgebung der AuNP zu unterbinden, andererseits aber ausreichend Partikeloberfläche für eine selektive Proteinadsorption frei zu lassen. Stadler et. al konnten zeigen, dass die Schichtdicke des Polymerfilms linear von der Monomerkonzentration in der Reaktionslösung abhängig ist [168]. Bei einem Monomergehalt von 0.5 vol % gelang es auf unstrukturierten, APTES-funktionalisierten Substraten reproduzierbar proteinresistente PEGMA-Schichten von etwa 5 nm zu polymerisieren. Die REM-Aufnahmen in Abbildung 5.31 zeigen jedoch deutlich, dass die Methode in Kombination mit AuNP-beschichteten Substraten ungeeignet ist, da es während der Polymerisationsreaktion zu einer Aggregation der Partikel auf der Oberfläche kommt. Ferner legen AFM-Aufnahmen die Vermutung nahe, dass die PEGMA-Ketten entlang der Partikel schneller wachsen, als zwischen den Partikeln, da die freien Kugelsegmente der 11 nm AuNP lediglich eine Höhe von etwa 1 nm aufweisen, obwohl etwa 5 nm zu erwarten wären. Ursächlich hierfür könnten Kapillarkräfte sein, die während der Polymerisationsreaktion Monomermoleküle in Richtung der Partikel dirigieren. Schlußendlich war damit aber die freie Partikeloberfläche zu klein um noch Protein adsorbieren zu können.

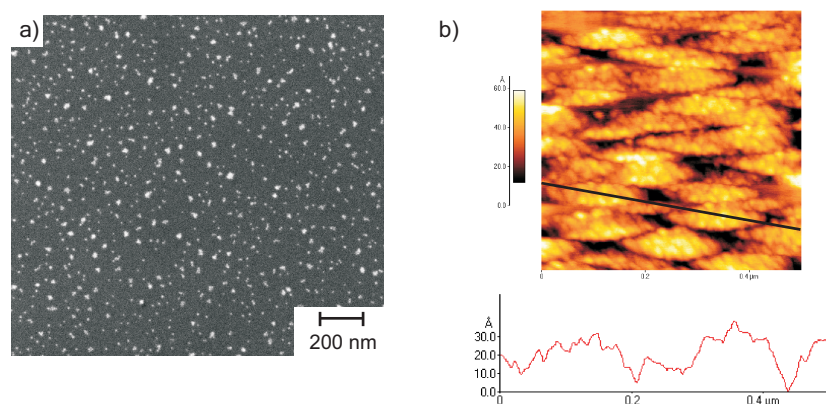


Abb. 5.31.: 11 nm AuNP in PEGMA-Matrix.

Die von Kenausis et al. bzw. Huang et al. vorgestellten PEG-PLL-Copolymere bieten mit ihrem kationischen Poly-L-Lysin-Rückgrat eine relativ simple Möglichkeit, durch elektrostatische Adsorption auf oxidische Substrate diese proteinabweisend zu beschichten [22, 23]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für die vorliegende Arbeit ein PEG-Copolymer mit einem Poly(acrylsäure)-Rückgrat synthetisiert. Die Poly(acrylsäure) deprotoniert in wässriger Lösung, so dass das Copolymer (PAA-PEG2000) negativ geladen ist und an eine positiv geladene Oberfläche adsorbiert werden kann. Die proteinresistenten Eigenschaften von PAA-PEG2000 auf APTES, PVP, PEI und PAH wurden mit Hilfe der Ellipsometrie untersucht. Wie aus Abbildung 5.32 hervorgeht, betragen die Schichtdicken des Copolymers $8.5 \pm 0.3 \text{ \AA}$ auf APTES, $4.2 \pm 0.2 \text{ \AA}$ auf PVP, $10.9 \pm 0.3 \text{ \AA}$ auf PEI und $24.8 \pm 0.2 \text{ \AA}$ auf PAH. Nach einstündiger Inkubation der Proben mit GOx steigt die Schichtdicke auf APTES um $2.6 \pm 0.3 \text{ \AA}$ und auf PVP sogar um $9.8 \pm 0.2 \text{ \AA}$. Auf diesen Oberflächen ist die Schichtdicke des PAA-PEG2000 Polymers offenbar zu dünn um proteinresistentes Verhalten aufzuweisen. Auf PEI und PAH sinkt die Schichtdicke jedoch leicht um $1.5 \pm 0.3 \text{ \AA}$ bzw. $4.6 \pm 0.3 \text{ \AA}$. Demnach ist PAA-PEG2000 nur auf PEI und PAH als proteinabweisendes Matrixmaterial zur Einbettung der AuNP geeignet. Da, wie oben erwähnt, die AuNP infolge der Adsorption auf PEI stark aggregieren, auf PAH jedoch homogene Monolagen mit einer guten Bedeckungsdichte ausbilden, kommt letztendlich nur die Kombination von AuNP und PAA-PEG2000 auf PAH zur Präparation nanoskaliger Proteinadsorptionsplätze in Frage.

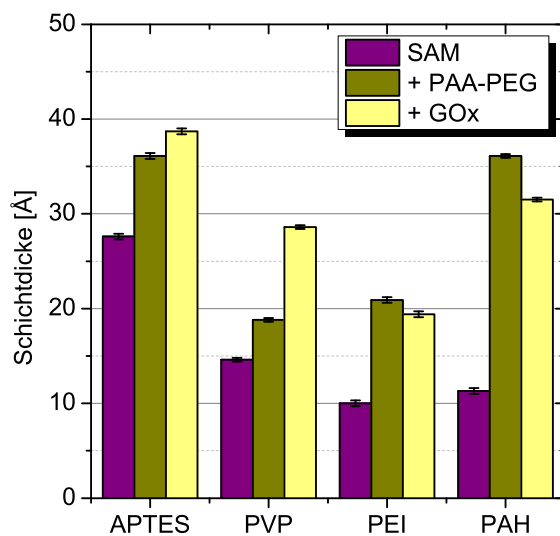


Abb. 5.32.: Ellipsometrische Untersuchung der proteinabweisenden Eigenschaften von PAA-PEG2000 auf verschiedenen kationischen Oberflächenbeschichtungen.

Die AuNP wurden in 4 unterschiedlichen Grössen synthetisiert und auf PAH abgeschieden. Die Auswertung der REM-Aufnahmen (Abb. 5.33) ergab für die AuNP mit einem Durchmesser von 11 ± 2 nm eine Oberflächenbedeckung von 22 ± 2 %. Die Bedeckungsdichte der 20 ± 3 nm bzw. 33 ± 4 nm grossen AuNP betrug 35 ± 1 % und die AuNP mit einem Durchmesser von 40 ± 5 nm konnten mit einer Dichte von 31 ± 1 % abgeschieden werden. Auf den REM-Bildern ist auch gut zu erkennen, dass mit zunehmendem Partikeldurchmesser einerseits die Grössenverteilung der Partikel schlechter wird und diese auf der Oberfläche auch stärker zur Aggregation neigen.

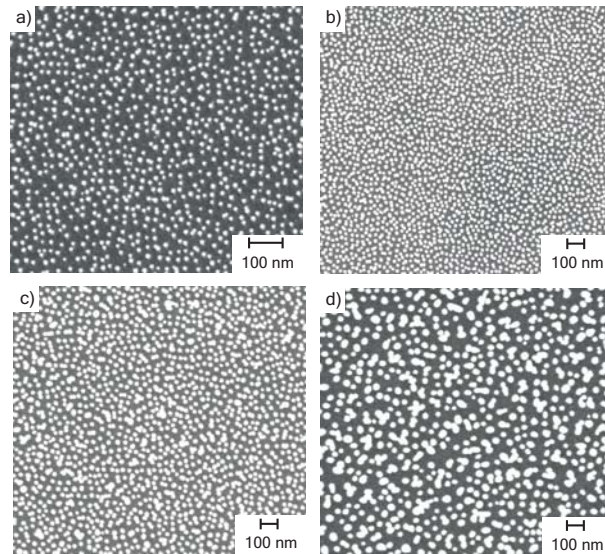


Abb. 5.33.: AuNP verschiedener Grösse auf PAH: a) 11 ± 2 nm, b) 20 ± 3 nm, c) 33 ± 4 nm, d) 40 ± 5 nm.

Vor der Proteinadsorption wurden die AuNP zusätzlich mit den Thiolen DDT, PyUDT, AUDT und MDDS chemisch modifiziert. So ist eine direkte Vergleichbarkeit von Aktivitäts- und Strukturdaten mit denen der GOx-Adsorbate auf homogen beschichteten, planaren Goldoberflächen möglich.

5.3.2. Quantifizierung

Um die theoretische Adsorptionsfläche, die den GOx-Molekülen auf einem AuNP mit einem bestimmten Durchmesser zur Verfügung steht, angeben zu können, muss man die Oberfläche des Kugelsegments berechnen, welches nach Einbettung der AuNP in die PAA-PEG2000-Matrix frei bleibt. Allgemein kann man die Oberfläche A_{KK} einer solchen Kugelkalotte über den Radius r der Kugel und den Öffnungswinkel α des Segments berechnen:

$$A_{KK} = 2 \cdot r^2 \cdot \pi \cdot \left(1 - \cos \frac{\alpha}{2}\right)$$

Mit Hilfe des Satzes von Pythagoras vereinfacht sich dies weiter zu

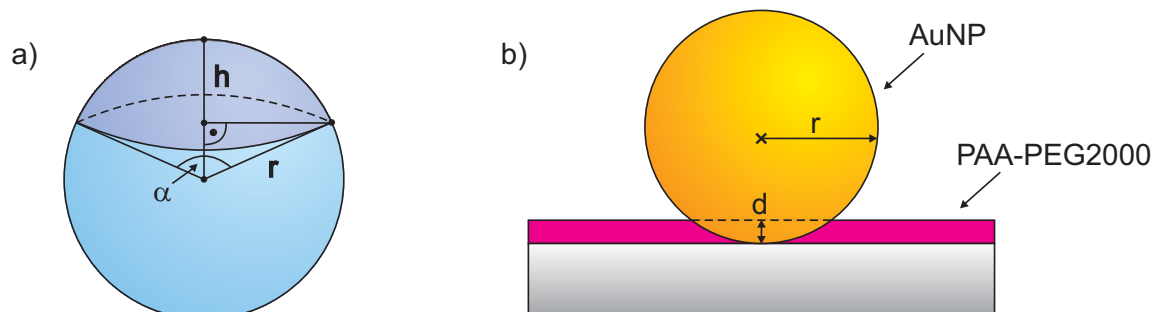


Abb. 5.34.: Berechnung der effektiven Adsorptionsfläche auf AuNP-strukturierten Oberflächen. a) Allgemeine Berechnung der Oberfläche einer Kugelkalotte. b) Die freie Adsorptionsfläche A_{ad} ist gleich der Gesamtoberfläche des Partikels abzüglich der Oberfläche des Kugelsegments, dessen Höhe durch die Schichtdicke d des PAA-PEG2000-Films bestimmt wird.

$$A_{KK} = 2 \cdot r \cdot h \cdot \pi$$

wobei hier nun h die Höhe des Kugelsegments ist. Die freie Adsorptionsfläche A_{ad} eines eingebetteten AuNP mit dem Radius r ergibt sich folglich aus der Differenz seiner gesamten Kugeloberfläche und der Oberfläche des Kugelsegments, dessen Höhe durch die Schichtdicke d des PAA-PEG2000-Films bestimmt wird:

$$A_{ad} = 2 \cdot r \cdot \pi \cdot (2 \cdot r - d) \quad (5.6)$$

Betrachtet man nun ein GOx-Molekül als einen Quader mit den Kantenlängen $6.75 \times 13.5 \times 21.64$ nm, so beträgt die durchschnittliche Fläche, die das native Enzym zur Adsorption benötigt etwa 195 nm^2 . Nun kann man die maximale Anzahl an GOx-Molekülen, die pro AuNP eines bestimmten Durchmessers adsorbieren können $n_{\max}(\text{GOx})/\text{AuNP}$ und folglich auch die maximale Adsorbatmenge pro Quadratzentimeter $m_{\max}(\text{GOx})/\text{cm}^2$ des strukturierten Substrats berechnen. Die Ergebnisse dieser Überlegungen sind der Tabelle 5.11 zu entnehmen. Daraus wird klar, dass lediglich auf den 11 nm AuNP die Möglichkeit besteht, nur ein einzelnes GOx-Molekül abzulegen. Bei allen anderen Partikelgrößen ist eine Adsorption mehrerer Enzyme pro Partikel zu erwarten. Die bedeckte Fläche eines Partikels liegt bei der jeweiligen Maximalbedeckung mit GOx für die 11 nm AuNP bei 66 %, für die 20 nm AuNP bei 89 %, sowie für die 33 nm und 40 nm AuNP bei 99 %. Man könnte also davon ausgehen, dass sich die adsorbierten Enzyme zumindest auf den größeren Partikeln gegenseitig in ihrer nativen Konfor-

mation stabilisieren. Der Fehler dieser Abschätzungen liegt allerdings im Bereich von $\pm 20 - 30 \%$, so dass hier keine verlässliche Aussage getroffen werden kann.

Tab. 5.11.: Theoretische Adsorptionsfläche auf AuNP-strukturierten Oberflächen.

$2 \cdot r$ [nm]	11 ± 2	20 ± 3	33 ± 4	40 ± 5
A_{ad} [nm²]	294 ± 53	1100 ± 165	3162 ± 383	4712 ± 589
Bedeckung [%]	22 ± 2	35 ± 1	35 ± 1	31 ± 1
AuNP/cm²	$(18 \pm 4) \cdot 10^{10}$	$(9 \pm 1) \cdot 10^{10}$	$(3 \pm 1) \cdot 10^{10}$	$(2 \pm 0.5) \cdot 10^{10}$
$n_{max}(GOx)/AuNP$	1 ± 1	5 ± 1	16 ± 2	24 ± 3
$m_{max}(GOx)/cm^2$ [ng]	39 ± 9	98 ± 18	105 ± 37	105 ± 29

Die tatsächlichen, mit Hilfe eines ELISA ermittelten, Adsorbatmengen und die daraus resultierenden Belegungen der AuNP mit Enzymmolekülen $n_{exp}(GOx)/AuNP$ sind in Tabelle 5.12 den theoretisch errechneten Maximalwerten $n_{theor}(GOx)/AuNP$ gegenüber gestellt. Innerhalb der Fehlergrenzen liegt die Menge an adsorbierter GOx auf den 11 nm und 20 nm AuNP im Bereich der Maximalbedeckung, auf den 33 nm und 40 nm AuNP darunter. Auf den PyUDT-beschichteten 11 nm, 20 nm und 33 nm AuNP sowie auf den AUDT-beschichteten 33 nm AuNP adsorbiert signifikant weniger Protein, als auf den entsprechenden DDT- und MDDS-modifizierten Partikeln. Auf den MDDS-beschichteten Partikeln ist die Proteindichte hingegen mit Ausnahme der 40 nm AuNP am höchsten. Die Abhängigkeit der Adsorbatmenge von der chemischen Beschaffenheit der Partikeloberfläche ist somit im Vergleich zu den homogen beschichteten Substraten eine völlig andere. Auf planaren Oberflächen betrug die Proteinmenge auf PyUDT und AUDT etwa 35 % mehr als auf DDT und MDDS. Es ist also naheliegend, dass die gekrümmte Oberfläche der Partikel das Adsorptionsverhalten der GOx deutlich beeinflusst.

Der ELISA ist jedoch auf den strukturierten Substraten mit einem deutlich größeren Fehler behaftet, als auf den homogen beschichteten Substraten. Die Blindwerte, um die die quantifizierten Mengen korrigiert wurden, lagen bei bis zu 25 % der absoluten Mengen an GOx-Adsorbat (homogene Beschichtungen: max. 15 %, vgl. Abb. 5.20). Ursächlich hierfür ist zum einen sicherlich die nachlassende Proteinresistenz der PAA-PEG2000-Matrix während die Proben für den ELISA insgesamt etwa 2 Tage lang in Proteinlösung inkubiert und mehrfach mit PBS gewaschen werden. Dies führt zusätzlich zu einer unspezifischen Adsorption der Antikörper und damit zu einem höheren Messergebnis bei der Quantifizierung.

Tab. 5.12.: Quantifizierte Mengen von GOx auf AuNP-strukturierten Oberflächen.

Beschichtung	$2 \cdot r$ [nm]	c_{OF} [ng/cm ²]	$n_{exp}(GOx)/AuNP$	$n_{theor}(GOx)/AuNP$
DDT	11 ± 2	38 ± 4	1 ± 0.3	1 ± 1
	20 ± 3	68 ± 4	4.2 ± 0.7	5 ± 1
	33 ± 4	74 ± 5	12 ± 4	16 ± 2
	44 ± 5	96 ± 6	23 ± 6	24 ± 3
PyUDT	11 ± 2	22 ± 1	0.6 ± 0.1	1 ± 1
	20 ± 3	55 ± 4	3.4 ± 0.7	5 ± 1
	33 ± 2	59 ± 9	10 ± 3	16 ± 2
	44 ± 5	93 ± 13	22 ± 6	24 ± 3
AUDT	11 ± 2	47 ± 4	1.2 ± 0.3	1 ± 1
	20 ± 3	75 ± 16	5 ± 1	5 ± 1
	33 ± 2	59 ± 4	10 ± 3	16 ± 2
	44 ± 5	91 ± 13	22 ± 6	24 ± 3
MDDS	11 ± 2	51 ± 1	1.3 ± 0.3	1 ± 1
	20 ± 3	71 ± 4	4.3 ± 0.7	5 ± 1
	33 ± 2	92 ± 5	15 ± 5	16 ± 2
	44 ± 5	87 ± 2	21 ± 5	24 ± 3

Da die AuNP nur elektrostatisch und nicht kovalent an die darunterliegende PAH-Schicht gebunden sind, können sie unter Umständen ihren Adsorptionsplatz auf der Oberfläche noch verändern. REM-Aufnahmen vor und nach der Inkubation mit Proteinlösung zeigen, dass dies tatsächlich auch der Fall ist (Abb. 5.35). Die Entstehung von AuNP-Aggregaten auf der Oberfläche führt dazu, dass Teile der PAH-Beschichtung freigelegt werden, auf die folglich auch Antikörper unspezifisch adsorbieren können.

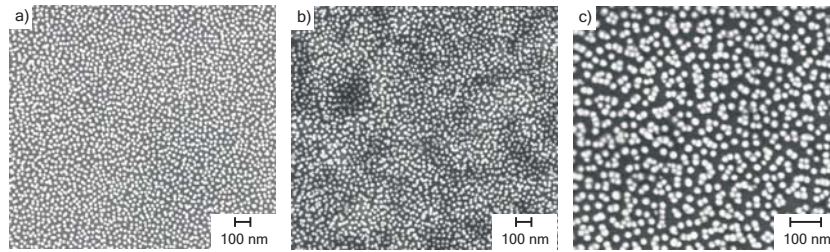


Abb. 5.35.: 20 nm AuNP-Submonolagen a) vor und b) bzw. c) nach der ELISA-Quantifizierung. Nach der ca. 2-tägigen Inkubation in Proteinlösung und dem wiederholten Waschen mit PBS bilden sich kleinere Partikelaggregate auf den Oberflächen. Die dunklen Flecken, die in b) zu erkennen sind, deuten ferner auf eine inhomogene Proteinadsorption hin.

5.3.3. Aktivität

Wie aus der Tabelle 5.13 hervorgeht ist die enzymatische Aktivität der adsorbierten GOx auf den AuNP-Submonolagen durchweg erheblich geringer, als der Referenzwert der nativen GOx in Lösung bei $c = 100 \text{ ng/ml}$. Weitestgehend unabhängig von der chemischen Modifizierung der AuNP liegt sie mit $A = 12 - 39 \text{ U/mg}$ etwa im Bereich der GOx-Aktivität auf den homogenen, aromatischen Beschichtungen PyUDT, PVP und PSS. Die etwas höheren Werte von $A = 30 \pm 2 \text{ U/mg}$, $39 \pm 6 \text{ U/mg}$ und $35 \pm 4 \text{ U/mg}$ auf den PyUDT-beschichteten 20 nm und 33 nm AuNP bzw. den AUDT-beschichteten 33 nm AuNP stechen insofern hervor, als dass auf diesen Proben auch die niedrigsten Adsorbatmengen gefunden wurden. Die PyUDT-Funktionalisierung liefert bei allen Partikeldurchmessern die höchste GOx-Aktivität.

Ursächlich für die geringe Aktivität der Enzymadsorbate auf den AuNP können im Wesentlichen 3 Gründe sein:

- Die optischen und elektronischen Eigenschaften von Metallnanopartikeln unterscheiden sich erheblich von denen eines Bulk-Metalls [169]. Im Gegensatz zum Bulk-Metall besetzen die Valenzelektronen in Metallnanopartikeln diskrete Energiezustände mit einer Bandlücke zwischen Valenz- und Leitungsband, deren Größe vom Partikeldurchmesser abhängig ist. Quinn et al. konnten für Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von etwa 1.6 nm 15 verschiedene Oxidationszustände nachweisen, denen Normalpotentiale von ca. - 1.4 V bis + 1.9 V zugeordnet werden konnten [170]. Demnach wäre es vorstellbar, dass die AuNP die Redoxreaktion der adsorbierten GOx beeinflussen. Der Elektronentransfer zwischen einem adsorbier-

Tab. 5.13.: Aktivität von GOx auf AuNP-strukturierten Oberflächen.

Beschichtung	$2 \cdot r$ [nm]	A [U/mg]	c_{OF} [ng/cm ²]
DDT	11 ± 2	13 ± 1	38 ± 4
	20 ± 3	22 ± 3	68 ± 4
	33 ± 4	17 ± 1	74 ± 5
	44 ± 5	14 ± 2	96 ± 6
PyUDT	11 ± 2	20 ± 1	22 ± 1
	20 ± 3	30 ± 2	55 ± 4
	33 ± 2	39 ± 6	59 ± 9
	44 ± 5	18 ± 3	93 ± 1
AUDT	11 ± 2	12 ± 1	47 ± 4
	20 ± 3	13 ± 4	75 ± 16
	33 ± 2	35 ± 4	59 ± 4
	44 ± 5	15 ± 3	91 ± 13
MDDS	11 ± 2	14 ± 5	51 ± 1
	20 ± 3	17 ± 3	71 ± 4
	33 ± 2	12 ± 3	92 ± 5
	44 ± 5	16 ± 2	87 ± 2

ten Redoxenzym und einer Elektrode in elektrochemischen Bioreaktoren geschieht normalerweise über sogenannte Mediatoren. Dem System wird eine weitere, elektrochemisch aktive Spezies mit einem adäquaten Potential zugesetzt, die zum katalytischen Zentrum des Enzyms diffundiert, dort Elektronen aufnimmt oder abgibt und schließlich zur Elektrode diffundiert, um dort entsprechend oxidiert oder reduziert zu werden. Im Falle von GOx haben sich Ferrocen Carboxylate als geeignete Mediatoren bewährt [171]. Allerdings kann der Elektronentransfer auch durch molekularen Luftsauerstoff geschehen, so dass eine elektrochemische Kommunikation zwischen der adsorbierten GOx und einem AuNP auch ohne weiteren Zusatz redoxaktiver Substanzen möglich wäre.

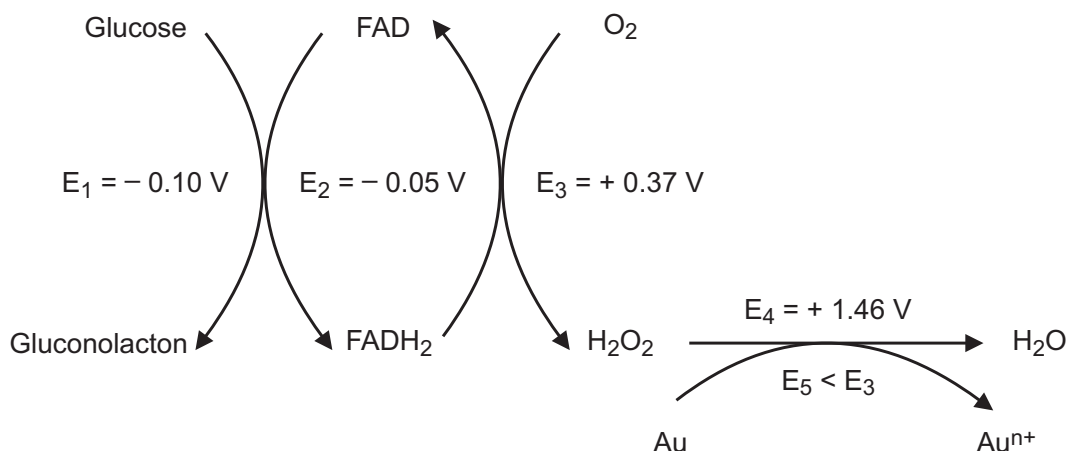


Abb. 5.36.: Teilreaktionen der GOx-katalysierten Oxidation von Glucose mit allen zugehörigen Redoxpotentialen und unter Berücksichtigung des zusätzlichen Redoxpaares Au/Au^{n+} . Die Potentiale bei pH 5.5 wurden mit Hilfe der Nernst Gleichung aus den entsprechenden Standardpotentialen berechnet bzw. direkt der Literatur entnommen [172–174].

Die Abbildung 5.36 zeigt alle beteiligten Redoxpaare mit ihren zugehörigen Potentialen bei pH 5.5. Der Wasserstoffperoxid würde im Kontakt mit Bulk-Gold katalytisch disproportionieren, da das Standardpotential $E(\text{Au}/\text{Au}^{3+})$ mit 1.18 V zwar kleiner als E_4 , aber größer als E_3 ist. Fällt E_5 nun unterhalb den Wert von E_3 wäre also eine Oxidation einzelner Goldatome des Nanopartikels möglich, was zur Folge hätte, dass der entstandene Wasserstoffperoxid nicht mehr detektiert werden kann und somit eine geringere enzymatische Aktivität gemessen würde. Das Szenario erfordert jedoch, dass der Abstand zwischen der Partikeloberfläche und dem katalytischen Zentrum der GOx sehr gering ist ($< 10 \text{ \AA}$), da die Elektronentransferrate exponentiell mit dem Abstand abfällt [175].

- Das GOx-Dimer hat eine Art Schmetterlingsstruktur. Die katalytischen Zentren liegen tief im Innern des Enzyms und die umgebenden Strukturen bilden eine Mulde, wie in der Abbildung 5.37 a) skizziert ist.

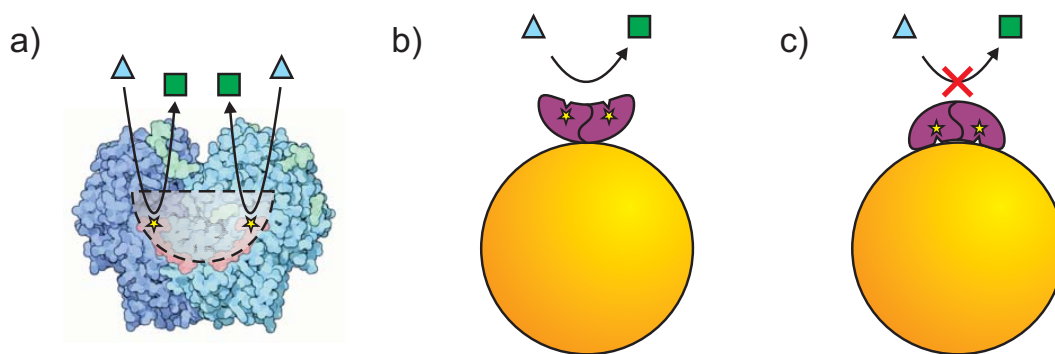


Abb. 5.37.: Die GOx kann in verschiedenen räumlichen Orientierungen relativ zu einem AuNP adsorbieren. a) Schmetterlingsstruktur des GOx-Dimers mit den beiden katalytischen Zentren (mit Sternen markiert) im Innern des Moleküls [125]. b) Adsorbiert das Enzym so, dass die Bindungstaschen für das Substrat (blaues Dreieck) zugänglich sind, bleibt seine Aktivität erhalten. c) Adsorbiert die GOx mit den Bindungstaschen gegen die Partikeloberfläche gerichtet, so kann keine enzymatische Aktivität mehr festgestellt werden.

Das Substrat muss von oben in die Mulde diffundieren, um zum katalytischen Zentrum zu gelangen. Die Abbildungen 5.37 b) und c) zeigen 2 Möglichkeiten, wie das Enzym auf ein AuNP adsorbieren kann. Dabei sind die katalytischen Zentren einmal für das Substrat zugänglich, einmal adsorbiert das Enzym so, dass die Bindungstaschen (als kleine Dreiecksausschnitte dargestellt) der Partikeloberfläche zugewandt sind und für das Substrat nicht zugänglich sind. Können nun im letztgenannten Fall besonders günstige Wechselwirkungen zwischen Enzym und Partikeloberfläche ausgebildet werden, so werden die Proteinmoleküle überwiegend auf diese Art adsorbieren. Daher kann keine, bzw. nur noch eine stark verminderte, enzymatische Aktivität nachgewiesen werden.

- Schließlich kann die GOx infolge der Adsorption auf die AuNP so stark denaturieren, dass das Substrat nicht mehr gebunden werden kann und das Enzym irreversibel seine Aktivität verliert. Zumindest über diesen Punkt kann die Analyse der Sekundärstruktur Aufschluss geben.

5.3.4. Sekundärstruktur

Wenn IR-Strahlung auf einen AuNP-Film trifft, führt dies zur Anregung einer kollektiven, resonanten Schwingung des Elektronengases der Partikel (Plasmonenresonanz). Dadurch

wird ein zusätzliches elektromagnetisches Feld zwischen den Partikeln, also parallel zur Substratoberfläche, erzeugt. Die IR-Absorptionen von Adsorbatmolekülen auf den AuNP werden auf diese Weise um ein Vielfaches verstärkt [176]. Dieser Verstärkungseffekt ist stark abhängig von der Morphologie der AuNP und dem Abstand zwischen ihnen. Infolge der Nahfeldwechselwirkung mit den angeregten Plasmonen erscheinen die Schwingungsbanden im Adsorbatspektrum nicht mehr in Form von Lorentz-Kurven, sondern sind umso stärker verzerrt, je dichter die AuNP gepackt sind. Wie bereits im Abschnitt 5.3.2 erwähnt, sind nun die AuNP-Submonolagen gegenüber der Proteinadsorption und dem nachfolgenden Waschprozedere nicht zu 100 % stabil und es bilden sich kleinere Partikelaggregate auf den Oberflächen (vgl. Abb. 5.35). Ergo werden sich die optischen Eigenschaften der mit AuNP modifizierten ATR-Kristalle während der Aufnahme von Referenz- und Probenpektrum deutlich unterscheiden, was letztendlich zu sehr schlechten Basislinien und stark asymmetrischen Banden führen kann, was deren Auswertung wiederum erschwert oder unmöglich macht. Die Spektren der adsorbierten GOx auf den 11 nm AuNP, sowie den AUDT-beschichteten 44 nm AuNP und den MDDS-beschichteten 33 nm AuNP waren deshalb auch nach mehrfacher Wiederholung der Messungen zu schlecht für eine sinnvolle Bestimmung der Sekundärstruktur. Die Ergebnisse der auswertbaren Spektren sind in der Tabelle 5.14 zusammengefasst.

Bis auf die PyUDT-modifizierten 20 nm und 33 nm AuNP zeigt die adsorbierte GOx einen Anteil an β -Faltblattstrukturen von über 30 %. Da bereits auf den homogen beschichteten Substraten ein β -Faltblattanteil von mehr als 30 % mit einer besonders niedrigen Enzymaktivität verbunden war, ist anzunehmen, dass für den Verlust an Aktivität auf den AuNP hauptsächlich eine starke Denaturierung verantwortlich ist. Da sich auf den AuNP die Sekundärstrukturanteile bei gleicher Thiolbeschichtung völlig von den Werten auf den entsprechend beschichteten planaren Goldsubstraten unterscheiden, muss die Topographie der AuNP-Filme die Ursache für diese starken konformativen Veränderungen sein. Die Oberflächenchemie spielt hier - wie auch bei der Menge an GOx, die auf die Partikel adsorbiert - eine untergeordnete Rolle.

Auf den homogenen DDT- bzw. AUDT-beschichteten Oberflächen bestimmen β -Faltblätter zu 29 % bzw. 28 % die Gesamtstruktur. Auf den strukturierten Substraten erhöhen sich diese Werte nun für DDT auf 31 % im Falle der 20 nm AuNP und steigt noch weiter mit größer werdendem Partikeldurchmesser auf 34 % bzw. 37 % im Falle der 33 nm und 44 nm AuNP. Ähnliche Zahlen findet man für AUDT, auch hier ist der β -Faltblattanteil bei den 33 nm Partikeln mit 35 % noch höher als bei den 20 nm Partikeln mit 31 %. Für MDDS sind die β -Faltblattstrukturen bei beiden Partikelgrößen, zu denen Spektren

Tab. 5.14.: Sekundärstruktur von GOx auf AuNP-strukturierten Oberflächen.

Beschichtung	d(AuNP) [nm]	α -Helix		β -Faltblatt		Schleifen		ungeordnet	
		[%]	[cm ⁻¹]	[%]	[cm ⁻¹]	[%]	[cm ⁻¹]	[%]	[cm ⁻¹]
DDT	20 ± 3	22	1656	31	1632, 1677	18	1666, 1687	29	1644
	33 ± 4	23	1656	34	1627, 1637, 1679	21	1667, 1679	22	1646
	44 ± 5	22	1657	37	1626, 1638, 1674	19	1667, 1684	22	1647
PyUDT	20 ± 3	24	1653	28	1629, 1677	23	1663, 1690	25	1641
	33 ± 4	22	1652	29	1628, 1674	25	1663, 1683	24	1641
	44 ± 5	22	1653	34	1631, 1677	22	1664, 1694	22	1643
AUDT	20 ± 3	22	1655	31	1631, 1678	22	1664, 1690	25	1643
	33 ± 4	23	1654	35	1630, 1679	13	1662, 1695	29	1644
	44 ± 5	–	–	–	–	–	–	–	–
MDDS	20 ± 3	21	1652	37	1625, 1635, 1672	24	1662, 1685, 1697	18	1643
	33 ± 4	–	–	–	–	–	–	–	–
	44 ± 5	22	1658	36	1629, 1677	13	1663, 1689	29	1644

ausgewertet werden konnten, mit 37 % und 36 % etwa gleich dominant. Trägt man die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente α -Helix und β -Faltblatt gegen die Partikelgröße auf, so kann man für die Faltblattstrukturen einen annähernd linearen Zusammenhang erahnen, für die helicalen Elemente ist dies nicht möglich. Eine Korrelation zwischen der spezifischen Enzymaktivität und den prozentualen Anteilen der beiden Sekundärstrukturelemente ist auf den strukturierten Substraten nicht erkennbar (Abb. 5.38).

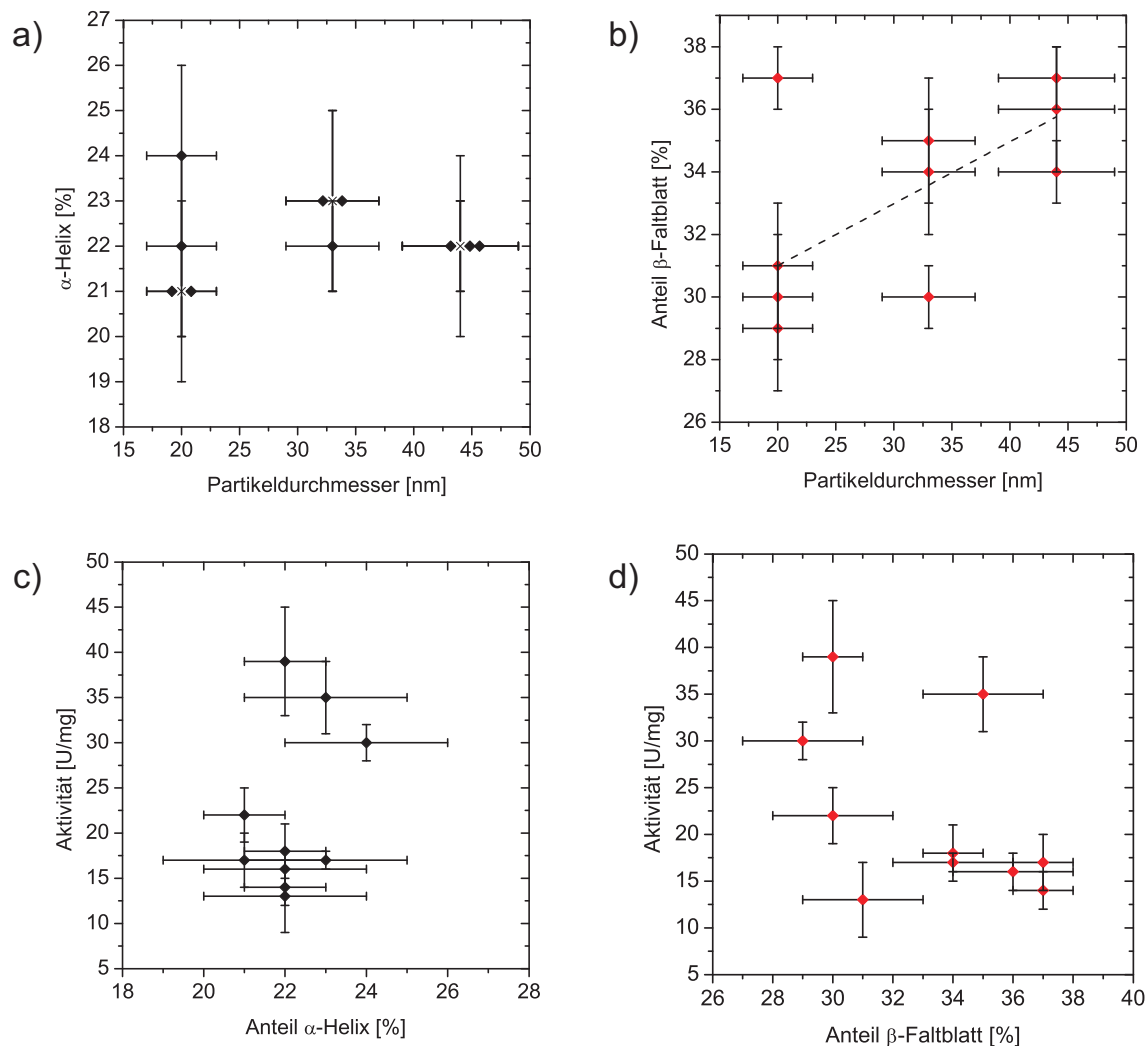


Abb. 5.38.: Korrelation des Partikeldurchmessers (a) und b)) bzw. der spezifischen Aktivität (c) und d)) von adsorbierter GOx mit dem Anteil an α -Helix und β -Faltblatt. Der Zusammenhang zwischen dem Anteil an β -Faltblättern und dem Partikeldurchmesser ist annähernd linear (gestrichelte Linie).

Die Denaturierung des Enzyms allein kann aber nicht den starken Aktivitätsverlust begründen. Auf den 20 nm und 33 nm PyUDT-beschichteten AuNP zeigt die GOx mit 24 % α -Helix und 28 % β -Faltblatt bzw. 22 % α -Helix und 29 % β -Faltblatt ähnliche Sekundärstrukturanteile wie auf den homogenen Beschichtungen mit DDT oder PEI. Trotzdem beträgt die enzymatische Aktivität hier nur 30 ± 2 U/mg bzw. 39 ± 6 U/mg im Vergleich zu 69 ± 7 U/mg bzw. 81 ± 10 U/mg. Im Gegensatz dazu liegt die Enzymaktivität auf den 33 nm AUDT-modifizierten AuNP mit 35 ± 4 U/mg im oberen Bereich der Werte, die auf den AuNP-Filmen gemessen wurden, obwohl die entsprechende Sekundärstruktur der GOx mit 23 % α -Helix und 35 % β -Faltblatt eine relativ stark denaturierte Konformation

anzeigt. Folglich liegt mit großer Wahrscheinlichkeit die Situation vor, dass das Enzym zum Teil derart auf die Partikel adsorbiert, dass die Substratbindungstaschen der Partikeloberfläche zugewandt und somit nicht mehr zugänglich sind (vgl. Abb. 5.37 c)). Die Tatsache, dass die Enzymaktivität wieder etwas steigt, sobald besonders wenig Adsorbat auf den AuNP vorhanden ist (20 nm und 33 nm PyUDT-AuNP bzw. 33 nm AUDT-AuNP) spricht weiterhin dafür, dass sich die GOx-Moleküle durch Aggregatbildung gegenseitig auf den Partikeln blockieren.

Eine signifikante Beeinflussung der Redoxreaktion durch die elektrochemische Natur der AuNP kann nicht ausgeschlossen werden. Jedoch lassen die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse darauf schließen, dass der starke Aktivitätsverlust der adsorbierten GOx auf den AuNP hauptsächlich auf massive konformative Veränderungen des Proteins zurückzuführen ist.

6. Zusammenfassung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Präparation und Charakterisierung von großflächig nanostrukturierten Substraten zur selektiven Adsorption einzelner GOx-Moleküle sowie der Untersuchung der enzymatischen Aktivität und Sekundärstruktur der adsorbierten GOx.

Kolloidale Lithographie

Ursprünglich sollten zur Präparation von nanoskaligen Adsorptionsplätzen für die GOx PS- und SiO₂-Partikelmonolagen auf Siliciumsubstraten als Masken zur kolloidalen Lithographie verwendet werden. Zum einen sollten dabei die partikelbedeckten Substrate mit einem dünnen Goldfilm bedampft und die Partikel anschließend wieder abgelöst werden, so dass ein poröser Goldfilm mit definierter Porengröße entsteht. Da die Größe der Poren in etwa dem Durchmesser eines GOx-Moleküls, also ca. 20 nm, entsprechen sollte, kamen als Kolloidmasken nur Monolagen aus 20 nm PS-Partikeln in Frage. Das Experiment scheiterte letztendlich daran, dass die Partikel nach der Goldbedampfung nicht mehr von den Oberflächen gelöst werden konnten. Die inversen Strukturen, bei denen die dreieckförmigen Zwischenräume zwischen Partikeln in hexagonal dichtest gepackten Monolagen als goldbedampfte Adsorptionsplätze ausgelegt werden sollten, konnten nur über sehr kleine Bereiche von etwa 1 x 1 µm in guter Qualität hergestellt werden. Da die nachfolgende Untersuchung adsorbierter Proteine mittels IR-Spektroskopie aber eine gleichmäßige Beschaffenheit der Probe über eine Fläche von etwa 1 x 1 cm erfordert, wurde auch diese Idee wieder verworfen. Die aussichtsreichsten Ergebnisse lieferte die Gasphasenabscheidung eines OEG-terminierten Silans auf die partikelbedeckten Substrate. Nach der Ablösung der Partikel wurden in der proteinresistenten Silanschicht kreisförmige Bereiche freigelegt, deren Durchmesser in etwa dem der verwendeten Partikel entsprach. AFM-Aufnahmen zeigten, dass es möglich ist, Proteine selektiv auf diese Kreisstrukturen zu adsorbieren. Die größte Schwäche dieser Methode bestand jedoch darin, dass Restwasser auf den Oberflächen entlang der Kontaktstellen zwischen den Partikeln und den Oberflächen zu einer Polykondensation des OEG-Silans führte, so dass der minimale Durchmesser der Kreisstrukturen auf den Partikeldurchmesser limitiert war. Aus Gründen der thermischen Stabilität konnten nur SiO₂-Partikel als kolloidale Masken verwendet werden und diese Partikel sind nur bis zu einem unteren Durchmesser von 50 nm in einer akzeptablen Größenverteilung käuflich erwerblich. Daher wurden schließlich Submonolagen monodisperser AuNP zur Präparation nanoskaliger Adsorptionsplätze herangezogen.

Begleitend zu den experimentellen Arbeiten wurde das Adsorptionsverhalten von PS- und SiO₂-Partikeln auf Gold- und Siliciumoberflächen auch theoretisch untersucht. Durch Zugabe von NaCl zur Partikelsuspension kann deren negatives Oberflächenpotential so weit abgeschirmt werden, dass sie als statistisch dicht gepackte Monolage mit einer maximalen Bedeckung von 54.7 % auf ein planares Substrat adsorbieren. Die Menge an NaCl, die hierfür benötigt wird, ist abhängig vom Partikelradius, von den Oberflächenladungen der Partikel und Substrate, sowie von den Hamaker-Konstanten der Partikel- und Substratmaterialien. Die Hamaker-Konstante ist eine materialspezifische Größe, die ein Maß dafür ist, wie stark die attraktive, dispersive Kraft ist, die von einem Körper ausgeht. Es wurden die Wechselwirkungspotentiale bestehend aus einem attraktiven van-der-Waals-Term, einem repulsiven Coulomb-Term (Partikel- und Substratoberflächen waren immer negativ geladen) sowie einem repulsiven Born-Term, der aus der Pauli-Abstoßung zweier vollständig mit Elektronen besetzter Orbitale hervorgeht, für verschiedene Partikel-Substrat Kombinationen berechnet. Die Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen waren, trotz der zahlreichen Näherungen, die in die Rechnung eingingen, erstaunlich gut. Mit Hilfe dieser relativ einfachen, theoretischen Betrachtung können gute Vorhersagen getroffen werden, ob ein Partikel einer bestimmten Größe auf ein bestimmtes Substrat durch Zugabe von NaCl adsorbiert werden kann und bei welcher NaCl-Konzentration in etwa die Partikeladsorption zu erwarten ist.

GOx auf homogen beschichteten Oberflächen

Um Vergleichswerte zur enzymatischen Aktivität und Sekundärstruktur von adsorbierter GOx auf nicht-strukturierten Oberflächen zu ermitteln, wurden je 4 verschiedene homogene Polyelektrolytbeschichtungen auf Silicium bzw. Thiolbeschichtungen auf Gold präpariert und das Enzym hierauf abgeschieden. Dabei konnte festgestellt werden, dass das Enzym auf hydrophoben Oberflächen nahezu irreversibel adsorbiert, wohingegen auf hydrophilen Oberflächen in wässriger Pufferlösung bis zu 50 % der initialen Adsorbatmenge wieder abgewaschen werden konnten. Die absoluten Mengen an adsorbierten Enzym sind auf positiv geladenen sowie aromatischen Oberflächen besonders hoch. Ursächlich hierfür sind attraktive Coulomb-Wechselwirkungen bzw. aromatische π - π -Wechselwirkungen im letztgenannten Fall. Die enzymatische Aktivität der adsorbierten GOx im Vergleich zum nativen Enzym in Lösung blieb auf positiv geladenen Oberflächen zu 60 – 80 % erhalten. Auf ungeladenen hydrophoben Oberflächen sank die Aktivität auf knapp 50 %, auf negativ geladenen Oberflächen betrug sie nur noch 20 – 35 % und auf aromatischen Oberflächen schließlich nur noch ca. 9 % des Referenzwertes. Da das Enzym selbst beim betrachteten pH-Wert von 5.5 schwach negativ geladen ist, muss es infolge der

Adsorption auf positiv geladene Oberflächen nur geringe konformative Veränderungen unterlaufen, um zur Oberfläche attraktive Wechselwirkungen ausbilden zu können, was die vergleichsweise guten Aktivitätswerte auf diesen Oberflächen erklärt. Auf einer der Polyelektrolytbeschichtungen, PAH, wurde zudem eine starke Hydratisierung des adsorbierten Proteins festgestellt, die sich weiterhin günstig auf die Konformation (Sekundär- und vermutlich auch Tertiärstruktur) der GOx auswirkte, so dass hier von allen Adsorbaten die höchste Aktivität gemessen werden konnte. Die quantifizierten Anteile der beiden Sekundärstrukturelemente α -Helix und β -Faltblatt korrelierten annähernd linear mit den gemessenen spezifischen Aktivitäten der GOx: die Aktivität war umso höher, je höher der Anteil an helicalen Elementen und je niedriger der Anteil an Faltblattstrukturen war.

GOx auf nano-strukturierten Oberflächen

Die negativ geladenen, citratstabilisierten AuNP wurden mit Durchmessern von 11 nm, 20 nm, 33 nm und 44 nm synthetisiert und auf verschiedene, positiv geladene Substratbeschichtungen adsorbiert. Hierbei erwies sich die Adsorption auf PAH mit einer durchschnittlichen Oberflächenbedeckung von 35 % am günstigsten. Um eine Proteinadsorption über die Grenzen der AuNP zu verhindern, wurden die AuNP in eine proteinabweisende Matrix aus PAA-PEG2000 eingebettet. Das PAA-PEG2000, ein Copolymer aus Poly(acrylsäure) und Poly(ethylenglykol) α -2-aminoethyl ω -methoxy, wurde eigens zu diesem Zweck synthetisiert und eignet sich sowohl auf PAH als auch auf PEI sehr gut als proteinresistente Oberflächenbeschichtung. Die AuNP wurden vor der Proteinadsorption noch mit den selben Thiolen beschichtet, die auch zur Präparation der homogenen Substrate verwendet wurden. Auf den AuNP-Filmen war die Menge an adsorbierter GOx völlig unabhängig von der chemischen Natur der Partikeloberflächen. Das Adsorptionsverhalten des Enzyms wurde demnach hauptsächlich durch die Topologie der Partikel bestimmt. Faktisch konnte jedoch, entgegen dem eigentlichen Vorhaben, nur auf den 11 nm AuNP ein einzelnes GOx-Molekül adsorbiert werden, auf allen anderen Partikelgrößen ergab die Quantifizierung, dass definitiv mehrere Enzyme pro Partikel adsorbiert waren. Die enzymatische Aktivität der adsorbierten GOx war auf allen AuNP-Filmen deutlich geringer als die des nativen Enzyms in Lösung. Es konnten nur etwa 10 – 20 % der Referenzaktivität nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Sekundärstruktur ergab, dass für die geringe Aktivität der GOx zum einen eine starke Denaturierung ursächlich war. Insbesondere wurden hohe Anteile an β -Faltblattstrukturen gefunden, die bereits auf den homogenen Substraten mit einem erheblichen Aktivitätsverlust der GOx korreliert werden konnten. Allerdings zeigte das Enzym auf zwei der AuNP-Substrate eine ähnliche Sekundärstruktur wie auf der homogenen, hydrophoben DDT-Beschichtung, auf der die

enzymatische Aktivität fast doppelt so hoch war. Demzufolge ist anzunehmen, dass die GOx bevorzugt in einer ungünstigen räumlichen Orientierung auf die AuNP adsorbiert und zwar dergestalt, dass die Bindungstaschen für das Substrat der Partikeloberfläche zugewandt sind und die katalytischen Zentren des Enzyms nicht mehr zugänglich sind. Da auf AuNP-Substraten mit vergleichsweise geringer Proteinbedeckung etwas höhere Enzymaktivitäten festgestellt wurden, wurde weiterhin angenommen, dass sich die Enzymmoleküle durch Aggregatbildung auf den AuNP gegenseitig blockieren.

7. Fazit

Die selektive Adsorption einzelner Proteinmoleküle zur gezielten Steuerung ihrer Konformation und Aktivität ist zweifelsohne eine äußerst schwierige Herausforderung, die in der vorliegenden Arbeit nur unzureichend bewerkstelligt werden konnte. AuNP-Submonolagen stellen prinzipiell ein einfaches Werkzeug zur großflächigen Präparation nanostrukturierter Oberflächen dar. Da die Oberfläche eines annähernd sphärischen Partikels aber mit dem Quadrat des Radius wächst, müssen zur Adsorption einzelner Proteine entweder sehr kleine Partikel mit Radien von unter 5 nm verwendet werden, oder es gelingt, die Freiräume zwischen den Partikeln mit einer proteinresistenten Matrix zu füllen, deren Schichtdicke gezielt variiert werden kann, so dass nur wenig Partikeloberfläche zur Adsorption frei bleibt. Letzteres dürfte, wenn überhaupt, nur mit großer Mühe erfüllbar sein, da die Schichtdicken von Polymerfilmen mit zunehmender Kettenlänge immer schwerer kontrollierbar werden.

Die Adsorption von GOx auf AuNP-Submonolagen führte nicht zu einer Stabilisierung ihrer Konformation und damit Erhöhung der enzymatischen Aktivität, sondern im Gegenteil, zu einer starken Denaturierung und einem hohen Aktivitätsverlust des Enzyms. Dieses Ergebnis ist vor allem im Hinblick auf den Einsatz kolloidalen Golds in der Biomedizin interessant. Dort werden AuNP nicht nur zu diagnostischen Zwecken verwendet, es gibt auch zahlreiche Studien, die die Applikation von AuNP im lebenden Organismus beschreiben. TiO₂- und SiO₂-Nanopartikel (u. a.) werden längst nicht mehr nur im Tierversuch getestet, sondern werden im großindustriellen Maßstab verschiedenen Kosmetika, Reinigungsmitteln, etc. beigemischt. Der vermeintliche Vorteil der sehr guten Hautresorptivität solcher Nanopartikel, die einen schnelleren Wirkstofftransport in den Körper gewährleisten soll, kann aber langfristig gesehen auch zu einem großen Nachteil werden. Reichern sich die Partikel in einem bestimmten Organ an, wäre anhand der vorliegenden Ergebnisse eine Inaktivierung bestimmter Enzyme vorstellbar. Die irreversible Denaturierung von Proteinen auf solchen Fremdkörpern führt häufig auch zu einer Abwehrreaktion des Körpers, so dass Nanopartikel im Körper auch Auslöser dauerhafter Entzündungsherde werden können. Es sind bereits Fälle bekannt, in denen Entzündungen im menschlichen Lungengewebe auf die Verwendung von nanopartikelbasierter Polyacrylatfarbe zurückgeführt werden konnten [177]. 2006 wurden zwei Versiegelungssprays der Firma Kleinmann vom Markt genommen, nachdem insgesamt 97 Fälle von teils schwerwiegenden Atmungsstörungen nach deren Anwendung gemeldet wurden [178]. Es bestand auch hier der Verdacht, dass die im Produkt enthaltenen Nanopartikel Auslöser der Erkrankungen waren,

dies konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden. Die Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigen einmal mehr, dass der Einsatz von Nanopartikeln in biologischen Systemen nicht nur großen Nutzen, sondern auch Risiken mit sich bringt.

Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die gekrümmte Oberfläche der AuNP einen viel stärkeren Einfluss auf das Adsorptionsverhalten der GOx hat, als die chemische Beschichtung der Partikel. Es ist also naheliegend, dass das Adsorptionsverhalten des Proteins auf planaren, nanostrukturierten Oberflächen ein völlig anderes sein wird. Auf solchen Substraten könnte es also gelingen, das adsorbierte Enzym in seiner nativen Konformation zu stabilisieren und damit seine Aktivität zu erhalten. Ein gewisses Potential zur Präparation solcher Oberflächen kann der kolloidalen Lithographie zugeschrieben werden. Insbesondere die Gasphasenabscheidung eines proteinresistenten Silans durch Masken aus Partikelmonolagen könnte nach einigen Optimierungen noch brauchbare Resultate liefern. Um die Verwendung der temperaturempfindlichen, aber in besserer Größenverteilung erhältlichen, PS-Partikel zu ermöglichen, müsste man die Gasphasenabscheidung im Ultrahochvakuum durchführen um das proteinresistente Silan bereits bei Raumtemperatur zu verdampfen, was allerdings einen größeren, apparativen Aufwand erfordern würde. Da die gefundenen Ringstrukturen wahrscheinlich durch die Kondensation des Silans mit Restwasser auf den Substraten verursacht werden, bleibt auch hier z. B. durch intensives Trocknen der Proben vor der Gasphasenabscheidung noch Raum zur Verbesserung.

A. Berechnung der Born-Repulsion zwischen Partikel und Oberfläche

Die Pauli-Abstoßung Ψ_{PA} zwischen 2 Molekülen wird üblicherweise reziprok proportional zur 12. Potenz des Abstands zwischen den beiden Molekülen angegeben und stellt den repulsiven Term des Lennard-Jones-Potentials Ψ_{LJ} dar:

$$\Psi_{LJ} = \Psi_{PA} - \Psi_{vdW} = 4 \cdot \chi \cdot \left\{ \left(\frac{\sigma}{d} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{d} \right)^6 \right\} = \frac{C_B}{d^{12}} - \frac{C_{vdW}}{d^6} \quad (A.1)$$

- χ : Tiefe der Potentialmulde
- d : Abstand der beiden Dipole
- σ : Abstand, bei dem das Potential eine Nullstelle aufweist
- C_B : Born-Konstante
- C_{vdW} : van-der-Waals-Konstante

Hieraus soll nun die Born-Repulsion zwischen einem Molekül und einer unendlich ausgedehnten, makroskopischen Platte berechnet werden. Nach Hamaker geschieht dies durch Integration der Wechselwirkungsenergie zwischen zwei Molekülen Ψ_{PA} über die gesamte Moleküldichte der Platte [154]. Die Abbildung A.1 veranschaulicht diesen Ansatz.

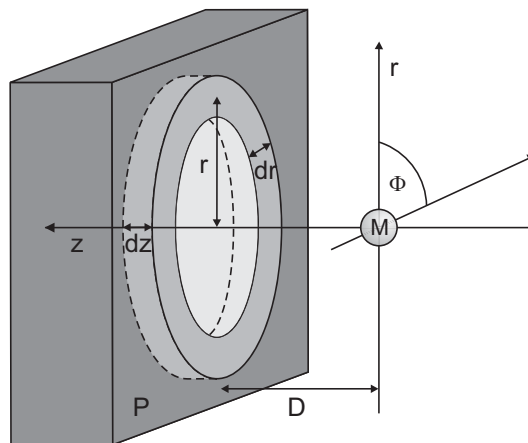


Abb. A.1.: Veranschaulichung der Integration über die Wechselwirkung zwischen Molekül M und Platte P.

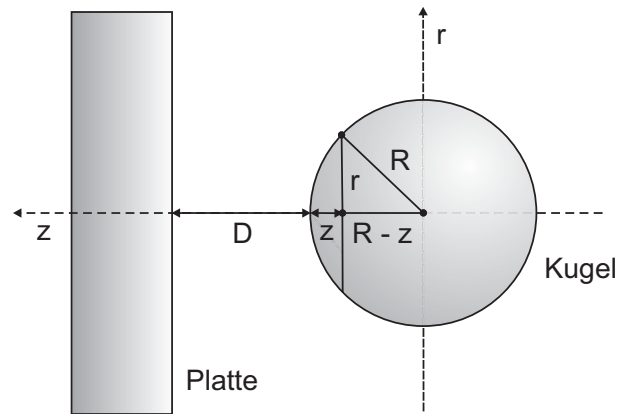


Abb. A.2.: Veranschaulichung der Integration über die Wechselwirkung zwischen Kugel und Platte.

Das Molekül M befindet sich dabei im Ursprung eines Koordinatensystems (Zylinderkoordinaten r , ϕ und z) im Abstand $z = D$ zur Platte P, welche senkrecht zur z -Achse liegt. Die Platte lässt sich in Kreisringe mit den Volumina $dV = 2\pi r dr dz$ unterteilen, deren Abstände zum Molekül $\bar{D} = \sqrt{r^2 + z^2}$ betragen. Die Born-Repulsion Ψ_{MP} zwischen dem Molekül und der Platte berechnet sich dann zu:

$$\Psi_{MP}(D) = \int_{z=D}^{\infty} \int_{r=0}^{\infty} \rho \cdot \Psi_{PA}(\bar{D}) dV = 2\pi C_B \rho \cdot \int_{z=D}^{\infty} \int_{r=0}^{\infty} \frac{r}{\bar{D}^{12}} dr dz \quad (\text{A.2})$$

- ρ : Moleküldichte der Platte
- Ψ_{PA} : Pauli-Abstoßung zwischen zwei Molekülen
- C_B : Born-Konstante
- dV : infinitesimales Volumen eines Kreisringes
- \bar{D} : Abstand zwischen dem Molekül und einem Kreisring

Das Ergebnis der Integration ist

$$\Psi_{MP}(D) = \frac{\pi \cdot C_B \cdot \rho}{45 \cdot D} \quad (\text{A.3})$$

Nun soll der Platte kein punktförmiges Molekül, sondern eine Kugel, die aus vielen Molekülen besteht, gegenüber liegen (Abb. A.2).

Wiederum läßt sich die Kugel in unendlich viele Kreisscheiben mit den Radien r um die z -Achse unterteilen. Diese haben überall den gleichen Abstand $\bar{D} = D + z$ zur Platte. Mit

Berechnung der Born-Repulsion zwischen Partikel und Oberfläche

Hilfe des Satzes von Pythagoras erhält man für den Radius der Kreisscheiben $r^2 = R^2 - (R-z)^2$, wobei R der Radius der Kugel ist. Die infinitesimalen Volumina der Kreisscheiben sind dann

$$dV = \pi r^2 dz = \pi (2R - z) z dz$$

Jetzt wird das Wechselwirkungspotential zwischen Molekül und Platte Ψ_{MP} (Gl. A.3) über das Volumen der Kugel integriert:

$$\Psi_{BR}(D) = \int_{z=0}^{z=2R} \rho \cdot \Psi_{MP}(\bar{D}) dV = \int_{z=0}^{z=2R} \frac{\pi^2 \cdot C_B \cdot \rho^2}{45 \cdot (D+z)^9} \cdot (2R-z) z dz \quad (A.4)$$

- ρ : Moleküldichte der Platte und der Kugel (soll gleich und konstant sein)
- Ψ_{MP} : repulsives Wechselwirkungspotential zwischen einem Molekül und der Platte
- \bar{D} : Abstand zwischen Platte und Kreisscheibe
- D: Abstand zwischen Platte und Kugeloberfläche
- R: Radius der Kugel
- dV: infinitesimales Volumen einer Kreisscheibe

Da Ψ_{MP} stark mit dem Abstand $\bar{D} = D + z$ abfällt, tragen für $D \ll R$ hauptsächlich die Kreisscheiben für kleine z zum Integral bei. Deshalb kann die obere Integralgrenze nach ∞ verschoben werden und z ist gegenüber R vernachlässigbar. Somit vereinfacht sich Gleichung A.4 zu

$$\Psi_{BR}(D) = \pi^2 \rho^2 C_B \cdot \int_{z=0}^{\infty} \frac{2Rz}{45 \cdot (D+z)^9} dz$$

Die Born-Konstante C_B kann auch ausgedrückt werden als $C_B = \sigma^6 \cdot C_{vdW}$. Dann können die Konstanten vor dem Integral zusammengefasst werden zu $A \cdot \sigma^6$, wobei A die Hamaker-Konstante ist. Das Ergebnis der Integration ist

$$\Psi_{BR}(D) = \frac{A \cdot \sigma^6 \cdot R}{1260 \cdot D^7} \quad (A.5)$$

B. Aktivität von Glucose Oxidase in Lösung und auf homogen beschichteten Oberflächen

Im Folgenden sind die Michaelis-Menten-Graphen der GOx in seiner nativen Konformation bei einer Konzentration von $c = 100 \text{ ng/ml}$ und als Adsorbat auf planaren Oberflächen dargestellt. Aus dem Fit-Parameter P1 kann die spezifische Enzymaktivität abgeleitet werden, der Fit-Parameter P2 entspricht der Michaelis-Menten-Konstante K_M .

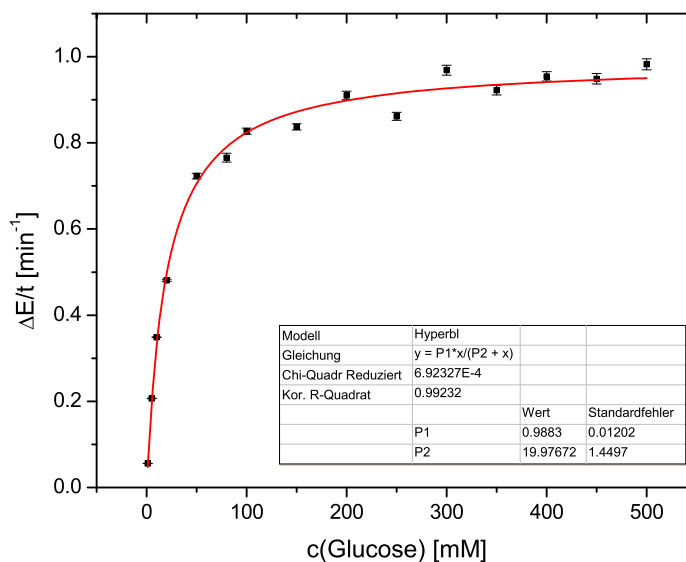


Abb. B.1.: Aktivität von GOx in Lösung. $c = 100 \text{ ng/ml}$, $\text{pH} = 5.5$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Aktivität von Glucose Oxidase in Lösung und auf homogen beschichteten Oberflächen

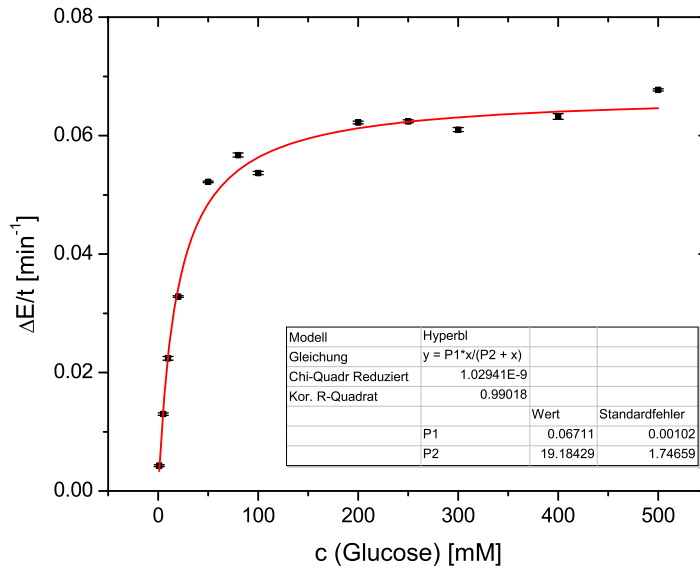


Abb. B.2.: Aktivität von GOx auf DDT. $c = 13.1 \text{ ng/ml}$, $\text{pH} = 5.5$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

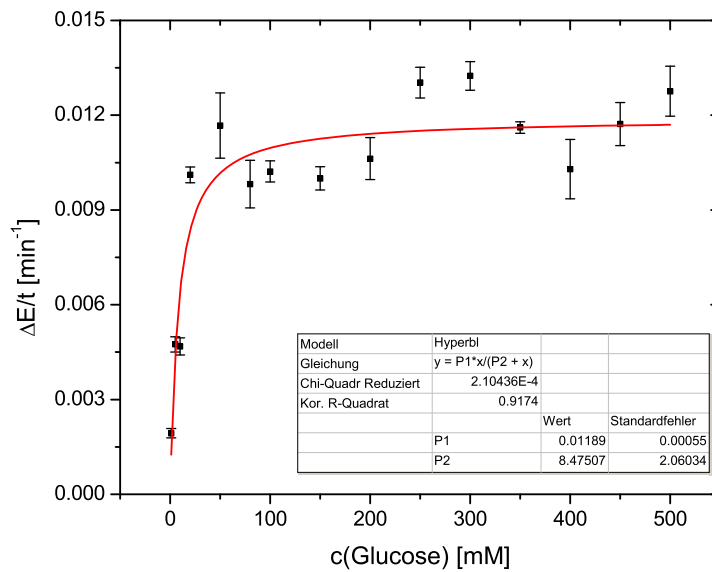


Abb. B.3.: Aktivität von GOx auf PyUDT. $c = 13.8 \text{ ng/ml}$, $\text{pH} = 5.5$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Aktivität von Glucose Oxidase in Lösung und auf homogen beschichteten Oberflächen

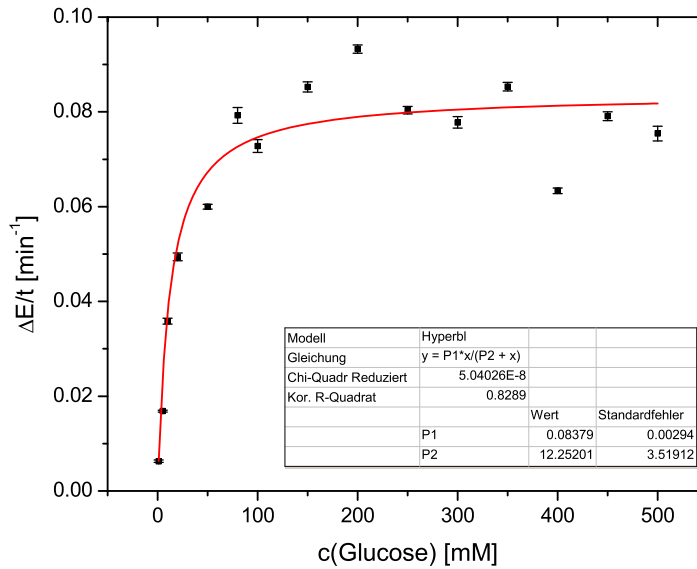


Abb. B.4.: Aktivität von GOx auf AUDT. $c = 12.7 \text{ ng/ml}$, $\text{pH} = 5.5$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

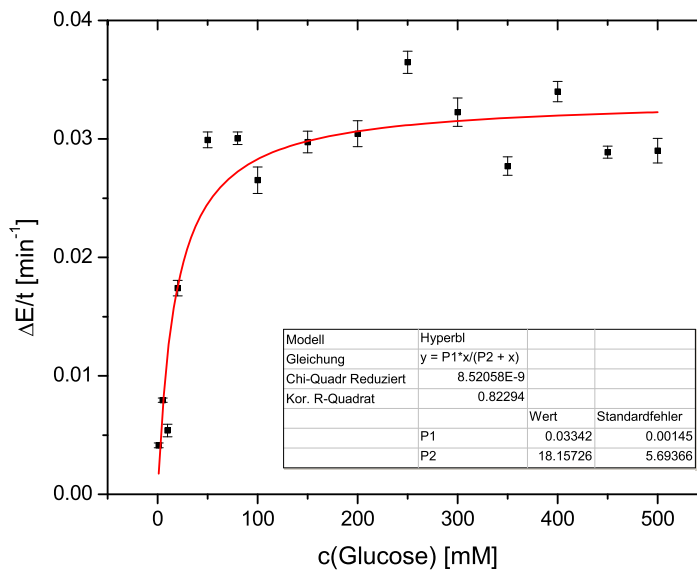


Abb. B.5.: Aktivität von GOx auf MDDS. $c = 9.3 \text{ ng/ml}$, $\text{pH} = 5.5$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Aktivität von Glucose Oxidase in Lösung und auf homogen beschichteten Oberflächen

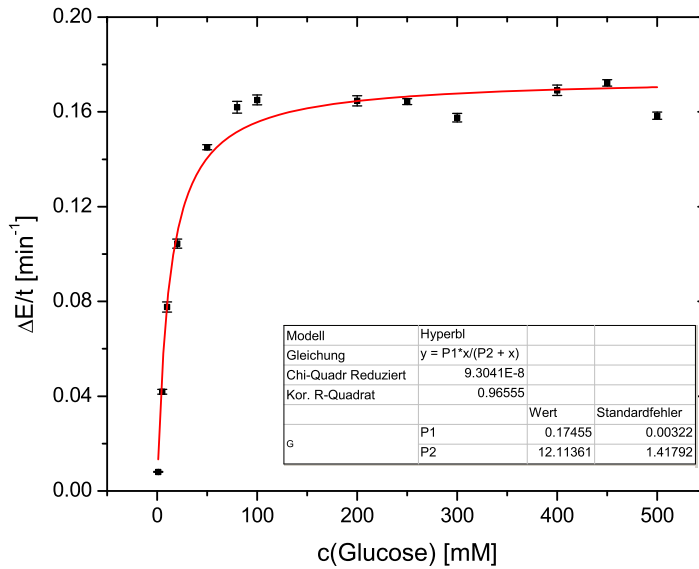


Abb. B.6.: Aktivität von GOx auf PAH. $c = 12 \text{ ng/ml}$, $\text{pH} = 5.5$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

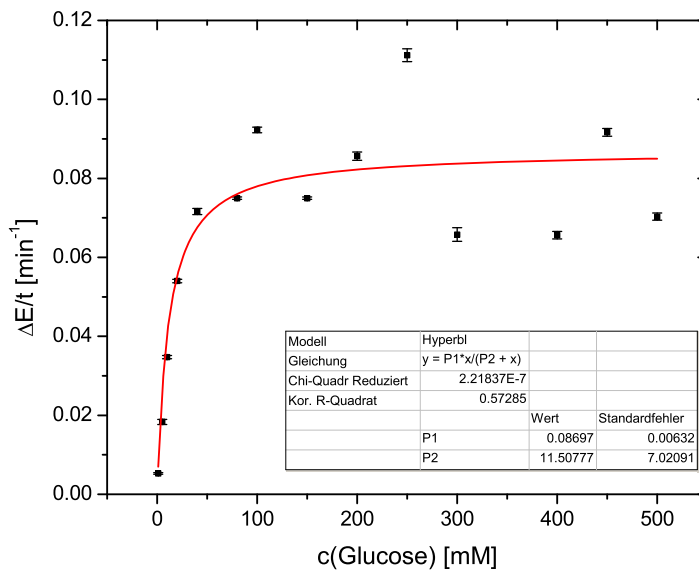


Abb. B.7.: Aktivität von GOx auf PEI. $c = 13.3 \text{ ng/ml}$, $\text{pH} = 5.5$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Aktivität von Glucose Oxidase in Lösung und auf homogen beschichteten Oberflächen

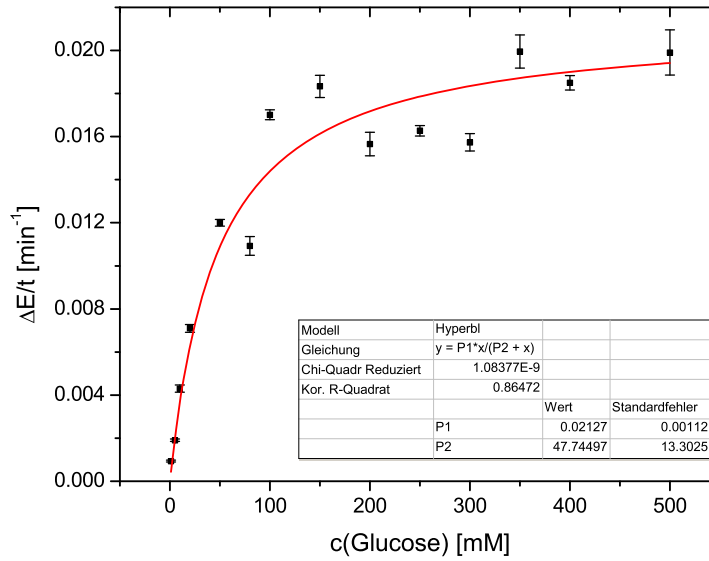


Abb. B.8.: Aktivität von GOx auf PSS. $c = 8.8 \text{ ng/ml}$, $\text{pH} = 5.5$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

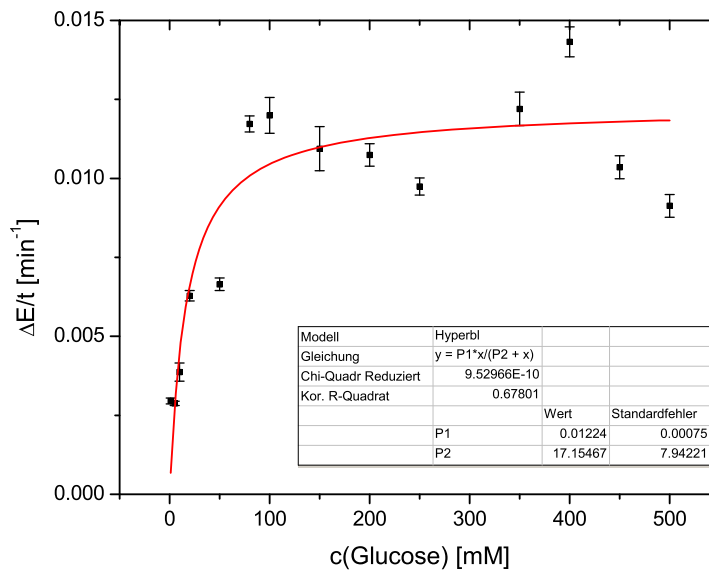


Abb. B.9.: Aktivität von GOx auf PVP. $c = 12.7 \text{ ng/ml}$, $\text{pH} = 5.5$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$.

C. IR-Spektren der Oberflächenbeschichtungen

Die folgenden Abbildungen zeigen die IRRA-Spektren der verwendeten Oberflächenbeschichtungen auf planaren Substraten. Es sind alle Bandenlagen eingezeichnet, die zugeordnet werden konnten (vgl. Tab. 5.4 und 5.5).

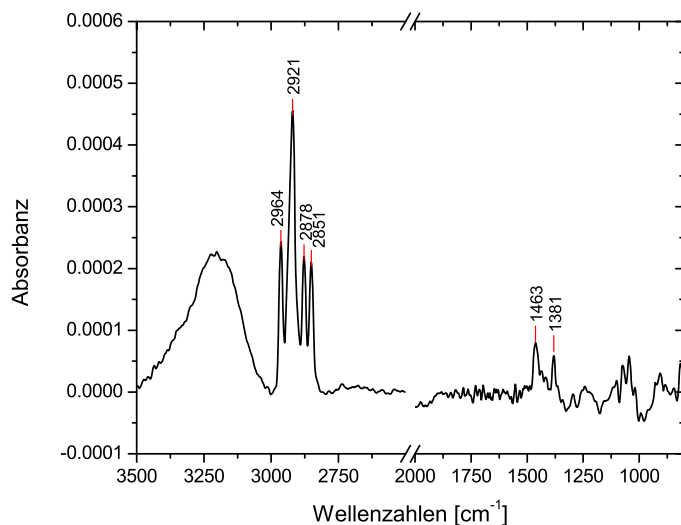


Abb. C.1.: IRRA-Spektrum von DDT auf 100 nm Au.

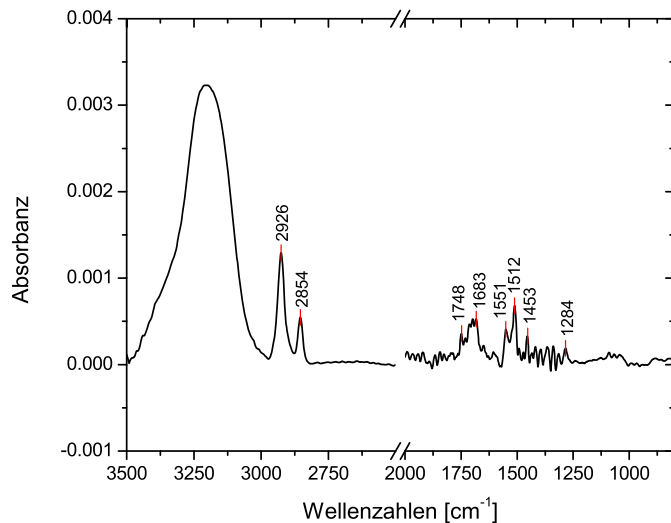


Abb. C.2.: IRRA-Spektrum von PyUDT auf 100 nm Au.

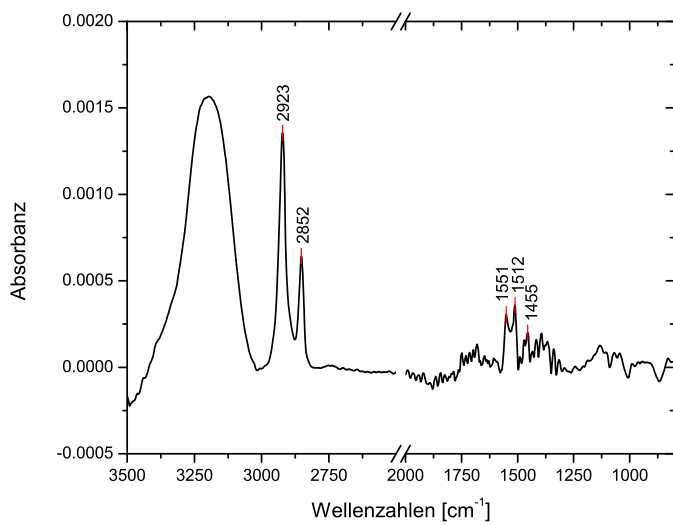


Abb. C.3.: IRRA-Spektrum von AUDT auf 100 nm Au.

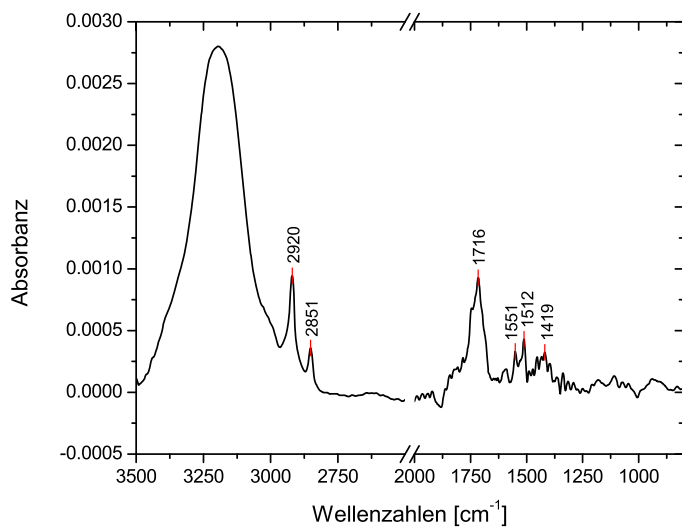


Abb. C.4.: IRRA-Spektrum von MDDS auf 100 nm Au.

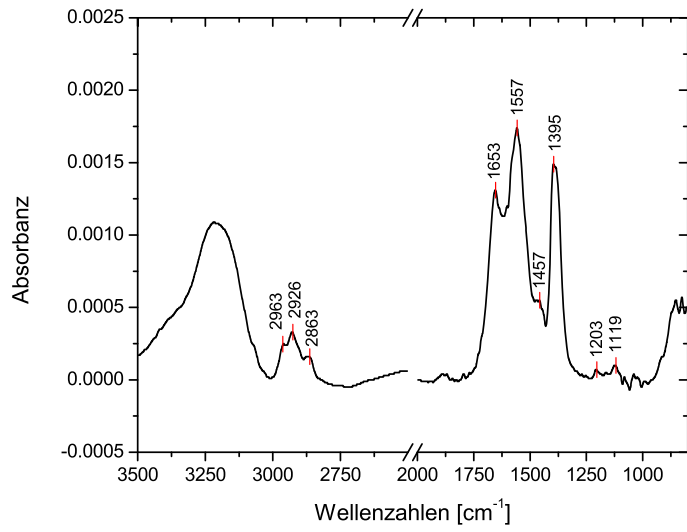


Abb. C.5.: IRRA-Spektrum von PAH PAH auf Si.

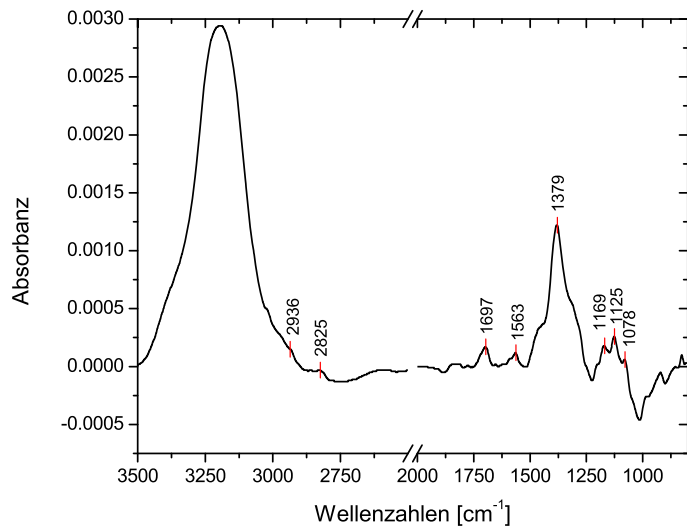


Abb. C.6.: IRRA-Spektrum von PEI PAH auf Si.

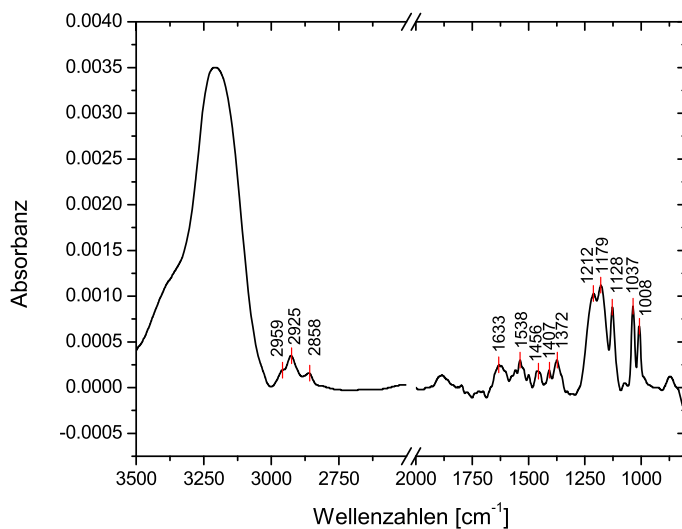


Abb. C.7.: IRRA-Spektrum von PSS PAH auf Si.

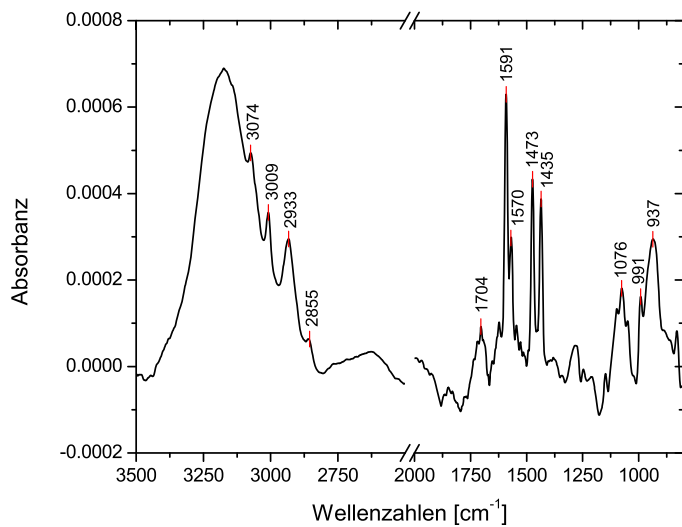


Abb. C.8.: IRRA-Spektrum von PVP PAH auf Si.

D. FSD-IR-Spektren der adsorbierten Glucose Oxidase

Zur Ermittlung der Sekundärstruktur der adsorbierten GOx wurden die Amid-I-Banden der entsprechenden IR-Spektren einer Fourier-Selbstentfaltung unterzogen. An die so erhaltene Feinstruktur wurden anschließend Gauß-Profile angepasst, anhand der Flächeninhalte die quantitativen Sekundärstrukturanteile ermittelt wurden. In den nachfolgenden Spektren ist jeweils die schwarze Kurve das Original der entfalteten Amid-I-Bande und die rote Kurve der kumulative Fit der grünen Gauß-Kurven.

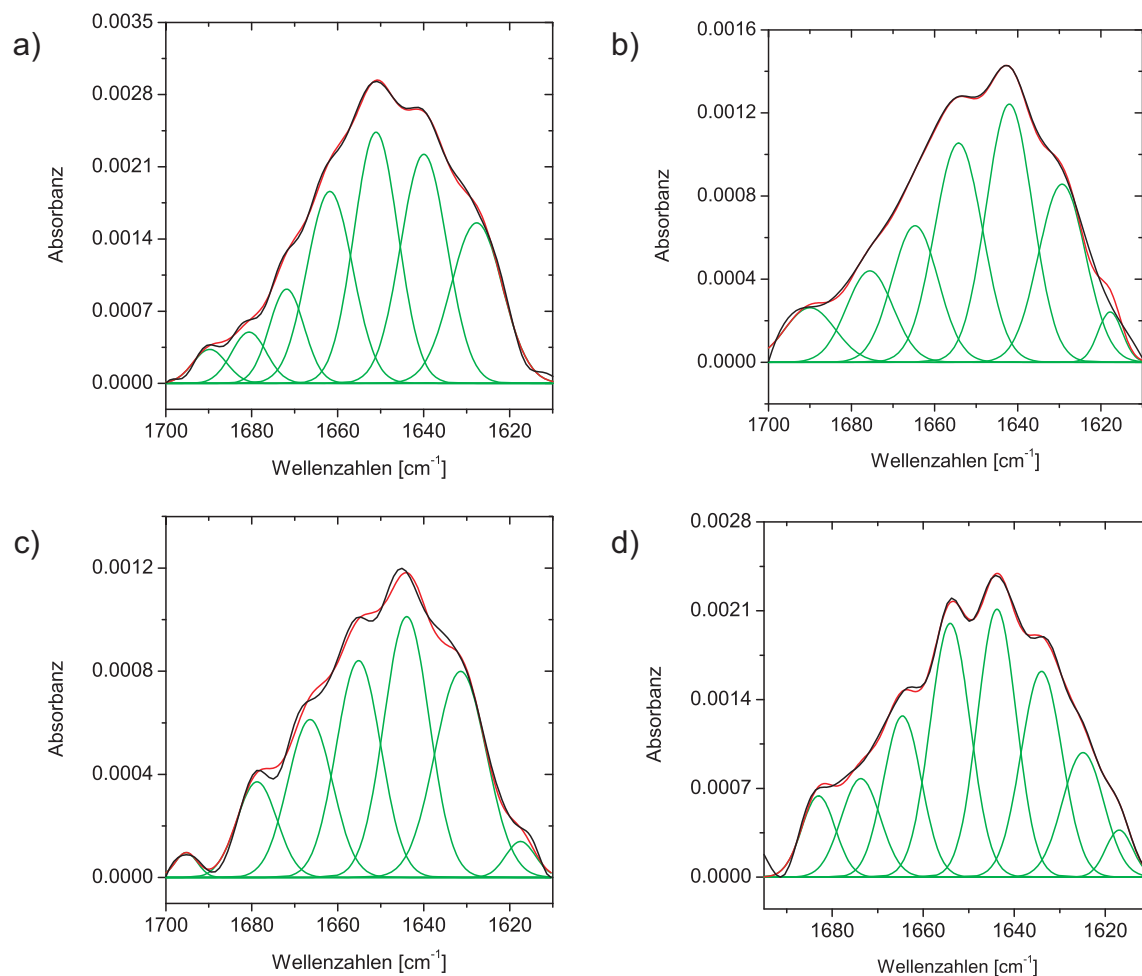


Abb. D.1.: FSD-IR-Spektren der GOx auf Polyelektrolytbeschichtungen. a) PAH, b) PEI, c) PSS und d) PVP.

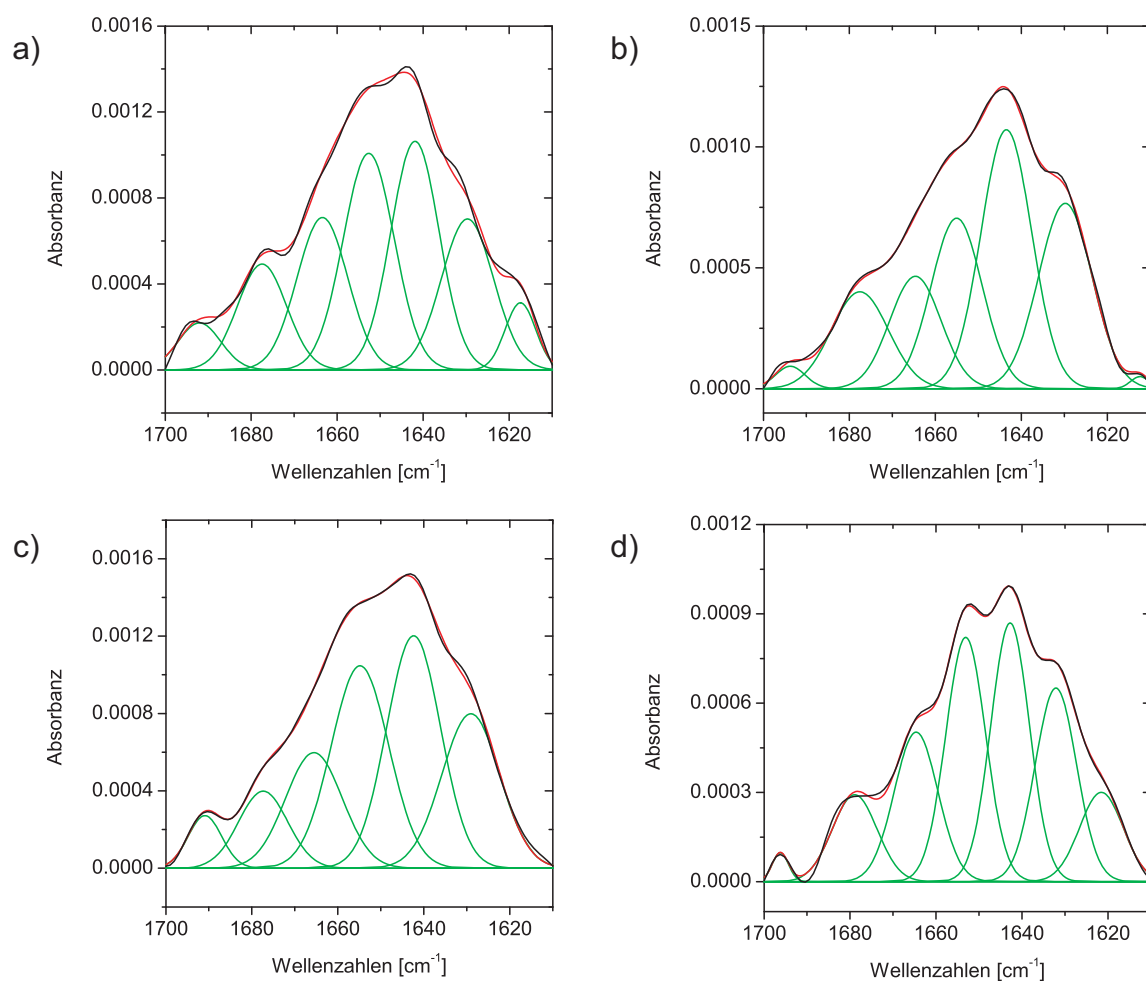


Abb. D.2.: FSD-IR-Spektren der GOx auf Thiolatbeschichtungen. a) DDT, b) PyUDT, c) AUDT und d) MDDS.

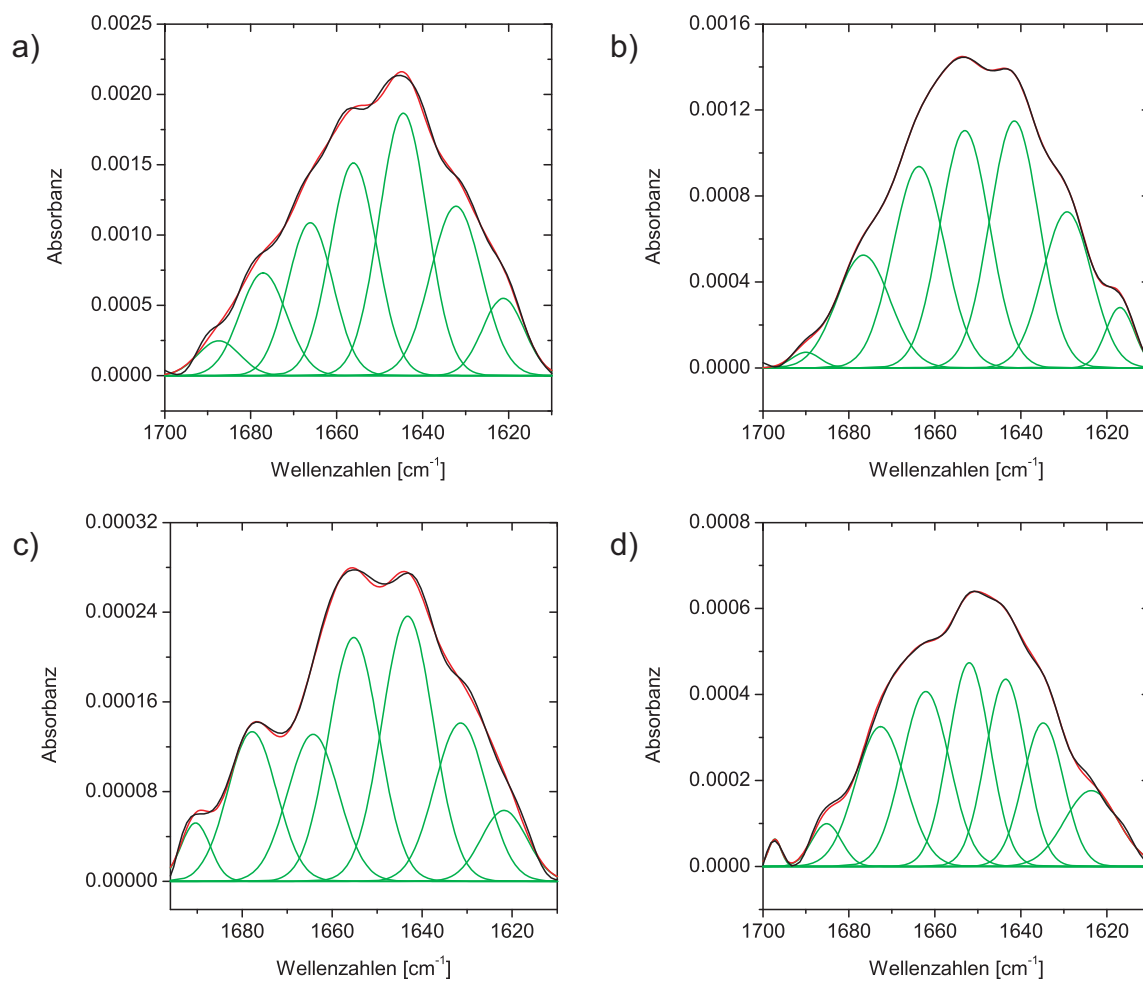


Abb. D.3.: FSD-IR-Spektren der GOx auf 20 nm AuNP. a) DDT, b) PyUDT, c) AUDT und d) MDDS.

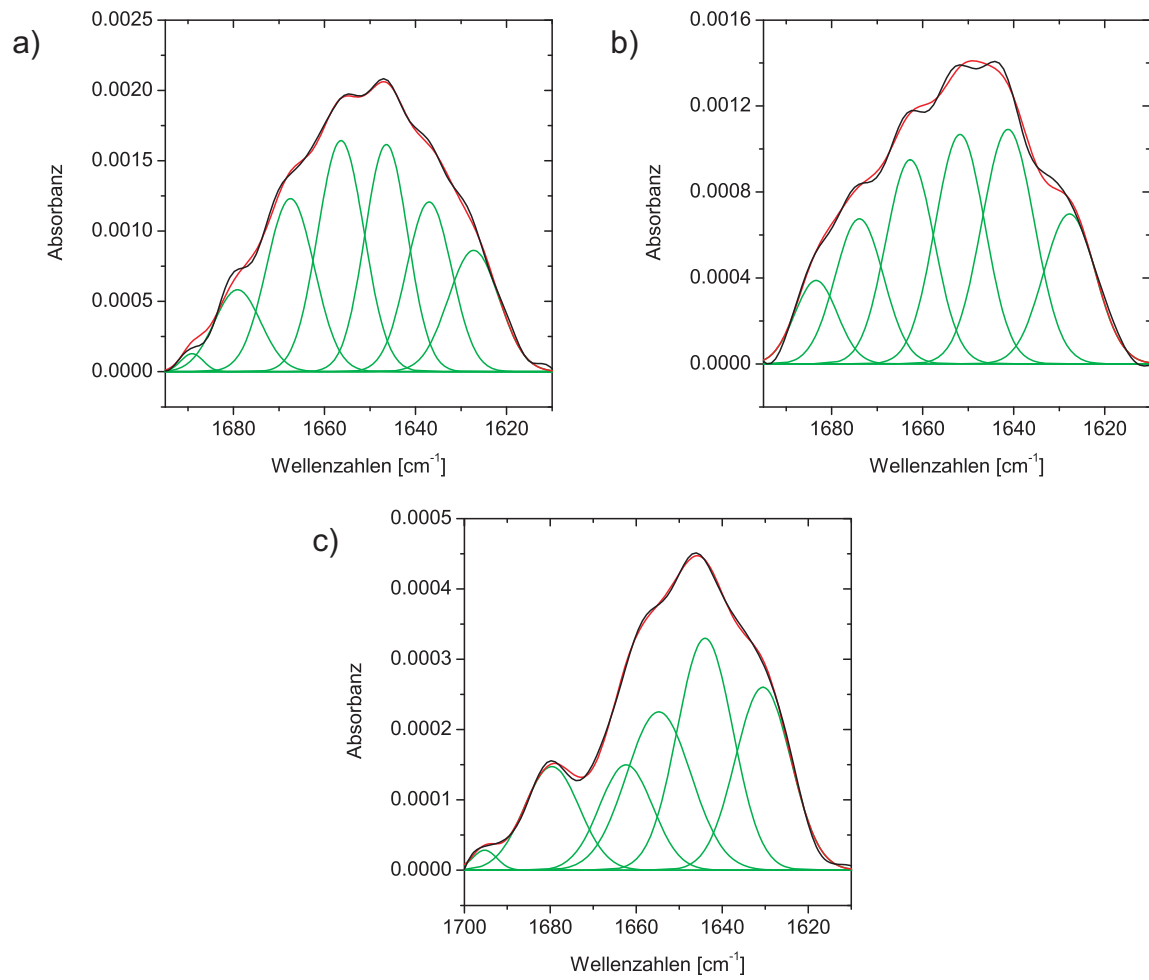


Abb. D.4.: FSD-IR-Spektren der GOx auf 33 nm AuNP. a) DDT, b) PyUDT und c) AUDT.

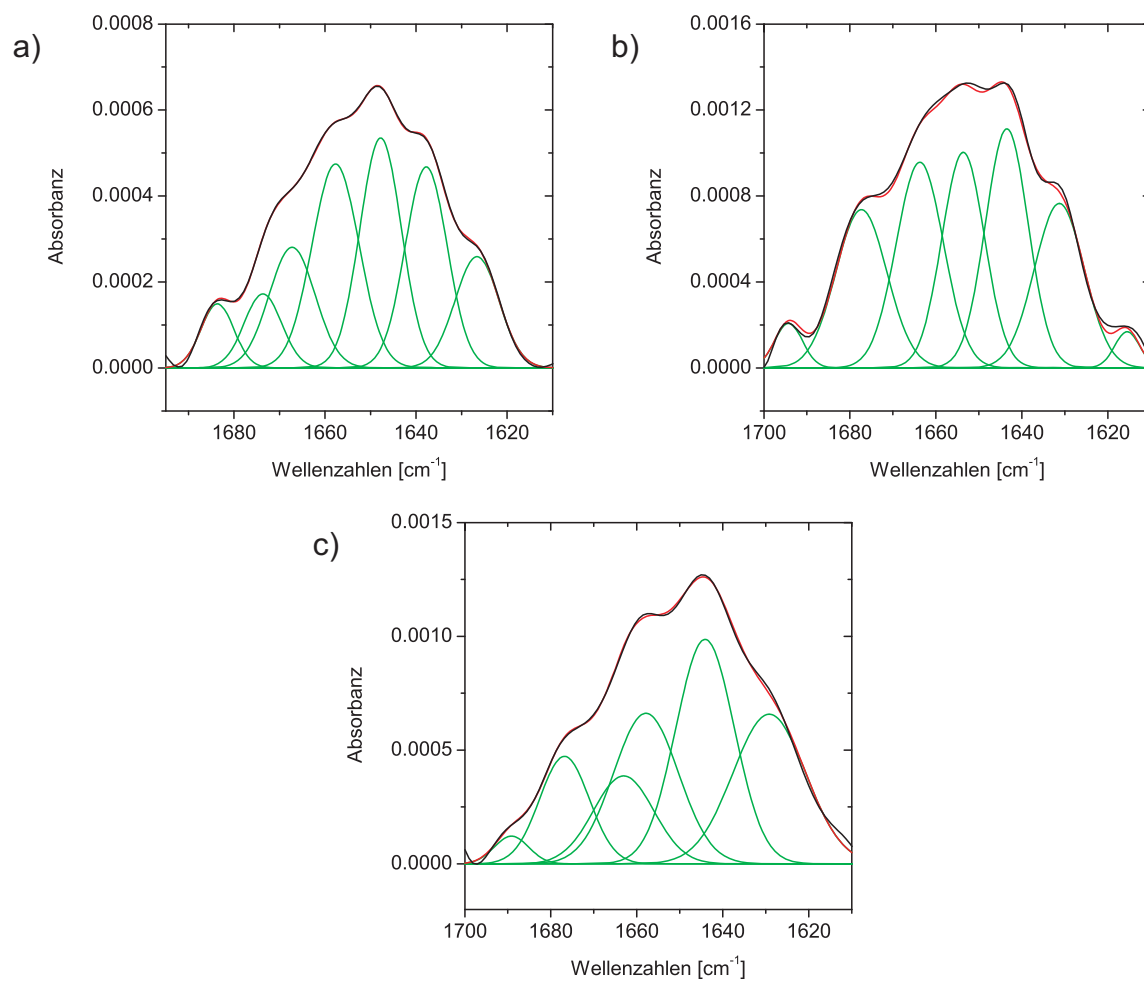


Abb. D.5.: FSD-IR-Spektren der GOx auf 44 nm AuNP. a) DDT, b) PyUDT und c) MDDS.

Literaturverzeichnis

- [1] Horbett, T.; Brash, J. *Proteins at Interfaces II*; American Chemical Society, 1995.
- [2] Chuang, H.; King, W.; Mason, R. *J. Lab. Clin. Med.* **1978**, *92*(3), 483–96.
- [3] Steenackers, M.; Küller, A.; Ballav, N.; Zharnikov, M.; Grunze, M.; Jordan, R. *Small* **2007**, *3*, 1764–1773.
- [4] Sluzky, V.; Tamada, J.; Klibanov, A.; Langer, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **1991**, *88*(21), 9377.
- [5] Gölzhäuser, A.; Geyer, W.; Stadler, V.; Eck, W.; Grunze, M.; Edinger, K.; Weimann, T.; Hinze, P. *J. Vac. Sci. Technol. B* **2000**, *18*, 3414.
- [6] Gölzhäuser, A.; Eck, W.; Geyer, W.; Stadler, V.; Weimann, T.; Hinze, P.; Grunze, M. *Adv. Mater.* **2001**, *13*(11), 806–809.
- [7] Himmelhaus, M.; Takei, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, *4*(3), 496–506.
- [8] Micheletto, R.; Fukuda, H.; Ohtsu, M. *Langmuir* **1995**, *11*(9), 3333–3336.
- [9] Rakers, S.; Chi, L.; Fuchs, H. *Langmuir* **1997**, *13*, 7121–7124.
- [10] Denkov, N.; Velev, O.; Kralchevski, P.; Ivanov, I.; Yoshimura, H.; Nagayama, K. *Langmuir* **1992**, *8*(12), 3183–3190.
- [11] Frens, G. *Nat. Phys. Sci.* **1973**, *241*(105), 20–22.
- [12] Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*(32), 15700.
- [13] Haiss, W.; Thanh, N.; Aveyard, J.; Fernig, D. *Anal. Chem.* **2007**, *79*(11), 4215–4221.
- [14] Dement'eva, O.; Kartseva, M.; Bol'shakova, A.; Vereshchagina, O.; Ogarev, V.; Kalinina, M.; Rudoy, V. *Coll. J.* **2005**, *67*(2), 123–133.
- [15] Sato, T.; Brown, D.; Johnson, B. *Chem. Commun.* **1997**, *11*, 1007–1008.
- [16] Ulman, A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*(4), 1533.
- [17] Love, J.; Estroff, L.; Kriebel, J.; Nuzzo, R.; Whitesides, G. *Chem. Rev.* **2005**, *105*(4), 1103–1170.
- [18] Decher, G.; Hong, J.; Schmitt, J. *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 831–835.
- [19] Lvov, Y.; Decher, G.; Moehwald, H. *Langmuir* **1993**, *9*(2), 481–486.
- [20] Heuberger, R.; Sukhorukov, G.; Voros, J.; Textor, M.; Mohwald, H. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*(3), 357–366.
- [21] Cao, X.; Pettit, M.; Conlan, S.; Wagner, W.; Ho, A.; Clare, A.; Callow, J.; Callow, M.; Grunze, M.; Rosenhahn, A. *Biomacromolecules* **2009**, *10*(4), 907–915.

- [22] Kenausis, G.; Voros, J.; Elbert, D.; Huang, N.; Hofer, R.; Ruiz-Taylor, L.; Textor, M.; Hubbell, J.; Spencer, N. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*(14), 3298–3309.
- [23] Huang, N.; Michel, R.; Voros, J.; Textor, M.; Hofer, R.; Rossi, A.; Elbert, D.; Hubbell, J.; Spencer, N. *Langmuir* **2001**, *17*(2), 489–498.
- [24] Cao, X.; Pettitt, M.; Wode, F.; Sancet, M.; Fu, J.; Ji, J.; Callow, M.; Callow, J.; Rosenhahn, A.; Grunze, M. *Advanced Functional Materials* **2010**.
- [25] Welle, A. *Nachrichten - FZK* **2001**, *33*, 295–304.
- [26] Zalipsky, S.; Milton Harris, J. In *ACS Symposium Series*, Vol. 680, pages 1–15. ACS Publications, 1997.
- [27] Jeon, S.; Lee, J.; Andrade, J.; De Gennes, P. *J. Coll. Interf. Sci.* **1991**, *142*(1), 149–158.
- [28] Israelachvili, J. *Intermolecular and Surface Forces*; Academic Press, London, 1992.
- [29] Herrwerth, S.; Eck, W.; Reinhardt, S.; Grunze, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(31), 9359–9366.
- [30] Feldman, K.; Haehner, G.; Spencer, N.; Harder, P.; Grunze, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10134–10141.
- [31] Bain, C.; Whitesides, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*(18), 7164–7175.
- [32] Imabayashi, S.; Gon, N.; Sasaki, T.; Hobara, D.; Kakiuchi, T. *Langmuir* **1998**, *14*(9), 2348–2351.
- [33] Chen, S.; Li, L.; Boozer, C.; Jiang, S. *Langmuir* **2000**, *16*(24), 9287–9293.
- [34] Smith, M.; Efimenko, K.; Fischer, D.; Lappi, S.; Kilpatrick, P.; Genzer, J. *Langmuir* **2007**, *23*(2), 673–683.
- [35] Kitaev, V.; Seo, M.; McGovern, M.; Huang, Y.; Kumacheva, E. *Langmuir* **2001**, *17*(14), 4274–4281.
- [36] Buseman-Williams, J.; Berg, J. *Langmuir* **2004**, *20*(5), 2026–2029.
- [37] Choi, I.; Kim, Y.; Kang, S.; Lee, J.; Yi, J. *Langmuir* **2006**, *22*(11), 4885–4889.
- [38] Chaudhury, M.; Whitesides, G. *Science* **1992**, *256*(5063), 1539–1541.
- [39] Liedberg, B.; Wirde, M.; Tao, Y.; Tengvall, P.; Gelius, U. *Langmuir* **1997**, *13*, 5329–5334.
- [40] Morgenthaler, S.; Lee, S.; Zurcher, S.; Spencer, N. *Langmuir* **2003**, *19*(25), 10459–10462.
- [41] Riepl, M.; Östblom, M.; Lundström, I.; Svensson, S.; van der Gon, A.; Schäferling, M.; Liedberg, B. *Langmuir* **2005**, *21*(3), 1042–1050.
- [42] Kumar, A.; Whitesides, G. *Science* **1994**, *263*(5143), 60.

- [43] Xia, Y.; Whitesides, G. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*(1), 153–184.
- [44] Pompe, T.; Fery, A.; Herminghaus, S.; Kriele, A.; Lorenz, H.; Kotthaus, J. *Phys. Lett.* **1997**, *70*, 1593.
- [45] Delamarche, E.; Donzel, C.; Kamounah, F.; Wolf, H.; Geissler, M.; Stutz, R.; Schmidt-Winkel, P.; Michel, B.; Mathieu, H.; Schaumburg, K. *Langmuir* **2003**, *19*(21), 8749–8758.
- [46] Harada, Y.; Girolami, G.; Nuzzo, R. *Langmuir* **2004**, *20*, 10878–10888.
- [47] Dike, L.; Chen, C.; Mrksich, M.; Tien, J.; Whitesides, G.; Ingber, D. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* **1999**, *35*(8), 441–448.
- [48] Morhard, F.; Pipper, J.; Dahint, R.; Grunze, M. *Sens. Actuators B* **2000**, *70*(1-3), 232–242.
- [49] Falconnet, D.; Csucs, G.; Michelle Grandin, H.; Textor, M. *Biomaterials* **2006**, *27*(16), 3044–3063.
- [50] Brambley, D.; Martin, B.; Prewett, P. *Adv. Mater. Opt. Electron.* **1994**, *4*(2), 55–74.
- [51] Zharnikov, M.; Grunze, M. *J. Vac. Sci. Technol. B* **2002**, *20*, 1793.
- [52] Ballav, N.; Shaporenko, A.; Krakert, S.; Terfort, A.; Zharnikov, M. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*(21), 7772–7782.
- [53] Ballav, N.; Schilp, S.; Zharnikov, M. *Angewandte Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*(8), 1421.
- [54] Küller, A.; Eck, W.; Stadler, V.; Geyer, W.; Götzhäuser, A. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, *82*, 3776.
- [55] Küller, A.; El-Desawy, M.; Stadler, V.; Geyer, W.; Eck, W.; Götzhäuser, A. *J. Vac. Sci. Technol. B* **2004**, *22*, 1114.
- [56] Geyer, W.; Stadler, V.; Eck, W.; Götzhäuser, A.; Grunze, M.; Sauer, M.; Weimann, T.; Hinze, P. *J. Vac. Sci. Technol. B* **2001**, *19*, 2732.
- [57] Biebricher, A.; Paul, A.; Tinnefeld, P.; Götzhäuser, A.; Sauer, M. *J. Biotechnol.* **2004**, *112*(1-2), 97–107.
- [58] Gorman, C.; Carroll, R.; He, Y.; Tian, F.; Fuierer, R. *Langmuir* **2000**, *16*(15), 6312–6316.
- [59] Pena, D.; Raphael, M.; Byers, J. *Langmuir* **2003**, *19*(21), 9028–9032.
- [60] Zhang, H.; Chung, S.; Mirkin, C. *Nano letters* **2003**, *3*(1), 43–46.
- [61] Wood, M. *J. R. Soc. Interface* **2007**, *4*(12), 1.
- [62] Yang, S.; Jang, S.; Choi, D.; Kim, S.; Yu, H. *Small* **2006**, *2*(4), 458.

- [63] Chen, K.; Jiang, X.; Kimerling, L.; Hammond, P. *Langmuir* **2000**, *16*(20), 7825–7834.
- [64] Michel, R.; Reviakine, I.; Sutherland, D.; Fokas, C.; Csucs, G.; Danuser, G.; Spencer, N.; Textor, M. *Langmuir* **2002**, *18*(22), 8580–8586.
- [65] Berndt, J. Studium der Adsorption von Nanopartikeln auf Oberflächen unter der Berücksichtigung entropischer Kräfte Diplomarbeit, Universität Heidelberg, **2006**.
- [66] Lenzmann, F.; Li, K.; Kitai, A.; Stover, H. *Chem. Mater.* **1994**, *6*(2), 156–159.
- [67] Valsesia, A.; Colpo, P.; Silvan, M.; Meziani, T.; Ceccone, G.; Rossi, F. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1047–1050.
- [68] Neugebauer, S.; Müller, U.; Lohmüller, T.; Spatz, J.; Stelzle, M.; Schuhmann, W. *Electroanalysis* **2006**, *18*(19-20), 1929–1936.
- [69] Denis, F.; Hanarp, P.; Sutherland, D.; Dufrene, Y. *Langmuir* **2004**, *20*(21), 9335–9339.
- [70] Trujillo, N.; Baxamusa, S.; Gleason, K. *Thin Solid Films* **2009**, *517*(12), 3615–3618.
- [71] Valsesia, A.; Colpo, P.; Meziani, T.; Lisboa, P.; Lejeune, M.; Rossi, F. *Langmuir* **2006**, *22*(4), 1763–1767.
- [72] McLellan, J.; Geissler, M.; Xia, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(35), 10830–10831.
- [73] Spatz, J.; Mössmer, S.; Hartmann, C.; Möller, M.; Herzog, T.; Krieger, M.; Boyen, H.; Ziemann, P.; Kabius, B. *Langmuir* **2000**, *16*(2), 407–415.
- [74] Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(22), 8168–8173.
- [75] Mrksich, M.; Whitesides, G. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*(1), 55–78.
- [76] Wahlgren, M.; Arnebrant, T. *TIBITECH* **1991**, *9*(1), 201–208.
- [77] Andrade, J.; Hlady, V.; Wei, A.; Ho, C.; Lea, A.; Jeon, S.; Lin, Y.; Stroup, E. *Clinical Materials* **1992**, *11*(1-4), 67–84.
- [78] Sigal, G.; Mrksich, M.; Whitesides, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(14), 3464–3473.
- [79] Mrksich, M. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*(4), 267–273.
- [80] Byler, D.; Susi, H. *Biopolymers* **1986**, *25*(3), 469–487.
- [81] Susi, H.; Byler, D. *Methods Enzymol.* **1986**, *130*, 290.
- [82] Ball, A.; Jones, R. *Langmuir* **1995**, *11*(9), 3542–3548.
- [83] Buijs, J.; Norde, W.; Lichtenbelt, J. *Langmuir* **1996**, *12*(6), 1605–1613.

- [84] Fringeli, U. *Chimia* **1992**, *46*(5), 200–214.
- [85] Buffeteau, T.; Le Calvez, E.; Desbat, B.; Pelletier, I.; Pezolet, M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*(7), 1464–1471.
- [86] Whitmore, L.; Wallace, B. *Biopolymers* **2008**, *89*(5), 392–400.
- [87] Vermeer, A.; Norde, W. *J. Coll. Interf. Sci.* **2000**, *225*(2), 394–397.
- [88] Shimizu, M.; Kobayashi, K.; Morii, H.; Mitsui, K.; Knoll, W.; Nagamune, T. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2003**, *310*(2), 606–611.
- [89] Karlsson, M.; Martensson, L.; Jonsson, B.; Carlsson, U. *Langmuir* **2000**, *16*(22), 8470–8479.
- [90] Lundqvist, M.; Sethson, I.; Jonsson, B. *Langmuir* **2004**, *20*(24), 10639–10647.
- [91] Giacomelli, C.; Norde, W.; others. *Biomacromolecules* **2003**, *4*(6), 1719–1726.
- [92] Denis, F.; Hanarp, P.; Sutherland, D.; Gold, J.; Mustin, C.; Rouxhet, P.; Dufrene, Y. *Langmuir* **2002**, *18*(3), 819–828.
- [93] Huang, Y.; Gupta, V. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, 2264.
- [94] Sperline, R.; Muralidharan, S.; Freiser, H. *Langmuir* **1987**, *3*(2), 198–202.
- [95] Yokoyama, Y.; Ishiguro, R.; Maeda, H.; Mukaiyama, M.; Kameyama, K.; Hiramatsu, K. *J. Coll. Interf. Sci.* **2003**, *268*(1), 23–32.
- [96] Fink, D.; Hutson, T.; Chittur, K.; Gendreau, R. *Anal. Biochem.* **1987**, *165*(1), 147–154.
- [97] Capadona, J.; Collard, D.; Garcia, A. *Langmuir* **2003**, *19*(5), 1847–1852.
- [98] Michael, K.; Vernekar, V.; Keselowsky, B.; Meredith, J.; Latour, R.; Garcia, A. *Langmuir* **2003**, *19*(19), 8033–8040.
- [99] Goldsby, R.; Kindt, T.; Osborne, B.; Kuby, J. In *Immunology, 5th edition*; Freeman, New York (USA), 2003; pages 148–160.
- [100] Schmid, E.; Keller, T.; Dienes, Z.; Vogel, H. *Anal. Chem.* **1997**, *69*(11), 1979–1985.
- [101] Wertz, C.; Santore, M. *Langmuir* **2001**, *17*(10), 3006–3016.
- [102] Toscano, A.; Santore, M. *Langmuir* **2006**, *22*(6), 2588–2597.
- [103] Li, L.; Chen, S.; Jiang, S. *Langmuir* **2003**, *19*(7), 2974–2982.
- [104] Höök, F.; Rodahl, M.; Brzezinski, P.; Kasemo, B. *Langmuir* **1998**, *14*(4), 729–734.
- [105] Vörös, J. *Biophys. J.* **2004**, *87*(1), 553–561.
- [106] Hemmersam, A.; Foss, M.; Chevallier, J.; Besenbacher, F. *Coll. Surf. B* **2005**, *43*(3-4), 208–215.

- [107] Höök, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H. *Anal. Chem.* **2001**, *73*(24), 5796–5804.
- [108] Weetall, H. *Anal. Chem.* **1974**, *46*(7), 602–615.
- [109] Tischer, W.; Wedekind, F. *Topics Curr. Chem.* **1999**, *200*, 95–126.
- [110] Katchalski-Katzir, E. *Trends Biotechnol.* **1993**, *11*(11), 471–478.
- [111] Sinisterra, J. In *Immobilization of Enzymes and Cells*; Bickerstaff, G., Ed.; Humana Press, Totowa, NY (USA), 1997; pages 327–330.
- [112] Sinisterra, J. In *Immobilization of Enzymes and Cells*; Bickerstaff, G., Ed.; Humana Press, Totowa, NY (USA), 1997; pages 331–338.
- [113] Hossain, M.; Do, D. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *27*(6), 842–851.
- [114] Arroyo, M.; Moreno, J.; Sinisterra, J. *J. Mol. Catal.* **1993**, *83*(1-2), 261–271.
- [115] Gemeiner, P.; Stefuca, V.; Báles, V. *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*(7), 551–566.
- [116] Krajewska, B. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *52*(2), 157–162.
- [117] Gauthier, S.; Vuilleumard, J.; Lizotte, N. *Food Biotechnol.* **1991**, *5*(2), 105–117.
- [118] Ichijo, H.; Nagasawa, J.; Yamauchi, A. *J. Biotechnol.* **1990**, *14*(2), 169–178.
- [119] Beh, S.; Moody, G.; Thomas, J. *The Analyst* **1991**, *116*(5), 459–462.
- [120] Elçin, Y.; Saçak, M. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *60*(1), 19–32.
- [121] Lei, H.; Wang, W.; Chen, L.; Li, X.; Yi, B.; Deng, L. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*(1), 15–21.
- [122] Weetall, H.; Havewala, N.; Pitcher Jr, W.; Detar, C.; Vann, W.; Yaverbaum, S. *Biotechnol. Bioeng.* **1974**, *16*(3), 295–313.
- [123] Kobayashi, A.; Sato, Y.; Mizutani, F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*(11), 2392–2396.
- [124] Hecht, H.; Kalisz, H.; Hendle, J.; Schmid, R.; Schomburg, D. *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*(1), 153–172.
- [125] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureid=1cf3>.
- [126] Wilson, R.; Turner, A. *Biosen. Bioel.* **1992**, *7*(3), 165–185.
- [127] Akhtar, M.; Ahmad, A.; Bhakuni, V. *Biochemistry* **2002**, *41*(22), 7142–7149.
- [128] Atia, K.; El-Batal, A. *J. of Chem. Technology* **2005**, *80*(7), 805–811.
- [129] Pescador, P.; Katakis, I.; Toca-Herrera, J.; Donath, E. *Langmuir* **2008**, *24*, 14108–14114.
- [130] Lottspeich, F. *Bioanalytik*; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998.

- [131] Hollas, J. *Moderne Methoden in der Spektroskopie; Friedr; Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig - Wiesbaden, 1995.*
- [132] Griffiths, P.; De Haseth, J. *Fourier transform infrared spectroscopy; Wiley Interscience, New York, 1986.*
- [133] Butz, T. *Fouriertransformation für Fußgänger; Vieweg & Teubner Verlag, 2005.*
- [134] Kauppinen, J.; Moffatt, D.; Mantsch, H.; Cameron, D. *Applied Spectroscopy* **1981**, 35(3), 271–276.
- [135] Bergmann, L.; Schaefer, C. *Lehrbuch der Experimentalphysik: Optik; Walter de Gruyter, Berlin, 1998.*
- [136] Fick, J. *Charakterisierung von biokompatiblen Oberflächen mittels Vibrations-Summenfrequenzspektroskopie und Neutronenreflektometrie* Doktorarbeit, Universität Heidelberg, **2005**.
- [137] Goos, F.; Hänchen, H. *Annalen der Physik* **1947**, 436(7-8), 333–346.
- [138] Harrick, N. *Internal reflectance spectroscopy; Harrick Scientific Corporation, New York, 1967.*
- [139] Arrondo, J.; Muga, A.; Castresana, J.; Goni, F. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1993**, 59(1), 23.
- [140] Barth, A. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, 74(3-5), 141–173.
- [141] Cauchy, L. *Bull. Sc. Math.* **1830**, 14(9).
- [142] Reimer, L.; Pfefferkorn, G. *Rasterelektronenmikroskopie; Springer Verlag, Heidelberg, 1977.*
- [143] Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56(9), 930–933.
- [144] Nicomp 380 zls benutzerhandbuch.
- [145] Wedler, G. *Lehrbuch der physikalischen Chemie; Wiley VCH, Weinheim, 1985.*
- [146] Michov, B. *Elektrophorese: Theorie und Praxis; Walter de Gruyter, Berlin, 1996.*
- [147] Albert, G. Diplomarbeit, Universität Heidelberg, **1996**.
- [148] Bendayan, M. *Prog. Histochemi. Cytochem.* **1995**, 29(4), 1.
- [149] Kern, W.; Vossen, J. *Thin film processes; Academic Press, New York, 1978.*
- [150] Han, S.; Ashurst, W.; Carraro, C.; Maboudian, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(10), 2422–2425.
- [151] Matyjaszewski, K.; Xia, J. *Chem. Rev.* **2001**, 101(9), 2921–2990.
- [152] Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A.; Randall, R.; others. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193(1), 265–275.

- [153] Himmelhaus, M.; Takei, H. *Sens. Actuators B* **2000**, *63*(1-2), 24–30.
- [154] Hamaker, H. *Physica* **1937**, *4*(10), 1058–1072.
- [155] Feke, D.; Prabhu, N.; Mann Jr, J.; Mann III, J. *J. Phy. Chem.* **1984**, *88*(23), 5735–5739.
- [156] French, R.; Cannon, R.; DeNoyer, L.; Chiang, Y. *Solid State Ionics* **1995**, *75*, 13–33.
- [157] Das, S.; Sreeram, P.; Raychaudhuri, A. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 035501.
- [158] Bergström, L. *Adv. Coll. Interf. Sci.* **1997**, *70*, 125–169.
- [159] Heinz, H.; Koerner, H.; Anderson, K.; Vaia, R.; Farmer, B. *Chem. Mater.* **2005**, *17*(23), 5658–5669.
- [160] Heinz, H.; Vaia, R.; Farmer, B.; Naik, R. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*(44), 17281–17290.
- [161] Hoggard, J.; Sides, P.; Prieve, D. *Langmuir* **2005**, *21*(16), 7433–7438.
- [162] Pine, S.; Hendrickson, J.; Cram, D.; Hammond, G. *Organische Chemie*; Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1987.
- [163] Roth, C.M., L. A. *Langmuir* **1993**, *9*(4), 962–972.
- [164] Burley, S.; Petsko, G. *Science* **1985**, *229*(4708), 23.
- [165] Wohlfahrt, G.; Witt, S.; Hendle, J.; Schomburg, D.; Kalisz, H.; Hecht, H. *Acta Cryst.* **1999**, *55*(5), 969–977.
- [166] Pauling, L.; Corey, R.; Branson, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **1951**, *37*(4), 205–211.
- [167] Ma, H.; Li, D.; Sheng, X.; Zhao, B.; Chilkoti, A. *Langmuir* **2006**, *22*(8), 3751–3756.
- [168] Stadler, V.; Beyer, M.; König, K.; Nesterov, A.; Torralba, G.; Lindenstruth, V.; Hausmann, M.; Bischoff, F.; Breitling, F. *J. Prot. Res.* **2007**, *6*(8), 3197–3202.
- [169] Daniel, M.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*(1), 293–346.
- [170] Quinn, B.; Liljeroth, P.; Ruiz, V.; Laaksonen, T.; Kontturi, K. *J. Am. Chem. Soc* **2003**, *125*(22), 6644–6645.
- [171] Yao, T.; Rechnitz, G. *Biosen.* **1988**, *3*(5), 307–312.
- [172] Blackburn, R.; Harvey, A. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*(14), 4034–4039.
- [173] Walter, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, *128*(3), 504–509.
- [174] Riedel, E. *Allgemeine und Anorganische Chemie*; Walter de Gruyter, Berlin, 2010.
- [175] Degani, Y.; Heller, A. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*(6), 1285–1289.

- [176] Hartstein, A.; Kirtley, J.; Tsang, J. *Phys. Rev. Lett.* **1980**, *45*(3), 201–204.
- [177] Song, Y., L. X. D. X. *Eur. Resp. J.* **2009**, *34*(3), 559.
- [178] <http://www.bfr.bund.de/cd/7744>.

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Ich habe an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt.

Heidelberg, 16. Februar 2011