

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-mathematischen Fakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Chemikerin

Petra Bücken

aus Ascheberg / Westf.

Tag der mündlichen Prüfung: 22. März 2007

Integration von Rezeptoren in
inerte Matrices zur
markierungsfreien und quantitativen Detektion
biospezifischer Wechselwirkungen mit
LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen

Gutachter:

PD Dr. rer. nat. Reiner Dahint

Prof. Dr. Motomu Tanaka

Inhaltsverzeichnis

Abstract	xv
Kurzfassung	xvii
I EINLEITUNG.....	1
1 Hintergrund und Motivation	2
2 Zielsetzung und Gliederung.....	5
II THEORETISCHER TEIL.....	7
II.I Proteinresistente Oberflächenbeschichtungen.....	8
1 Oberflächen in der Biomaterialwissenschaft	8
2 Proteinresistente Oberflächenbeschichtungen.....	9
2.1 Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche	10
2.1.1 Struktur und Stabilität der Proteine	11
2.1.2 Wechselwirkungskräfte zwischen Protein und Oberfläche.....	13
2.2 Proteinresistente Beschichtungen auf PEG-Basis	15
2.2.1 Physikochemische Eigenschaften und Verwendung des PEGs	15
2.2.2 Methoden zur Oberflächen-Modifizierung mit PEG.....	17
2.2.3 Mechanismen der Proteinresistenz PEG-beschichteter Oberflächen	19
2.2.4 Mechanismen der Proteinadsorption.....	21
II.II Oberflächenplasmonenresonanz.....	23
1 Propagierende Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).....	23
1.1 Theoretische Grundlagen der Oberflächenplasmonenresonanz	23
1.1.1 Anregung nichtstrahlender Oberflächenplasmonen	23
1.1.2 Bestimmung der Resonanzwellenlänge	27
1.1.3 Eindringtiefe und Testtiefe.....	27
1.1.4 Berechnung der Reflektivitäten eines Mehrschichtsystems	28
1.1.5 Anregungs- und Detektionsmöglichkeiten	29
1.2 Einsatz von SPR in der biomedizinischen Diagnostik	30
1.3 Quantitative Detektion mittels SPR	31

1.3.1	Abhängigkeit der SPR-Antwort vom umgebenden Brechungsindex	31
1.3.2	SPR-Antwort bei einer Monolage einheitlicher Dicke	32
1.3.3	Schichtdickenbestimmung	33
1.3.4	Abschätzung der Abschwächungswellenlänge l_d	33
1.3.5	SPR-Antwort von Multilayer-Strukturen	34
1.3.6	Korrekturen bei uneinheitlichem Bedeckungsgrad	35
1.4	Vor- und Nachteile konventioneller SPR-Spektroskopie	36
2	Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR)	38
2.1	Partikelplasmonen (Lokalisierte Oberflächenplasmonen)	38
2.2	Optische Eigenschaften von massivem Gold	39
2.2.1	Drude-Sommerfeld Modell	40
2.3	Optische Eigenschaften kolloidaler Goldpartikel	42
2.3.1	Grundlagen	42
2.3.2	Mie-Theorie	42
2.3.2.1	Quasistatische Näherung (Rayleigh-Näherung)	44
2.3.2.2	Einfluss der Nanopartikelkonzentration in flüssiger Phase	45
2.3.2.3	Resonanzverschiebung durch molekulare Bindungsereignisse	48
2.3.3	Einfluß von Partikelgröße und -form auf die LSPR-Antwort	51
2.3.4	LSPR-Antwort bei Adsorption auf einem festen Träger	52
2.4	Optische Eigenschaften der Core-Shell-Partikel	53
2.4.1	Anwendung der Mie-Theorie auf Kern/Hülle-Partikel	53
2.4.2	„Optische Vorteile“ von Kern/Hülle-Partikeln	54
2.5	Einsatz von LSPR in der biomedizinischen Diagnostik	55
2.5.1	Detektion mit LSPR in Lösung	56
2.5.2	LSPR auf festen Trägersystemen	57
2.6	Quantitative Detektion mit LSPR-aktiven Nanosensor-Oberflächen	60
3	Gesamtüberblick: SPR vs. LSPR	62
4	LSPR-aktive Oberflächen durch Beschichtung mit Core-shell-Partikeln	64
4.1	Core-Shell-Partikel	64
4.1.1	Herstellung von Core-Shell-Partikeln durch Layer-by-Layer-Technik	65
4.1.2	Grundlagen kolloidaler Stabilität	66
4.2	Beschichtung von Oberflächen mit kolloidalen und Core-Shell-Partikeln	68
4.2.1	Strukturierte Beschichtungen von kolloidalen und Core-Shell-Partikeln	70
4.3	Optische Eigenschaften Oberflächen-adsorbierter Core-shell-Partikel	72
4.4	Anforderungen zur Anwendung in der biomedizinischen Diagnostik	76
4.4.1	Proteinresistente Oberflächenbeschichtungen	76

4.4.2	Quantifizierung biospezifischer Wechselwirkungen	77
II.III	Grundlagen der analytischen Methoden	79
1	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS).....	79
1.1	Prinzip	79
1.2	Chemische Verschiebung	79
1.2.1	Multipllett-Aufspaltung.....	80
1.3	Quantitative Analyse	81
1.3.1	Schichtdickenbestimmung.....	83
1.3.2	Molekulare Zusammensetzung der Adsorbatschicht	84
2	Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie (IRRAS)	85
2.1	Grundlagen der IR-Spektroskopie.....	85
2.1.1	IR-Spektroskopie an Metalloberflächen	86
3	Spektrale Ellipsometrie (SE)	88
3.1	Auswertung der Ellipsometrie-Messungen.....	90
4	Immunoassays	92
4.1	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	94
4.1.1	Quantifizierung der immobilisierten Proteinmenge.....	96
II.IV	Selbstaggregierende Monolagen	100
1	Struktureller Aufbau	101
2	Adsorption von Thiolverbindungen auf Goldoberflächen.....	102
III	EXPERIMENTELLER TEIL	104
1	Materialien	105
1.1	Allgemeine Angaben	105
1.2	Reagenzien zur Synthese der funktionalisierten Polyethylenglykol-Thiole ..	105
1.3	Reagenzien zur Präparation der Nanopartikeloberflächen	106
1.4	Zur Oberflächenmodifizierung eingesetzte Chemikalien.....	106
1.5	Biochemikalien	106
1.6	Verwendete Pufferlösungen.....	107
2	Geräte.....	108

3	Analytik	108
3.1	NMR-Spektroskopie	108
3.2	Massenspektroskopie.....	108
3.3	Elementaranalyse (EA)	108
3.4	Röntgen-Photoemissions-Spektroskopie (XPS).....	109
3.4.1	Analyse der XP-Signale.....	110
3.4.1.1	Normierung.....	110
3.4.1.2	Untergrundkorrektur	110
3.4.1.3	Signalanpassung	110
3.5	Fourier-transformierte Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie	111
3.6	Ellipsometrie	111
3.7	UV-Spektroskopie	112
3.8	Fluoreszenzscanner	112
3.9	Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR).....	112
3.10	LSPR-Imaging	113
4	Durchführung.....	114
4.1	Synthese der endgruppenfunktionalisierten Polyethylenglykol-Thiole	114
4.1.1	Synthese der COOH-terminierten PEG-Thiole	115
4.1.1.1	Synthese von EG36COOH.....	116
4.1.1.2	Synthese von EG30COOH.....	119
4.1.1.3	Synthese von EG22COOH.....	121
4.1.1.4	Synthese von EG15COOH.....	123
4.1.2	Synthese der OH-terminierten PEG-Thiole	125
4.1.2.1	Synthese von EG22OH	125
4.1.2.2	Synthese von EG13OH	128
4.1.3	Synthese der NH ₂ -terminierten PEG-Thiole	130
4.1.3.1	Synthese von EG40NH ₂	131
4.1.3.2	Synthese von EG31NH ₂	134
4.1.3.3	Synthese von EG17NH ₂	136
4.2	Präparation der optisch aktiven Nanopartikeloberflächen	139
4.2.1	Verwendetes Trägersystem.....	139
4.2.2	Zur Adsorption verwendete Nanopartikel-Lösung	139
4.2.3	Beschichtung der Oberflächen mit Nanopartikeln	140
4.2.4	Stromlose Goldabscheidung	140
4.3	Allgemeine Vorschriften zur Oberflächenmodifikation.....	141
4.3.1	Präparation von Thiolmonolagen auf Gold-beschichteten Substraten .	141
4.3.2	Funktionalisierung OH-terminierter Oberflächen mit β -Alanin	142
4.3.3	Kopplung von Antikörpern an funktionalisierte Oberflächen.....	143

4.3.3.1	COOH-terminierte Oberflächen.....	143
4.3.3.2	NH ₂ -terminierte Oberflächen.....	144
4.3.4	Integration von Peptiden in aminoterminierte Oberflächen und deren biomolekulare Erkennung	144
4.3.4.1	Einführung des bifunktionellen Linkers SMCC.....	144
4.3.4.2	Kopplung Cystein-terminierter Peptide an Maleimido- funktionalisierte Oberflächen.....	144
4.3.4.3	Umsatz mit dem spezifischen und POD-markierten Sekundär-Antikörper	145
4.3.4.4	Umsatz mit dem spezifischen und fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper	145
4.3.5	ELISA-Assay	146
4.3.5.1	Substratpufferlösung für ELISA.....	146
4.3.5.2	Bestimmung des Eichwertfaktors EF der POD-markierten Antikörper	146
4.3.5.3	ELISA an beschichteten Substraten	147
4.4	Verwendung Gold-bedampfter Si-Wafer als Trägersystem	148
4.4.1	Antikörper-Bindungsstudien / Antikörper-Antigen-Assays.....	148
4.4.2	Proteinresistenz-Studien	148
4.4.2.1	Behandlung mit einer Fibrinogen-Lösung.....	148
4.4.2.2	Behandlung mit Blutplasma	149
4.4.3	Integration von Peptiden und deren biomolekulare Erkennung	149
4.4.4	Filmbildungskinetik in Abhängigkeit vom Gasgehalt	150
4.5	Verwendung LSPR-aktiver Nanopartikeloberflächen als Trägersystem	150
4.5.1	Eichwertbestimmung durch Adsorption von Alkanthiolen verschiedener Kettenlänge.....	150
4.5.2	Eichwertbestimmung durch Adsorption von PEG-Thiolen verschiedener Kettenlänge.....	151
4.5.3	Flächige Biofunktionalisierungen.....	151
4.5.3.1	Durchführung von Antikörper-Antigen-Assays.....	151
4.5.3.2	Durchführung von Peptid-Assays.....	152
4.5.3.3	Refunktionalisierung nach oxidativem Abbau organischer Monolagen	153
4.5.4	Strukturierte Biofunktionalisierungen.....	153
4.5.4.1	Einbau von Peptid-Arrays	153
4.5.5	Photochemische Strukturierung	154
4.5.5.1	Kopplung von Antikörpern an eine photochemisch strukturierte EG31NH ₂ -Monolage und Blockieren mit BSA.....	154
4.5.5.2	Kopplung von Antikörpern an eine photochemisch strukturierte EG31NH ₂ -Monolage und Füllen der Photolöcher mit EG22OH.....	155
4.5.5.3	Kopplung von Peptidpitopen an eine photochemisch strukturierte EG31NH ₂ -Monolage und Blockieren mit BSA.....	155

IV ERGEBNISSE u. DISKUSSION 156

IV.I Endgruppenfunktionalisierte PEG-Beschichtungen 157

4	Proteinbindungskapazität und Resistenz gegenüber unspezifischer Proteinadsorption.....	157
1.1	Zielsetzung und Methoden	158
1.1.1	Antikörper-Bindungsstudien	160
1.1.1.1	COOH-terminierte PEG-Beschichtungen	160
1.1.1.2	NH ₂ -terminierte PEG-Beschichtungen	161
1.1.2	Resistenz gegenüber unspezifischer Protein-Adsorption.....	161
1.1.2.1	Behandlung mit einer konzentrierten Fibrinogenlösung.....	161
1.1.2.2	Behandlung mit Blut-Plasma	162
1.1.3	Quantifizierung der Proteinbindungs- und der unspezifischen Adsorptionsrate	162
1.1.3.1	FT-IR-Spektroskopie	162
1.1.3.2	Ellipsometrie	163
1.1.3.3	XP-Spektroskopie.....	164
1.1.3.4	Enzymkinetische ELISA-Messungen	165
1.2	Antikörper-Bindungsstudien	167
1.2.1	Carboxy-terminierte PEG-Beschichtungen.....	167
1.2.1.1	FT-IR-Messungen.....	167
1.2.1.2	Ellipsometrie-Messungen	173
1.2.1.3	Enzymkinetische ELISA-Messungen	176
1.2.1.4	Röntgenphotoelektronenspektroskopie.....	178
1.2.1.5	Fazit.....	185
1.2.2	Amino-terminierte PEG-Beschichtungen.....	186
1.2.2.1	FT-IR-Messungen.....	186
1.2.2.2	Ellipsometrie-Messungen	190
1.2.2.3	Enzymkinetische ELISA-Messungen	193
1.2.2.4	Röntgenphotoelektronenspektroskopie.....	195
1.2.3	Gesamtbetrachtung zu den Antikörper-Bindungsstudien	201
1.3	Resistenz gegenüber unspezifischer Proteinadsorption	203
1.3.1	FT-IR-Messungen.....	204
1.3.2	Ellipsometrie-Messungen	214
1.3.3	Röntgenphotoelektronenspektroskopie	220
1.3.4	Gesamtbetrachtung zu den Proteinresistenzstudien	232
1.4	Zusammenfassende Diskussion	234

2	Einfluss des Funktionsdichte auf die unspezifische Proteinadsorption	242
2.1	Aminoterminierte PEG-Beschichtungen.....	243
2.1.1	Ellipsometrie-Messungen	243
2.1.2	Röntgenphotoelektronenspektroskopie.....	246
2.2	Carboxy-terminierte PEG-Beschichtungen	252
2.2.1	Ellipsometrie-Messungen	253
2.3	Gesamt Betrachtung.....	255
3	Integration von Peptid-Assays.....	259
3.1	EG31NH ₂ -terminierte Oberflächen	259
3.1.1	FT-IR-Messungen	261
3.1.2	Ellipsometrie-Messungen	263
3.1.3	Enzymkinetische ELISA-Messungen	265
3.1.4	Röntgenphotoelektronenspektroskopie.....	265
3.2	Fazit zur Integration von Peptid-Assays.....	268
4	Einfluss des gelösten Gases in der Adsorptionslösung auf die Filmbildungskinetik.....	271
4.1	Bisheriger Kenntnisstand	271
4.1.1	Ellipsometrie-Messungen	273
4.2	Gesamt Betrachtung.....	278
IV.II	LSPR-aktive Nanopartikeloberflächen	279
1	Verwendetes System	279
1.1	Theoretische Grundlagen der Herstellung	279
1.2	Charakteristische optische Eigenschaften	280
2	Bestimmung von Eichwertfaktoren zur quantitativen Detektion.....	282
2.1	Zielsetzung und Methoden.....	283
2.1.1	Bestimmung des Bedeckungsgrades θ adsorbierter Alkanthiol-Monolagen.....	283
2.1.2	Bestimmung des Bedeckungsgrades θ adsorbierter PEG-Monolagen.....	284
2.1.3	Bestimmung des Schichtdickenbeitrags k adsorbierter Alkanthiole	284
2.1.4	Charakterisierung der Nanopartikeloberflächen	285
2.1.4.1	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS).....	285
2.1.4.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	287

2.2	Eichwertbestimmung durch Adsorption von Alkanthiolen.....	288
2.2.1	LSPR-Messungen	288
2.2.2	Röntgenphotoelektronenspektroskopie	292
2.3	Eichwertbestimmung durch Adsorption von Oligo- und Polyethylenglykol-Thiolen.....	303
2.3.1	LSPR-Messungen	303
2.3.2	Röntgenphotoelektronenspektroskopie	308
2.4	Fazit zu den Eichwertmessungen	322
3	Detektion biospezifischer Wechselwirkungen.....	324
3.1	Detektion von Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen	324
3.1.1	Verwendung nicht-proteinresistenter Matrices	324
3.1.1.1	Antikörper-Kopplung an C15COOH-terminierte Oberflächen	325
3.1.1.2	Antikörper-Kopplung an C11NH ₂ -terminierte Oberflächen	334
3.1.1.3	Antikörper-Kopplung an β -Alanin funktionalisierte Oberflächen	343
3.1.1.4	Gesamtbetrachtung	351
3.1.2	Verwendung proteinresistenter PEG-Matrices	354
3.1.2.1	Antikörper-Kopplung an EG30COOH-terminierte Oberflächen.....	354
3.1.2.2	Antikörper-Kopplung an EG17NH ₂ -terminierte Oberflächen	360
3.1.2.3	Antikörper-Kopplungen an EG31NH ₂ -terminierte Oberflächen	366
3.1.2.4	Gesamtbetrachtung.....	371
3.2	Integration von Peptid-Assays in die optisch aktiven Oberflächen.....	374
3.2.1	Integration von Peptidepitopen in EG31NH ₂ -terminierter Basisfilme ...	375
4	LSPR-Imaging strukturierter Beschichtungen.....	391
4.1	Spotten von Peptid-Arrays.....	391
4.1.1	EG31NH ₂ -terminierte Basisfilme.....	391
4.1.1.1	Fluoreszenzscanning.....	392
4.1.1.2	LSPR-Imaging	393
4.1.2	EG17NH ₂ -terminierte Basisfilme.....	394
4.1.2.1	Fluoreszenzscanning.....	394
4.1.2.2	LSPR-Imaging	395
4.1.3	Fazit zur Integration von Peptidarrays.....	395
4.2	Photochemische Strukturierung	396
4.2.1	Vorversuche	397
4.2.1.1	Ermittlung der optimalen Bestrahlungsdauer	397
4.2.1.2	Re-Funktionalisierung nach oxidativer Desorption von Thiol-Monolagen.....	402
4.3	Photochemische Strukturierung und anschließende Biofunktionalisierung..	417
4.3.1	Kopplung von Antikörpern nach Blockierung mit BSA.....	418
4.3.2	Kopplung von Peptid-Epitopen nach Blockierung mit BSA	422
4.3.3	Kopplung von Antikörpern nach Refunktionalisierung mit EG22OH.....	426

4.3.4	Fazit zu den photochemischen Strukturierungen	430
-------	---	-----

V Zusammenfassung und Ausblick..... 431

1	Zusammenfassung	432
1.1	Polymere Ethylenglykol-Beschichtungen	433
1.1.1	Proteinresistenz und Bindungskapazität	433
1.2	LSPR-aktive Nanopartikeloberflächen	435
1.2.1	Eichwertfaktoren zur quantitativen Detektion	435
1.2.2	Detektion und Quantifizierung biomolekularer Wechselwirkungen	435
1.2.3	LSPR-Imaging strukturierter Oberflächenbeschichtungen	436
2	Ausblick	438
2.1	Proteinresistente PEG-Beschichtungen	438
2.2	LSPR-aktive Nanopartikeloberflächen	438

Literaturverzeichnis	440
-----------------------------------	------------

Abkürzungsverzeichnis	449
------------------------------------	------------

Abstract

The present work describes the preparation of optically active nanoparticle layers and their application as a label-free detection tool in immunodiagnosics.

The sensor surface consists of surface-adsorbed core-shell particles (nanoparticles with a dielectric core and a metal shell) and shows pronounced optical extinctions in the visible range of the electromagnetic spectrum, which are due to a combined excitation of localized and propagating surface plasmons. Since the peak position of the excitations depends very sensitively on changes of the refraction index in the vicinity of the surface, the nanoparticle layers can be used for the label free and quantitative detection of binding events.

Due to a combined excitation of localized and propagating surface plasmons, these surfaces show higher optical extinctions (increase up to three orders of magnitude) compared to isolated metal nanoparticles, leading to an improved signal to noise ratio as well as an enhanced sensitivity towards changes of their direct nano-environment. Concerning the adsorption of organic molecules, the resonance-shift can be increased fivefold with respect to established biosensors based on conventional surface plasmon resonance (SPR). In addition, the ratio of the core- to shell-radii offers another parameter by which the resonance position can be varied within the whole visible regime. Thus, it can be deliberately shifted outside the adsorption window of the respective solvent (e.g. buffer solution, plasma or whole blood) in order to avoid interference.

By means of appropriate calibration measurements and antibody-binding studies it has been shown, that - analogous to conventional SPR – a linear relationship exists between the sensor response (i.e. the wavelength shift of the extinction peak) and the surface mass density or thickness of the adsorbed layers in the examined regime of surface mass densities up to 600 ng/cm^2 and average film thicknesses of 75 \AA (with local maxima around 24 nm). These calibration factors could be used in various immunodiagnostic assays (antibody-antigen-, peptide-antibody-assays) for a label-free and quantitative detection of binding events. Thereby, very good agreement was obtained between the localized surface plasmon (LSPR) based determination of surface mass densities and layer thicknesses and the ones measured by other analytical methods such as x-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA).

Compared to conventional SPR, these nanoparticle systems show further advantages, mainly concerning the integration of this detection technique into a microarray format. The opportunity to achieve much higher lateral resolution as well as the simple detection scheme suggest a direct application in highly parallelised and miniaturised biochips (protein-, peptide-

and DNA-chips), in which multiple binding events can be read out simultaneously (by use of CCD-cameras) on small scale.

To demonstrate such applications, the nanosensor surfaces were functionalised with photochemically structured surface coatings and the resulting pattern was visualized using LSPR-imaging. Additionally, fluorescence images have been taken from the surface after an appropriate labelling of the generated structures. These images showed very good correspondence to the LSPR-images with respect to the geometry and dimensions of the photo-generated pattern.

Since the specific detection and quantification of biomolecular interactions requires the suppression of non-specific binding events, another focus of this work was placed on the preparation of protein-resistant polyethylene(glycol) (PEG) coatings with appropriate functionalities for the integration of typically used immunodiagnostical receptors while effectively suppressing non-specific adsorption processes.

For that purpose, endgroup-functionalized (OH, COOH, NH₂) PEG-thiols with different chain lengths were synthesized and adsorbed onto gold coated silicon wafers for determination of their binding capacity and protein resistance.

Independent of the kind of termination, a strong dependence of the resistance on the chain length was found, whereby an increasing ethylene glycol (EG) content resulted in enhanced protein repulsion. Additionally, a strong impact of the chemical end group of the PEG thiols on the adsorption behaviour was revealed. Regarding the functional termination, the following order of protein resistance was found: NH₂ < COOH << OH.

Thus, independent of the chain length, effective protein repulsion requires electrostatic neutrality of the generated surface coating. In case of proteolytic matrix functionalities, higher adsorption rates occur in case of positive charges (protonated amino groups) due to enhanced electrostatic interactions with proteins, which usually exhibit negative net charges.

Furthermore, it could be shown that an increasing protein resistance is associated with a decreasing antibody coupling capacity. Hence, an appropriate balance between protein resistance and receptor density has to be chosen in immunodiagnostical applications by carefully selecting the type of endgroup and the chain length of the respective PEG layer.

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Präparation und den Einsatz optisch aktiver Nanopartikeloberflächen in der Immundiagnostik.

Diese Sensoroberflächen bestehen aus oberflächen-adsorbierten Core-shell Partikeln (Nanopartikel mit einem dielektrischen Kern und einer metallischen Hülle) und zeigen ausgeprägte Resonanzen im sichtbaren Spektralbereich, die auf eine Anregung von sowohl lokalisierten als auch propagierenden Oberflächenplasmonenresonanzen zurückgeführt werden können. Da die Resonanzlage empfindlich gegenüber Änderungen des umgebenden Brechungsindex reagiert, kann sie zu einer markierungsfreien Detektion und Quantifizierung von Bindungsereignissen eingesetzt werden.

Durch die kombinierte Anregung von lokalisierten und propagierenden Plasmaschwingungen resultieren im Vergleich zur konventionellen SPR sowohl höhere optische Extinktionswerte (Steigerung um etwa 3 Größenordnungen), die ein verbessertes Signal/Rausch-Verhältnis zur Folge haben, als auch eine höhere Sensitivität gegenüber Änderungen der dielektrischen Eigenschaften ihrer unmittelbaren Umgebung; bezüglich der Adsorption von Oktadekanthiol konnte eine etwa 5-fache Sensitivitätssteigerung erzielt werden. Zudem bietet das Dickenverhältnis von Kern/Schale einen weiteren Parameter, durch den die Resonanzlage über den gesamten sichtbaren Bereich verschoben und somit gezielt außerhalb des Absorptionsfensters von Störkomponenten platziert werden kann.

Anhand geeigneter Kalibrationsmessungen und Bindungsstudien wurde gezeigt, dass analog zur konventionellen SPR in dem analysierten Bereich von Massenbelegungen bis hin zu 600 ng/cm^2 und einer lateral gemittelten Schichtdicke von 75 \AA (lokale Maximalwerte $\sim 24 \text{ nm}$) keine Minderung der Sensorantwort eintritt und eine lineare Beziehung zur Resonanzverschiebung besteht.

In verschiedenen immunodiagnostischen Anwendungen (Antikörper-Antigen-, Peptid-Antikörper-Assays) konnten die Bindungsereignisse daher nicht nur detektiert, sondern mittels der zuvor bestimmten Eichwertfaktoren auch quantifiziert werden, wobei eine gute Übereinstimmung zu den anhand anderer Analysemethoden (XPS, ELISA) erhaltenen Massenbelegungen und Schichtdicken erhalten wurde.

Im Vergleich zur konventionellen SPR besitzen diese Systeme weitere Vorteile, die vor allem einen Einsatz im Mikroarray-Format betreffen. Die Möglichkeit zu einer sehr viel höheren lateralen Auflösung (theoretisch im Nanometerbereich) sowie die technisch einfache Art der markierungsfreien Detektion sprechen für einen direkten Einsatz in hoch parallelisierten und miniaturisierten Biochips (DNA-, Peptid- und Protein-Arrays), in denen eine Vielzahl an Bin-

dungsereignissen orts aufgelöst und simultan (bei Einsatz einer CCD-Kamera) bestimmt werden können.

Zur Demonstration einer solchen Applikation wurden photochemisch strukturierte Oberflächenbeschichtungen erzeugt und mittels LSPR-Imaging ausgelesen; diese wurden anschließend fluoreszenzspektroskopisch visualisiert, wobei eine gute Übereinstimmung bezüglich Geometrie und Ausmaße der erzeugten Strukturen erhalten wurde.

Eine eindeutige Detektion und Quantifizierung biomolekularer Wechselwirkungen setzt jedoch die Spezifität der beobachteten Bindungsereignisse voraus. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit betraf daher die Erzeugung von Oberflächenbeschichtungen auf Polyethylenglykolbasis, die geeignete Funktionalitäten zu einer Integration von Rezeptoren für immundiagnostische Anwendungen aufweisen, eine unspezifische Adsorption jedoch weitgehend unterdrücken.

Hierzu wurden endgruppenfunktionalisierte (OH, COOH, NH₂) Polyethylenglykolphiole unterschiedlicher Kettenlängen (15 – 40 EG-Einheiten) synthetisiert und nach der Adsorption auf Au-bedampften Si-Wafern hinsichtlich ihrer Bindungskapazität und Proteinresistenz untersucht.

Unabhängig von der Art der Terminierung ergab sich eine deutliche Abhängigkeit der Resistenz von der Kettenlänge, wobei mit zunehmender EG-Anzahl ein Anstieg der Proteinresistenz beobachtet wurde. Aber auch die Endgruppe zeigte einen entscheidenden Einfluss auf die Adsorptionsrate; bezüglich der funktionellen Terminierung konnte folgende Resistenzreihe aufgestellt werden: NH₂ < COOH << OH.

Unabhängig von der Kettenlänge erfordert vollständige Proteinresistenz eine elektrostatische Neutralität der erzeugten Beschichtung. Im Fall durch Protolyse geladener Oberflächenfunktionalitäten resultieren höhere Adsorptionsraten bei positiver Ladung (protonierte Aminogruppen), die auf verstärkte Wechselwirkungen mit den üblicherweise negativ geladenen Proteinen zurückgeführt werden können.

Weiterhin zeigte sich, dass eine Zunahme der Proteinresistenz mit einer abnehmenden Antikörper-Bindungsrate verbunden ist. In immunodiagnostischen Anwendungen muss daher über die Parameter der Endgruppenfunktionalität und Kettenlänge ein geeigneter Kompromiss zwischen Proteinresistenz und Rezeptor-Dichte eingestellt werden.

Kapitel I

Einleitung

1 Hintergrund und Motivation

Die fortschreitende Entwicklung auf verschiedenen Forschungsgebieten lässt sich mit den beiden Schlagworten der Miniaturisierung und Parallelisierung beschreiben.

Die Miniaturisierung und Parallelisierung vieler Prozesse bildet die Basis für die Bearbeitung und Analyse einer Vielzahl an Proben in hohem Durchsatz, so dass sich viele der neu entwickelten Technologien in diese Richtung hin konzentrieren. Die wesentlichen Vorteile dieses Konzepts betreffen neben einem hohen Probendurchsatz eine enorme Reduzierung von Kosten sowie von Probenmaterial und Zeitaufwand.

Bedeutenden Einsatz findet die Mikroarray-Technologie z.B. in der Genom- und Transkriptions-Analyse (DNA-Chips, Peptid- und Protein-Arrays), wo sie die Basis für eine simultane Analyse der Veränderung der Genexpression einer großen Anzahl von Genen in einem einzigen Experiment sowie die Entdeckung von molekularen Netzwerken und Markern für viele biologische Anwendungen darstellt.

Aber auch in der kombinatorischen Chemie, insbesondere in der Katalysatorforschung, zeichnet sich ein zunehmender Trend in diese Richtung ab, um ein schnelles und paralleles Testen der im kombinatorischen Ansatz erzeugten Verbindungen zu ermöglichen.

Eine erfolgreiche Implementierung des Array-Ansatzes erfordert jedoch auch eine geeignete Technologie zur ortsauflösenden Detektion der in den Anwendungen induzierten chemischen Änderungen, wie z.B. von Bindungsprozessen oder entstandener Reaktionsprodukte.

Auf dem Gebiet der Immundiagnostik werden biomolekulare Wechselwirkungen gewöhnlich indirekt, d.h. durch die Umsetzung mit einer zweiten markierten Spezies nachgewiesen. Als Markierungsreagenzien werden häufig Fluorophore, Enzyme, radioaktive Markierungen und Goldnanopartikel eingesetzt und die Bindungsmuster über den Einsatz von CCD-Kameras, mikroskopischen Scan-Einheiten (z.B. Messung der Fluoreszenz) und autoradiographischen Filmen ausgelesen. Obwohl diese Methoden bereits gut etabliert sind und niedrige Detektionsgrenzen aufweisen, ist ihre laterale Auflösung jedoch begrenzt (maximal im Bereich von etwa 10 μm). Vor allem aber die notwendige Einführung einer Markierung und die mit der indirekten Art der Detektion verbundenen zusätzlichen Bindungs- und Waschschriffe sind zeit- und kostenaufwendig. Eine Markierung bedeutet zudem eine chemische Änderung, die unter Umständen eine Funktionsänderung des betreffenden Systems zur Folge haben kann. Aus den genannten Gründen sind daher markierungsfreie Detektionsmethoden zu bevorzugen; diese erlauben überdies eine in-situ Detektion und somit auch kinetische Messungen. Eine markierungsfreie Detektion von Bindungsereignissen kann z.B. mit Hilfe der SPR-Spektroskopie erfolgen, die auf diesem Gebiet bereits gut etabliert und kommerziell verfügbar ist (Biacore-Systeme); sie beruht auf der durch Bindungsereignisse induzierten Resonanzverschiebung angeregter (propagierender) Oberflächenplasmonen. Ihr Einsatz im

Array-Format ist jedoch bisher eher die Seltenheit. Dies kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass eine Miniaturisierung mit höherem technischen Aufwand verbunden ist (Einsatz von CCD-Kameras, ggf. von Interferenzeinheiten) und hohe Anforderungen an die Homogenität der eingesetzten Oberflächen stellt. Zudem ist die laterale Auflösung dieser Methode durch die mittlere freie Ausbreitungslänge der Elektronen (Oberflächenplasmonen) auf einen Bereich von etwa 10 μm begrenzt.

Die Anwendung der lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanz metallischer oder metallumhüllter Nanopartikel (Ag, Au, Cu) zur markierungsfreien Detektion von Bindungsereignissen bietet in dieser Hinsicht jedoch wesentliche Verbesserungen. Ihr Ursprung liegt in einer Anregung kollektiver Schwingungen der Leitungsbandelektronen bei Einstrahlung von Licht bestimmter Wellenlängen. Diese Schwingung führt zu einer Ausbildung eines elektromagnetischen Feldes um den Partikel, das analog zur SPR zu einer Detektion von chemischen oder biologischen Änderungen in seiner unmittelbaren Nanoumgebung genutzt werden kann. Durch Adsorption der Partikel auf festen Trägern resultieren optisch aktive Sensoroberflächen, die direkt in Biochips integriert werden können. Bezogen auf eine Anwendung im Mikroarray-Format betreffen die wesentlichen Vorteile dieser Methode gegenüber der SPR vor allem die technisch sehr viel einfachere Art der Detektion sowie die Möglichkeit zu einer sehr viel höheren lateralen Auflösung bei einer vergleichbaren Sensitivität. Mit Hilfe eines in Reflexionsgeometrie arbeitenden Faserspektrometers konnten solche Sensoroberflächen bereits zur erfolgreichen Auslese des Bindungsmusters von im μm -Maßstab strukturierten Peptid-Arrays eingesetzt werden. Da die angeregten Resonanzen auf die Ausdehnungen der sie erzeugenden Objekte beschränkt (lokalisiert) sind, kann die laterale Auflösung jedoch noch wesentlich erhöht werden - im Fall einer entsprechend strukturierten Adsorption der Partikel sollte theoretisch noch zwischen Bindungsereignissen unterschieden werden können, die im Nanometer-Maßstab voneinander erfolgen.

Die Zusammensetzung der LSPR-aktiven Partikel sowie die Art ihrer Anordnung auf der Oberfläche und das verwendete Trägermaterial bieten zudem weitere Parameter, über welche sowohl eine Steigerung der Sensitivität als auch der optischen Extinktionen erreicht werden kann.

Die in dieser Arbeit präparierten Sensoroberflächen bestehen z.B. aus Gold-bedampften Trägern, die mit Core-Shell Partikeln (Nanopartikel mit dielektrischem Kern und einer metallischen Hülle) funktionalisiert wurden. Durch die mit einem solchen kompositären Aufbau verbundene kombinierte Anregung von sowohl lokalisierten als auch propagierenden Plasmaschwingungen resultieren sowohl höhere optische Extinktionen als auch höhere Resonanzverschiebungen. Zudem bietet das Dickenverhältnis von Kern zu Schale einen zusätzlichen Parameter, über den die Resonanzlage gezielt eingestellt und somit ggf. außerhalb des Adsorptionsfensters von Störkomponenten platziert werden kann.

Ein zentrales Problem der Immundiagnostik, die Trennung zwischen spezifischen und unspezifischen Messsignalen bleibt jedoch bestehen und erfordert eine geeignete Funktionalisierung der Sensoroberflächen mit proteinresistenten Matrices, in der die Rezeptoren integriert werden können. Zu diesem Zweck werden bevorzugt auf Polyethylengolkolbasis bestehende Beschichtungen eingesetzt, die nicht nur eine ausgezeichnete Proteinresistenz aufweisen, sondern auch eine unspezifische Adsorption von Zellen und DNA weitgehend unterdrücken. Zur Funktionalisierung von Oberflächen mit PEG bestehen bereits eine Vielzahl an Techniken (s. Kapitel II.I), unter denen jedoch die spontane Ausbildung von selbstaggregierenden Monolagen (SAM) infolge ihrer Einfachheit zu bevorzugen ist. Durch eine einfache Prozedur - Eintauchen und Abspülen - können in kurzer Zeit (einige Minuten) dicht gepackte PEG-Beschichtungen produziert werden.

Zur Integration von Rezeptoren bedienen sich gängige Vorgehensweisen bei der Anwendung des Prinzips der Selbstaggregation meist einer Adsorption aus binären Lösungen, wobei die eine Komponente (z.B. PEG) der Unterdrückung von unspezifischer Adsorption dient und der zweite Bestandteil geeignete Funktionalitäten zur Integration der Rezeptoren aufweist.

Im Hinblick auf eine immunodiagnostische Anwendung ist jedoch die Verwendung von Molekülen wünschenswert, die beide Eigenschaften – sowohl die Proteinresistenz als auch die Fähigkeit zur Bindung der Rezeptoren – in kombinierter Form beinhalten, da auf diese Weise höhere Packungs- und vor allem Funktionsdichten resultieren sollten. Entsprechend endgruppenfunktionalisierte PEG-Thiole konnten in dieser Hinsicht bereits erfolgreich eingesetzt werden; neben einer ausgesprochenen Proteinresistenz erlauben sie die Einstellung hoher Rezeptordichten.

Dieses Konzept wurde auch in der vorliegenden Arbeit verfolgt.

2 Zielsetzung und Gliederung

Thema dieser Arbeit ist die Präparation und der Einsatz von LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen zu einer markierungsfreien und quantitativen Detektion von Bindungsereignissen in der Immundiagnostik.

Hierzu wurde zunächst eine geeignete Matrix zu ihrer Beschichtung entwickelt, die trotz einer Unterdrückung von unspezifischer Proteinadsorption eine hohe Bindungskapazität immundiagnostisch genutzter Rezeptoren (z.B. Antikörper, Peptidpitope) zulässt.

Anschließend wurden Antikörper- und Peptid-Assays in die beschichteten Sensoroberflächen integriert und der Nachweis einer markierungsfreien und quantitativen Detektion von Bindungsereignissen erbracht.

Im Hinblick auf einen Einsatz im Array-Format wurden außerdem mit Hilfe eines Spot-Roboters Peptid-Arrays auf den Sensoroberflächen aufgebracht und photochemische Oberflächenstrukturierungen erzeugt, die mittels LSPR-Imaging ausgelesen wurden.

Gliederung

Im einführenden *theoretischen Teil* werden zunächst die Einflussfaktoren der Proteinresistenz bezüglich Protein und Oberfläche behandelt; schwerpunktmäßig werden die in der Literatur dargestellten Mechanismen der Proteinresistenz polymerer Ethylenglykol-Beschichtungen vorgestellt.

Folgend sind die physikalischen Grundlagen der Anregung von propagierenden und lokalisierten Oberflächenplasmonenresonanzen dargestellt. Anschließend wird auf die Charakteristika, Gemeinsamkeiten und Unterschiede sowie aktuelle Einsatzbereiche der SPR- und LSPR-Spektroskopie eingegangen. Im Hinblick auf eine Applikation in der Immundiagnostik werden diese weiterhin hinsichtlich ihrer Sensitivität sowie der Möglichkeit zur Quantifizierung und Implementierung im miniaturisierten Array-Ansatz verglichen.

Der folgende Abschnitt beschreibt im Detail die optischen Besonderheiten von Core-Shell Partikeln und der aus diesen präparierten Nanopartikeloberflächen.

Der *experimentelle Teil* beinhaltet neben Material- und Gerätebeschreibungen insbesondere die Synthesen der polymeren Ethylenglykolphiole sowie die Durchführung der biomolekularen Bindungs-Assays und Oberflächenstrukturierungen.

Das Kapitel *Ergebnisse und Diskussion* gliedert sich in insgesamt 4 Hauptteile.

Im ersten Abschnitt werden die Proteinresistenz- und Bindungsstudien beschrieben, die an den auf Au-bedampften Si-wafern adsorbierten PEG-Beschichtungen durchgeführt wurden. Durch Behandlung mit einer Fibrinogen- und Blutplasma-Lösung wurden diese hinsichtlich ihrer Proteinresistenz untersucht und die in den Antikörper-Antigen- und Peptid-Assays erzielten Bindungsraten mittels XPS-, Ellipsometrie-, FT-IR- und ELISA-Messungen quantifiziert.

Der zweite Teil des Kapitels III betrifft die röntgenphotoelektronenspektroskopisch durchgeführte Kalibrierung der Nanopartikeloberflächen, mit deren Hilfe Eichwertfaktoren bezüglich Schichtdicke und Massenbelegung auf den Sensoroberflächen aufgebracht Adsorbatlagen bestimmt werden konnten.

Im 3. Abschnitt ist als Anwendung eine Detektion von Antikörper-Antigen- und Peptid-Antikörper Wechselwirkungen dargestellt. Die in den Assays erzielten Massenbelegungen und Schichtdicken konnten mit Hilfe der zuvor ermittelten Eichwertfaktoren LSPR-spektroskopisch quantifiziert und mit den anhand von XPS- und ELISA-Messungen ermittelten Werten verglichen werden.

Der abschließende Teil des Kapitels III beinhaltet Versuche, die einen möglichen Einsatz der Sensoroberflächen zu einer orts aufgelösten Detektion von Bindungsereignissen im miniaturisierten und parallelisierten Format demonstrieren sollen. Hierzu wurden strukturierte Oberflächenbeschichtungen hergestellt und die Oberflächentopographie mittels LSPR-Imaging visualisiert. Mit Hilfe der Spot-Technik wurden Peptid-Arrays auf den Oberflächen aufgebracht sowie auf photochemischem Wege Oberflächenstrukturierungen generiert und die erzeugten Muster zur Kontrolle anschließend durch eine Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht.

Im Kapitel *Zusammenfassung und Ausblick* werden die wichtigsten Ergebnisse des Kapitels III kurz wiederholt und ein Ausblick auf zukünftige Forschungsansätze betreffend der beschriebenen Arbeiten gegeben.

Kapitel II

Theoretischer Teil

II.I Proteinresistente Oberflächenbeschichtungen

1 Oberflächen in der Biomaterialwissenschaft

Ein Schwerpunkt der Biomaterialwissenschaft liegt in der Vermeidung einer unkontrollierten Biofilmbildung (*Biofouling*), worunter man die unspezifische Adsorption von biologischem Material (z.B. von Proteinen, Zellen, Bakterien, Blutplättchen) auf Oberflächen versteht [1]. So ist z.B. die Adsorption von Proteinen auf synthetischen Materialien ein Schlüsselfaktor, der unter anderem die Biokompatibilität künstlich implantierter Materialien bestimmt [2], [3]. Die Adsorption von Proteinen auf einer Oberfläche ist ein sehr viel schnellerer Prozess als der Zelltransport zur Materialoberfläche und erfolgt bereits unmittelbar nach der Implantation eines Materials [4], [5]. Deshalb erkennen die Zellen, welche die Immunantwort des Körpers vermitteln, nicht das unterliegende Material, sondern die auf diesem adsorbierten Proteine. Die unkontrollierte Abscheidung von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix und des Blutes (hauptsächlich Proteine und Glykoproteine) hat auf diese Weise unter Umständen eine fibrose Einkapselung und Abstoßung des Implantats durch den Körper zur Folge [6], [7].

Weitere Konsequenzen einer solchen Biofilmbildung betreffen auf medizinischem Gebiet unter anderem die Verstopfung endoluminaler Gefäßprothesen (Stents) [8] sowie die Trübung von Kontakt- und intraokularen Linsen [9].

Aber auch bei vielen in Wasserkontakt stehenden technischen Vorrichtungen (Transport- und Lagerungssysteme, Schiffshüllen) führt eine unkontrollierte Abscheidung von Algen und Mikroorganismen zu einer Beeinträchtigung von Funktion und Leistung.

In biosensorischen und trägerbasierten immunodiagnostischen Anwendungen (Festphasen-immunoassays; z.B. Protein- und DNA-Chips) ist die Verwendung inerter Matrixmaterialien weiterhin eine notwendige Voraussetzung zur gezielten Detektion biospezifischer Wechselwirkungen [10], [11].

Insgesamt wird somit deutlich, dass die Erzeugung inerter Oberflächenbeschichtungen in den verschiedensten Einsatzgebieten von hohem praktischen Interesse ist.

2 Proteinresistente Oberflächenbeschichtungen

In der Literatur sind bereits eine Vielzahl an Methoden zur chemischen Oberflächen-Modifikation beschrieben, die eine Minimierung der unkontrollierten Biofilmbildung – hauptsächlich einer Proteinabscheidung – zur Folge haben [12], [13], [14], [15]. Ihre Proteinresistenz wird dabei vor allem auf die folgenden physikochemischen Eigenschaften zurückgeführt [8]:

Inerte Oberflächenbeschichtungen zeichnen sich in vielen Fällen durch Hydrophilie und elektrostatische Neutralität aus; sie können gegebenenfalls als Wasserstoff-Akzeptoren dienen, weisen jedoch keine als Wasserstoff-Donator fungierenden Funktionalitäten auf.

Ein allgemeiner Ansatz zur Erzeugung inerte Oberflächen besteht in ihrer Beschichtung mit nicht-reaktiven und vorzugsweise wasserlöslichen Materialien. Verwendet werden in dieser Hinsicht vor allem hydrophile und neutral geladene Polymere, wie z.B. Polyethylenglykole [16], Polysaccharide (Dextrane, Zellulose-Derivate, Agarose) [17], Poly(hydroxyethyl)methacrylat (PHEMA), Polyacrylamid (PAAm) und Phosphorylcholine [13]. Darüber hinaus wird zur Passivierung von Oberflächen auch eine Adsorption von Proteinen (z.B. BSA¹, Milchpulver) selbst eingesetzt [18], [13]. Infolge der mit ihrer negativen Ladung verbundenen elektrostatischen Wechselwirkungen ist der proteinabweisende Charakter einer solchen Beschichtung jedoch begrenzt; außerdem ist es möglich, dass die voradsorbierten Proteine von anderen Molekülen verdrängt werden und so zum Proteinaustausch führen (Vroman-Effekt [19]).

Der Grad an Proteinresistenz der beschriebenen Polymer-Beschichtungen wird dabei vor allem durch den Bedeckungsgrad (bzw. dem Abstand zwischen den Ankerpunkten D benachbarter Polymerketten), die Kettenlänge und die chemische Stabilität der erzeugten Polymerlage bestimmt.

Von den beschriebenen Methoden stellt jedoch die Funktionalisierung mit Polyethylenglykolen die mit Abstand am häufigsten genutzte und in vieler Hinsicht zu bevorzugende Strategie zur Unterdrückung unspezifischer Adsorption dar [20].

¹ BSA = Rinderserumalbumin (*englisch*: Bovine serum albumine)

2.1 Wechselwirkungen zwischen Protein und Oberfläche

Allgemein wird die Proteinadsorption durch die Beschaffenheiten der verwendeten Oberfläche, des Proteins und des umgebenden Mediums bestimmt.

In Bezug auf Art und Menge der adsorbierenden Proteine sind auf Seiten des verwendeten Trägersystems vor allem die chemischen, physikochemischen und morphologischen Oberflächeneigenschaften von Bedeutung. Im Gegensatz zu hydrophilen zeigen hydrophobe Oberflächen oft höhere Adsorptionsraten [21], [22] verbunden mit einer gleichzeitigen Tendenz zu konformativen Änderungen bis hin zur Denaturierung der Proteine (s. unten) [23], [24].

Hinsichtlich des betrachteten Proteins spielen vor allem die Größe, dreidimensionale Struktur und die Verteilung der geladenen und hydrophoben/hydrophilen Domänen eine Rolle. In wässriger Lösung befinden sich geladene oder hoch-polare Bereiche vornehmlich außen, dem wässrigen Milieu zugekehrt. Interaktionen mit hydrophoben Wechselwirkungen führen somit über eine Freilegung der hydrophoben Protein-Innenbereiche zu einer Strukturänderung, die gegebenenfalls mit einer Denaturierung und dem Verlust an biologischer Aktivität verbunden sein kann [23], [24].

Weiterhin ist ihr isoelektrischer Punkt zu beachten, so dass je nach pH-Wert des umgebenden Mediums unter Umständen auch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem jeweiligen Protein und einer geladenen Oberfläche zu erwarten sind.

Die Ionenstärke der verwendeten Lösung ist im Fall des Auftretens von elektrostatischen Wechselwirkungen (geladenes Protein und geladene Oberfläche) ebenfalls von Bedeutung, da sie die Debey'sche Abschwächungslänge und somit die Stärke dieser Wechselwirkungen bestimmt.

Die auf die Proteinadsorption einflussnehmenden Faktoren sind in der Tabelle II.1.2-1 für die beteiligten 3 Systeme (Protein, Oberfläche, Medium) nochmals zusammengefasst [25].

<i>Protein</i>	<i>Oberflächenbeschichtung</i>	<i>Medium</i>
▪ Nettoladung und Ladungsverteilung	▪ Oberflächenladung	▪ pH-Wert
▪ Anordnung und Ausdehnung hydrophober/hydrophiler Bereiche	▪ Chemische Oberflächenzusammensetzung (z.B. Anordnung hydrophob/hydrophiler Bereiche)	▪ Ionenstärke
▪ Proteinkonzentration	▪ Quellbarkeit	▪ Viskosität
▪ Molekulargewicht	▪ Stabilität im Medium	▪ Temperatur
▪ Dreidimensionale Struktur in Lösung	▪ Oberflächentopographie	▪ Druck
▪ Konformationsstabilität	▪ Grenzflächendynamik	▪ Niedermolekulare Bestandteile
▪ Aminosäurezusammensetzung	▪ Freie Oberflächenenergie	▪ Strömungsphänomene
▪ isoelektrischer Punkt		

Tab. II.1.2-1: Physikochemische Einflussfaktoren auf die Proteinresistenz; bezogen auf die 3 beteiligten Systeme: Oberfläche, Protein und Medium [25].

Zu beachten ist hierbei jedoch, dass die konformelle Stabilität eines Proteins selbst auch empfindlich vom pH-Wert, der Ionenstärke und der Temperatur der verwendeten Lösung abhängt; schon eine geringfügige Änderung dieser Parameter kann in ungünstigen Fällen zu ihrer Denaturierung führen [26].

2.1.1 Struktur und Stabilität der Proteine

Proteine sind amphiphile Polymere, die aus 23 verschiedenen proteinogenen Aminosäuren unterschiedlicher Ladung und Hydrophobizität bestehen [27], [28].

Für ihre Wirkungsweise ist ihre räumliche Struktur (ihre Faltung) besonders wichtig. Die resultierende Proteinstruktur kann auf insgesamt 4 verschiedenen strukturellen Hierarchieebenen betrachtet werden (Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur) [29].

Je nach ihrer äußeren Gestalt teilt man die Proteine in 3 verschiedene Klassen ein [30]:

- randomly coiled (ungeordneter Verband)
- ordered fibrillar (geordnet gestreckt)
- globular (kompakt und kugelförmig)

Die meisten Proteine enthalten teilweise signifikante Bestandteile an geordneten Sekundärstrukturelementen, wie z. B. α -Helices und β -Faltblattstrukturen; im Fall der globulären Proteine liegt dieser Anteil z.B. bei beträchtlichen 40 - 80%. Diese sind nicht-kovalenter Art und ergeben sich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Peptidbindungen des Polypeptid-Rückgrats. Die konformelle Entropie der Proteine wird durch diese geordneten Strukturen somit herabgesetzt.

Die strukturelle Stabilität der Proteine kann allgemein auf die mit ihrer Denaturierung verbundene Änderung der freien Energie zurückgeführt werden.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (1)$$

Unter physiologischen Bedingungen liegt dieser ΔG -Wert für die meisten Proteine in einem Bereich von etwa +20 bis +60 kJ/mol [26], [28].

Ihre Stabilität ist Enthalpie-bedingt und beruht vor allem auf nicht-kovalenten Wechselwirkungskräften, wie z.B. van der Waals Kräften, Wasserstoff-Brückenbindungen und zu einem geringeren Anteil auch auf elektrostatischen Wechselwirkungen.

Ein hoher Anteil an geordneten Tertiärstrukturen (insbesondere im Fall globulärer Proteine) ist hingegen mit einer niedrigen System-Entropie verbunden, die der Struktur-Stabilität entgegenwirkt [31]. Daher ist die aktive Konformation in Lösung nur unter idealen Bedingungen stabil. Schon eine Zunahme der Temperatur, des Drucks oder eine Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke kann eine Denaturierung und somit den Übergang in eine ungeordnete Struktur zur Folge haben [26]; die oben beschriebenen relativ schwachen Wechselwirkungskräfte können daher durch den Entropieterm leicht übertroffen werden, da der mit einer Denaturierung verbundene Übergang in eine ungeordnete Struktur mit einer relativ hohen Entropie-Zunahme verbunden ist.

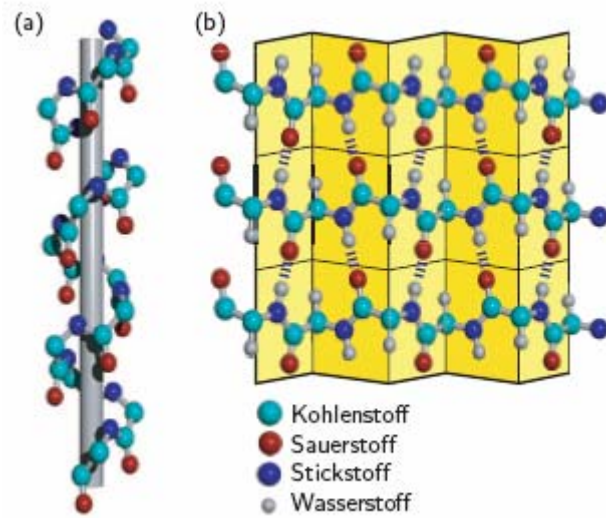


Abb. II.1.2-1: Schematische Darstellung durch Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildeter Sekundärstrukturelemente in Proteinen; aus [32].

- (a) Struktur der α -Helix
- (b) Die planare β -Faltblattstruktur

Eine Denaturierung kann jedoch nicht nur durch Änderung des umgebenden Mediums ausgelöst werden, sondern selbst schon durch das Einführen einer fremden Oberfläche in das System [33]. Dies betrifft vor allem hydrophobe Oberflächen, bei denen der Adsorptionsprozess mit einer Freilegung der hydrophoben Proteininnenbereiche verbunden ist (s. oben) [31].

2.1.2 Wechselwirkungskräfte zwischen Protein und Oberfläche [30]

Die Proteinadsorption vollzieht sich insgesamt in 3 Schritten; zunächst muss das Protein die energetische Grenzfläche erreichen, anschließend mit der Oberfläche in Wechselwirkung treten, um dann im letzten Schritt auf dieser – gegebenenfalls begleitet von einer Konformationsänderung – zu adhären.

Aufgrund der Heterogenität der meisten Oberflächen in Bezug auf Ladung, Hydrophobizität und der Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen können die Proteine mit dieser über eine Vielzahl an Wechselwirkungen in Kontakt treten; unter diesen Kräften überwiegen in den meisten Fällen elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen [23], [24]. Die heterogene und asymmetrische Struktur der Proteine hat weiterhin zur Folge, dass die Art und Größe der auftretenden Wechselwirkungen zudem noch von der Orientierung des Moleküls zur Oberfläche abhängig ist.

Als attraktive Kräfte treten zwischen Protein und Oberfläche vor allem van der Waals- sowie hydrophobe Wechselwirkungen mit hydrophoben und elektrostatische Wechselwirkungen mit geladenen Oberflächen auf, die einen die Adsorption begünstigenden Enthalpiefaktor darstellen [34].

Der Adsorptionsprozess ist unter Umständen mit einem Entropiegewinn verbunden, sofern er mit einem teilweisen Verlust der geordneten Proteinstruktur verbunden ist [31].

Hydrophobe Wechselwirkungen mit Oberflächen führen neben einer Änderung der Proteinstruktur zu einer Abgabe des Solvatationswassers und gegebenenfalls auch zu einer Freisetzung komplexierter Gegenionen [35]. Der große Einfluss der hydrophoben Wechselwirkungen ist daher vor allem auf den mit dem Verlust der geordneten Wasserstruktur verbundenen Entropiegewinn zurückzuführen (hydrophober Effekt).

Die mit dem Adsorptionsprozess verbundene Änderung der freien Energie setzt sich insgesamt aus den folgenden Beiträgen zusammen [30]:

$$\Delta_{ads} G = \Delta_{ads} G_{vdW} + \Delta_{ads} G_{EDL} + \Delta_{ads} G_{hydr} + \Delta_{ads} G_{Hbond} + \Delta_{ads} G_{struct} \quad (2)$$

$\Delta_{ads} G_{vdW}$ beschreibt hierbei die attraktiven van der Waals Kräfte zwischen Oberfläche und Protein; im wässrigen Milieu liegt dieser Beitrag bei etwa $\Delta H \sim 0.4$ kJ/mol [36].

$\Delta_{\text{ads}}G_{\text{EDL}}$ steht für die Wechselwirkungen zwischen den sich in wässriger Lösung ausbildenden elektrischen Doppelschichten von Protein und Oberfläche [33]; diese elektrostatische Wechselwirkung liegt in einer Größenordnung von etwa $\Delta H \sim 12.5 \text{ kJ/mol}$ [36].

Die zwischen Protein und einer unpolaren Oberfläche auftretenden hydrophoben Wechselwirkungen, die sowohl auf Seiten des Proteins als auch der Materialoberfläche eine Dehydratisierung erfordern, werden durch den Term $\Delta_{\text{ads}}G_{\text{hydr}}$ repräsentiert.

Treten zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen auf, so ist auch der Beitrag $\Delta_{\text{ads}}G_{\text{Hbond}}$ zu berücksichtigen, der in wässrigen Medien einen Betrag von etwa $\Delta H \sim 4 \text{ kJ/mol}$ ausmacht [36].

Der Term $\Delta_{\text{ads}}G_{\text{struct}}$ bezieht sich schließlich auf mit der Adsorption verbundene strukturelle Umwandlungen innerhalb des Proteinmoleküls [23], [24]; im Fall globulärer Proteine sind diese mit einem hohen Entropiegewinn verbunden.

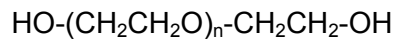
Während die globulären Proteine infolge ihres hohen Anteils an hoch-geordneten Strukturelementen eine nur begrenzte strukturelle Stabilität aufweisen, zeigen hingegen kleine und kompakte Proteine, wie z.B. Lysozym und Insulin nur geringfügige mit der Adsorption verbundene Konformationsänderungen. Die relativ flexiblen coil-like Proteine (z.B. Mucin) verhalten sich dagegen den einfachen Polymersystemen sehr ähnlich [24], [35]; für diese ist umgekehrt die Adsorption mit einem Verlust an konformeller Entropie verbunden und somit entropisch ungünstig.

Neben den beschriebenen Wechselwirkungskräften zwischen Protein und Oberfläche ist der Adsorptionsprozess aber auch mit dem Auftreten von Protein-Protein- (insbesondere im Fall höherer Adsorptionsraten) und Protein-Lösungsmittel-Wechselwirkungen verbunden.

2.2 Proteinresistente Beschichtungen auf PEG-Basis

2.2.1 Physikochemische Eigenschaften und Verwendung des PEGs

Polyethylenglykol (PEG) ist ein linearer oder verzweigter Polyether, der in einem Molmassenbereich von 200 bis mehreren Millionen g/mol verfügbar ist. Seine molekulare Struktur ist in der Abbildung II.1.2-2 gezeigt.



Ab. II.1.2-2: Molekulare Struktur von Polyethylenglykol.

Im Gegensatz zu Polypropylenoxid (PPO) ist PEG unbegrenzt wasserlöslich; dies ist auf Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen dem Ethersauerstoff des PEG und Wassermolekülen zurückzuführen [37]. Im Fall des PPO verursacht die zusätzliche Methylgruppe jedoch eine sterische Hinderung, welche die Ausbildung von Wasserstoffbrücken erschwert.

PEG ist ungeladen, hydrophil (mit teilweise hydrophobem Charakter) und in vielen organischen Lösungsmitteln gut löslich. Diese Eigenschaften, zusammen mit ihrer Atoxizität und geringen Immunogenität haben zu einer breiten Anwendung dieser Verbindungsklasse, insbesondere auf biomedizinischem Gebiet, geführt [38], [39].

Applikationen umfassen neben der Reinigung von Proteinen und Nukleinsäuren [40] unter anderem die Konjugation von PEG mit Proteinen. Letztere verhindert Immunreaktionen und führt bei minimalem Verlust an Aktivität zu einer zunehmenden Verweildauer im Körper (*serum lifetime*). Da eine Konjugation mit Enzymen und anderen Biomolekülen unter Erhalt der biologischen Aktivität verläuft, finden PEG eine breite Anwendung auf dem Gebiet der Wirkstoffkonjugation und -freisetzung [41], [42].

Die Konjugation mit PEG wird darüber hinaus mit dem Ziel eingesetzt, die Löslichkeit von Proteinen zu erhöhen; auf diese Weise können auch Enzyme als Katalysatoren in organischen Solventien genutzt werden.

Schließlich werden Oberflächen mit PEG modifiziert, um eine Proteinadsorption auf diesen zu unterbinden [43], [44], [45].

Ihre ausgeprägte Hydrathülle sowie die gute konformelle Flexibilität und hohe Mobilität der PEG-Ketten in Wasser [46] bewirken in diesem Medium einen sterischen Ausschluss-effekt (*steric exclusion effect*) zwischen den PEG-Ketten [38], [39] [47], [48], [49]. Dieser führt bei einer dichten Anbindung der PEG-Ketten auf einer Oberfläche zu einer ge-

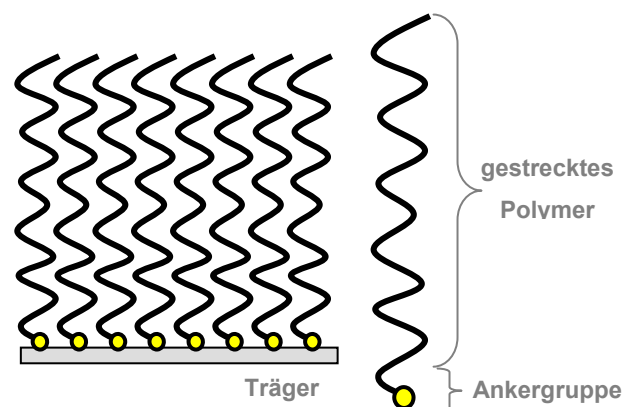


Abb. II.1.2-3: Schematische Darstellung der Struktur ausgebildeter Polymerbürsten.

streckten Anordnung und somit zur einer Ausbildung von Polymerbürsten [49]; s. Abb. II.1.2-3.

Allgemein werden die Interaktionen des PEG mit Wasser auch als Schlüsselfaktor zum Verständnis ihrer Wechselwirkungen mit Proteinen angesehen und zur Erklärung ihrer proteinabweisenden Eigenschaften herangezogen. Obwohl die Mechanismen ihrer Proteinresistenz bislang immer noch nicht eindeutig geklärt sind, wird diese in der Literatur oft ebenfalls mit dem beschriebenen sterischen Ausschlusseffekt (*excluded volume*) [50], [51] sowie auftretenden osmotischen Abstoßungskräften [52] begründet.

Unter den Bedingungen uneingeschränkter Löslichkeit sind die PEG-Ketten stark hydratisiert und stoßen sich infolge des sterischen Ausschlussvolumens gegenseitig ab. Mit einer Zunahme der Anzahl an EG-Monomeren nimmt auch die Hydrathülle zu und steigt, wie anhand von Kalorimetrie- und Viskositäts-Messungen gezeigt werden konnte, von 2 Wassermolekülen für ein 4-mer auf etwa 3-5 Moleküle für Verbindungen mit 45 EG-Einheiten an [39], [53].

Die Löslichkeit des PEG in Wasser wird dabei sowohl durch eine untere als auch eine obere kritische Lösungstemperatur bestimmt, welche auf die ungewöhnliche Temperaturabhängigkeit der molekularen Wechselwirkungen des PEG mit Wasser zurückzuführen sind [39]. Unter den Bedingungen verringerter Löslichkeit unterliegen die PEG-Ketten reversiblen Phasenübergängen infolge des Bruchs der Hydrathülle.

Die bei Temperaturerhöhung erreichte untere kritische Lösungstemperatur (*Lower Critical Solution Temperature*, LCST) hängt vom Molekulargewicht, der PEG-Konzentration und dem pH-Wert der Lösung ab; diese Phasenübergangstemperatur wird auch als Trübungspunkt (*cloud point*) bezeichnet. Ursache dieses Phasenübergangs ist der mit einer Temperaturerhöhung verbundene Verlust der hoch geordneten Hydrathülle, der durch die zunehmende Entropie des Systems begünstigt wird. Daraus resultiert ein vermindertes hydrodynamisches Volumen der Ketten (Verringerung des Trägheitsradius) und somit auch eine Abnahme des Ausschlussvolumens und der Kettenabstoßung [54]. Die LCST des PEG/Wasser-Systems liegt gewöhnlich bei einer Temperatur von über 100°C, kann jedoch durch eine Erhöhung der Salzkonzentration drastisch herabgesetzt werden [54].

Zur Beschreibung der sich in wässrigen Lösungen ausbildenden PEG-Hydrathülle werden in der Literatur unterschiedliche Modelle hinsichtlich der diese begünstigenden PEG-Konformationen diskutiert [39].

Das Gittermodell nimmt eine helikale Struktur mit einer trans-gauche-trans-Konformation der EG-Ketten an [30]. Gestützt wird diese These durch die Tatsache, dass der Durchmesser der PEG-Helix (4.9 Å) sehr gut mit den Abständen einer hexagonal geordneten Wasserstruktur übereinstimmt.

Nach dem Dipol-Modell treten mit einer Änderung des Dipolmoments verbundene temperaturabhängige Konformationsänderungen der EG-Ketten auf, die zu unterschiedlichen Wechselwirkungen mit dem umgebenden Wasser führen [30], [38].

Die Wasserstoff-Brückentheorie postuliert hingegen eine temperaturabhängige Ausbildung von Wasserstoff-Brückenbindungen, die wiederum mit einer Änderung der Löslichkeit verbunden sind [55].

2.2.2 Methoden zur Oberflächen-Modifizierung mit PEG

Zur Oberflächenmodifikation mit PEG existieren bereits eine Vielzahl an Methoden [13], [56], die grob in 2 unterschiedliche Ansätze unterteilt werden können.

Zum einen können in einer kombinierten Anwendung geeignet terminierte Oberflächen mit funktionalisierten PEG-Molekülen umgesetzt werden (*grafting-to*-Ansatz); des Weiteren kann zur Beschichtung auch eine in-situ-Polymerisation von geeigneten (P)EG-Monomeren auf der Oberfläche angewandt werden (*grafting-from*-Ansatz) [57], [58].

Beispiele für diese beiden Methoden sind z.B. die Physisorption von Blockcopolymeren [59], [60], [61] und die direkte chemische Bindung (Chemisorption) [11], [62] (beides *grafting-to*) sowie die graft-Polymerisation [63], [64] (*grafting-from*).

Bezüglich der *grafting-to*-Ansätze ist jedoch zu beachten, dass die an eine Oberfläche gekoppelten und solvatisierten PEG-Moleküle aufgrund ihres hohen Gyrationradius verhindern, dass andere PEG-Moleküle in Kontakt mit den reaktiven Gruppen der Oberfläche treten können, so dass auf diese Weise oft nur geringe Kopplungsdichten resultieren; höhere Oberflächendichten können nur unter bestimmten experimentellen Randbedingungen eingestellt werden.

Ein Ansatz zur Steigerung des Bedeckungsgrades ist z.B., die Kopplungsreaktion nahe des Trübungspunktes der jeweiligen PEG-Lösung durchzuführen [65], [66]. Da das hydrodynamische Volumen der PEG-Ketten an diesem reduziert ist, resultiert eine dichtere Packung der gekoppelten PEG-Ketten auf der Oberfläche.

Eine weitere Alternative bedient sich der Verwendung von Blockcopolymeren, deren Nicht-PEG-Block zur Fixierung genutzt wird und deren Eigenschaften derart beschaffen sind, dass höhere PEG-Dichten resultieren. So können z.B. durch Gebrauch von amphiphilen Copolymeren, die hydrophobe und hydrophile Segmente aufweisen, hohe PEG-Dichten bei einer Adsorption aus wässriger Lösung eingestellt werden [59], [60], [61].

Ein Beispiel für diese Strategie ist etwa die kombinierte Anwendung von PEG-PPO-PEG-Triblock-Copolymeren (Pluronic®) mit hydrophoben Oberflächen. Über das hydrophobe PPO(Polypropylenoxid)-Segment wird das Blockcopolymer an die hydrophobe Oberfläche adsorbiert [67] und das wasserlösliche hydrophile Segment erstreckt sich in die Lösung. Ebenso können auch bei einer Konjugation des PEG mit geladenen Polymeren, wie z.B. mit

Polylysinen (PLL-PEG-Blockcopolymeren), bei einer elektrostatisch vermittelten Adsorption auf negativ geladenen Oberflächen sehr hohe PEG-Dichten erreicht werden [30].

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Oberflächendichte, die auch in dieser Arbeit herangezogen wurde, stellt die Verwendung Polyethylenglykol-funktionalisierter Alkanthiole in Kombination mit Gold-beschichteten Trägern dar [11], [62]. Bedingt durch die dicht-gepackte all-trans-Konformation der Alkanthiole resultieren höhere initiale Kopplungsdichten, die aufgrund des sterischen Ausschlussvolumens der PEG-Ketten diese in eine gestreckte und helikale Konformation zwingen.

Wie bereits beschrieben, wird die Konformation und die damit verbundene Dicke einer PEG-Beschichtung durch die Kopplungsdichte bzw. den Abstand zwischen den Ankerpunkten benachbarter PEG-Ketten (D) determiniert [49]; daher haben auch die Kettenlänge des verwendeten Polymers und das Lösungsmittel einen Einfluss auf die resultierende Schichtdicke, da diese wiederum den hydrodynamischen Radius (R_g) und somit auch den Abstand zwischen den Ankerpunkten bestimmen.

Bei sehr niedrigen Bedeckungen ($D \gg R_g$) hängt die PEG-Struktur von den Wechselwirkungen zwischen Polymer und Oberfläche ab. Bestehen attraktive Wechselwirkungskräfte, so adsorbieren diese in einer flächigen, auf der Oberfläche ausgebreiteten Struktur; andernfalls bilden sich auf der Oberfläche globuläre und schwammartige PEG-Strukturen aus, die stärkere Wechselwirkungen mit dem umgebenden Medium erlauben. Zur Ausbildung dichter PEG-Strukturen sind daher Substrate, die geringere Wechselwirkungen zu dem adsorbierenden Polymer aufweisen, zu empfehlen. In diesem Fall treten die ungeordneten PEG-Knäuel bei einem Abstand von etwa $D \sim 2R_g$ miteinander in Wechselwirkung und nehmen aufgrund des sterischen Ausschlussvolumens zunehmend eine von der Oberfläche ausgerichtete Anordnung ein, die Adsorptionsplätze für weitere PEG-Moleküle offen legt und eine Steigerung des Bedeckungsgrades erlaubt.

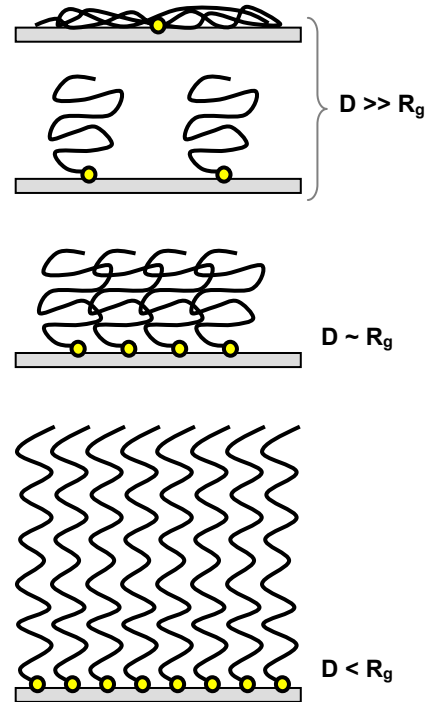


Abb. II.1.2-4: Abhängigkeit der Struktur adsorbierter Polyethylenglykole vom Bedeckungsgrad bzw. dem Abstand zwischen den Ankerpunkten D und des hydrodynamischen Radius R_g der Ketten.

2.2.3 Mechanismen der Proteinresistenz PEG-beschichteter Oberflächen

Bis heute gibt es keine einheitliche Theorie, die das proteinabweisende Verhalten von PEG eindeutig beschreiben kann. Zur Erklärung des proteinabweisenden Charakters der PEG-Beschichtungen werden vor allem die von Jeon [68], [69] und Szleifer [70], [67] aufgestellten theoretischen Modelle herangezogen, welche die thermodynamischen und kinetischen Faktoren der Proteinadsorption zu quantifizieren versuchen [71], [72].

Das Jeon-Modell bezieht sich auf Systeme mit maximaler PEG-Dichte und besagt, dass die sterische Abstoßung bei der Annäherung eines Proteins an die Oberfläche die Hauptursache der Proteinresistenz ist [68], [69]. Durch diese Annäherung wird die PEG-Schicht zusammengepresst und entwässert. Die mit dieser Kompression einhergehende Volumeneinengung der PEG-Schicht führt zu einer Abnahme der Entropie der Makromoleküle, da ihre Einzelsegmente weniger Konformationen im komprimierten als im entspannten Zustand einnehmen können. Ebenso leistet die mit der Kompression verbundene Dehydratisierung einen energetisch ungünstigen Beitrag zum Adsorptionsprozess. Da beide Effekte (Kompression => Abnahme der Entropie; Dehydratisierung => Zunahme der Enthalpie) von der Kettenlänge abhängen, ist die Proteinresistenz umso ausgeprägter, je länger die PEG-Ketten sind und je dichter sie auf der Oberfläche gepackt vorliegen. Allerdings zeigte sich, dass die Voraussagen dieses Modells im Bereich kürzerer Kettenlängen (MW < 4 kDa) nicht zutreffen. Diese sollten sich der Theorie nach durch eine Proteinadsorption auszeichnen, die jedoch praktisch nicht beobachtet wird.

Von Szleifer wurde die Proteinadsorption nach der *Single-Chain Mean-Field Theory* behandelt [71], [72]. Dieses Modell weist im Gegensatz zu demjenigen von Jeon auf die Bedeutung der PEG-Kettendichte und die daraus resultierende Kettenkonformation hin; dagegen wird der Kettenlänge der PEG-Moleküle in diesem Modell nur eine geringe Bedeutung zugewiesen.

Experimentell bewiesen werden konnte vor allem die theoretische Voraussage der Bedeutung von Kettenlänge und des Bedeckungsgrades der PEG-Beschichtung auf ihre Proteinresistenz. So zeigte sich, dass mit der Erhöhung der Anzahl an EG-Einheiten von 10 bis auf 120 Einheiten eine Steigerung der Proteinresistenz einhergeht [73], [74], [75]. Diese kann vor allem auf den höheren Hydratationsgrad sowie die Zunahme an konformeller Entropie und der Mobilität der PEG-Ketten zurückgeführt werden, welche insgesamt zu verstärkten sterischen Abstoßungskräften (Vergrößerung des Ausschlussvolumens) führen.

Unter diesem Aspekt kann jedoch angemerkt werden, dass auch bei Oligoethylenglykol-terminierten Alkanthiolmonolagen, die eine einheitliche Kettenlänge aufweisen, selbst bei einem EG-Gehalt von nur 2 Einheiten pro Molekül Proteinresistenz beobachtet wird [76], [77]. Das Modell der sterischen Repulsion kann zur Erklärung ihrer proteinresistenten Eigenschaften jedoch nicht mehr herangezogen werden. Da diese Verbindungen sehr dichte und wohlge-

ordnete Monolagen ausbilden, dringt zum einen nur sehr wenig Wasser in den Film ein. Ihr Hydratationsgrad ist somit nur gering und der Effekt einer durch die Proteinadsorption hervorgerufenen kompressiven Entwässerung fällt daher vernachlässigbar aus. Außerdem ist die geordnete Struktur dieser Filme bereits schon mit einer geringen Entropie verbunden; die mit einer kompressiven Adsorption verbundene Entropieabnahme liegt daher ebenfalls in einem vernachlässigbaren Bereich.

Obwohl die Mechanismen ihrer Proteinresistenz bislang ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt sind, werden in der Literatur zu ihrer Begründung vor allem 2 verschiedene Modelle diskutiert: die Ausbildung einer stabilen und hoch geordneten Wasser-Zwischenschicht zwischen Oberfläche und dem umgebenden Medium sowie das Auftreten lang-reichweitiger elektrostatischer Abstoßungskräfte zwischen Oberfläche und Protein [74], [77], [78].

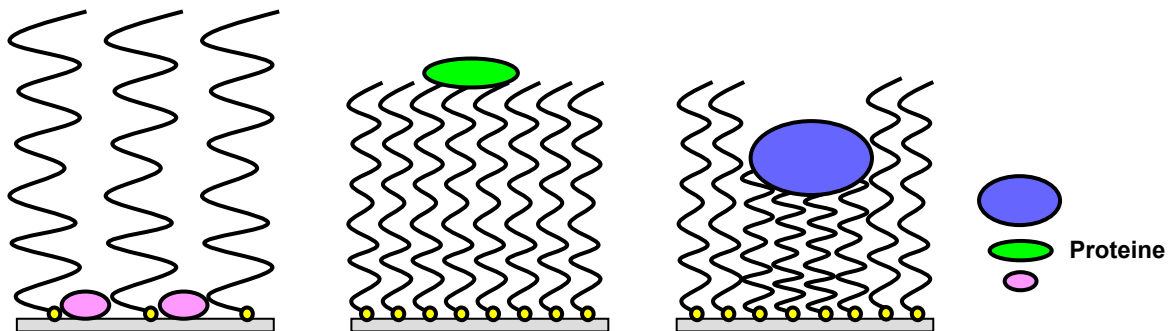
Experimentell konnte in einigen Fällen die Ausbildung einer bis zu 5 nm dicken Wasser-Zwischenphase zwischen der Oberfläche und dem umgebenden Medium festgestellt werden, die eine um den Faktor 10^6 höhere Viskosität als Wasser im Volumen besitzt (Interfacial Force Microscopy) [81]. Ihre Ausbildung wird auf starke Wasserstoffbrückenbindungen zur OEG-Schicht zurückgeführt, die eine langreichweitige Ordnung der Wasserstoffmoleküle zur Folge hat. Durch die Ausbildung einer solchen viskosen Zwischenschicht wird die Proteinadsorption gehemmt, da diese die Oberfläche nicht mehr erreichen können.

In anderen Fällen wurden stattdessen jedoch elektrostatische Wechselwirkungskräfte mit einer Reichweite von mehreren 10 nm beobachtet, die auf eine Ausbildung von negativen Oberflächenladungen schließen lassen und eine abstoßende Kraft auf die üblicherweise negativ geladenen Proteine ausüben (AFM; Kraft-Abstands-Kurven) [82], [83].

Allgemein kann daher hier zusammengefasst werden, dass die einzigartigen Wechselwirkungen der (P)(O)EG-Beschichtungen mit Wasser als Schlüsselfaktor zum Verständnis ihrer Wechselwirkungen mit Proteinen und somit zur Erklärung ihrer proteinresistenten Eigenschaften angesehen werden können.

2.2.4 Mechanismen der Proteinadsorption

Bezüglich der Proteinadsorption sind je nach Ausmaß der PEG-Bedeckung und der Art des adsorbierenden Proteins drei verschiedene Adsorptionsmodi möglich, die in der Abbildung II.1.2-5 dargestellt sind [30].



Ab. II.1.2-5: Abhängigkeit der Adsorptionsart von der Größe der Proteine.
(1) Invasiver Mechanismus; (2) Nicht-invasive Adsorption; (3) Kompressive Adsorption.

Der in (1) dargestellte invasive Mechanismus, bei der das Protein durch die PEG-Beschichtung hindurch auf die Substratoberfläche diffundiert, ist vor allem im Fall kleinerer Proteine von Bedeutung und wenn der Bedeckungsgrad der PEG-Beschichtung nicht ausreicht, um die Substrat-Protein-Wechselwirkungen effektiv zu unterdrücken. Von einer solchen Adsorption wird z.B. in [47] berichtet.

Eine weitgehend kompressionsfreie Adsorption ist dagegen bei mittelgroßen Proteinen zu erwarten und kann z.B. durch van der Waals und elektrostatische Wechselwirkungskräfte vermittelt werden ((2); nicht-invasive Adsorption).

Größere Proteine adsorbieren hingegen unter Kompression der PEG-Beschichtung ((3); kompressive Adsorption) [84].

Vollständige Proteinresistenz besteht nur bei Abwesenheit aller 3 Adsorptionsvarianten und erfordert daher neben einem hohen Bedeckungsgrad die Minimierung des Auftretens von attraktiven Wechselwirkungskräften.

Kontrolliert werden kann die Proteinadsorption zum einen durch die Einführung langreichweitiger Abstoßungskräfte zwischen Protein und Oberfläche, die eine hochenergetische Potentialbarriere darstellen und die Annäherung von Protein und Oberfläche unterbinden.

Kann eine Proteinannäherung an die Oberfläche auf diesem Weg jedoch nicht verhindert werden, so wird diese durch die Art der kurzreichweitigen Wechselwirkungskräfte determiniert. Um eine unspezifische Adsorption in diesem Fall zu vermeiden, müssen die zwischen Protein und Oberfläche bestehenden attraktiven Wechselwirkungskräfte minimiert werden.

Als solche sind zum einen van der Waals Kräfte zu nennen; je nach Ladung von Protein und Oberfläche treten gegebenenfalls auch Wechselwirkungen zwischen der elektrischen Dop-

pelschicht von Protein und Oberfläche auf, deren Ausmaß durch die Ionenstärke der Lösung beeinflusst wird. Elektrostatische Wechselwirkungen sind zu erwarten, wenn Oberflächenladungen des festen Substrates durch die PEG-Beschichtung entweder nicht hinreichend abgeschirmt werden oder die verwendete PEG-Matrix selbst geladene (oder in Wasser deprotonier- oder dissoziierbare) Funktionalitäten aufweist [85], [86].

Die repulsiven Wechselwirkungen betreffen zum einen die mit der Proteinadsorption einhergehende Kompression und Dehydratisierung der PEG-Beschichtung (*steric exclusion*). Diese Effekte, welche mit der Größe der adsorbierenden Proteine zunehmen, sind mit einer Entropieabnahme und einem Enthalpieanstieg verbunden und wirken der Adsorption somit entgegen.

Daher üben auch Ausmaß und Struktur der ausgebildeten Hydrathülle, sowohl auf Seiten des Proteins als auch der Oberfläche, auf den Adsorptionsprozess eine entscheidende Bedeutung aus. Hinsichtlich der PEG-Beschichtung wird das Ausmaß der Hydrathülle zum einen durch die Kettenlänge und den Bedeckungsgrad determiniert [68], [69].

Analog zu den OEG-SAMS kann allerdings auch bei dieser polymeren Verbindungsklasse die These der Ausbildung einer strukturierten Wasser-Zwischenschicht diskutiert werden [87], [88]. So ist es z.B. möglich, dass die Konformation der PEG-Ketten im Fall einer Ausbildung von polaren Anordnungen eine Beeinflussung der Wasserstruktur zur Folge hat (s. Dipolmodell, Abs. 2.2.1); besitzen die PEG-Ketten in Wasser geladene Funktionalitäten, so üben auch diese einen Einfluss auf die Struktur der sich ausbildenden Wasserschicht aus. Protonier- oder dissoziierbare Endgruppenfunktionalitäten verschieben weiterhin das Protonengleichgewichts des Wassers und bilden auf diese Weise Oberflächenladungen aus, die ebenfalls eine Strukturierung des umgebenden Wassers verursachen.

Die Bedeutung einer stabilen, geordneten und gegebenenfalls auch polaren oder geladenen Wasser-Zwischenschicht auf die Proteinresistenz der PEG-Beschichtungen lässt sich wie in Abschnitt 2.2.3 für die OEG-Beschichtungen bereits beschrieben, erklären. Sie verhindert den Kontakt zwischen Oberfläche und Protein.

Zusammenfassend bestehen daher hinsichtlich der PEG-Beschichtungen folgende Einflussfaktoren auf die Proteinresistenz:

- Bedeckungsgrad
- Kettenlänge
- Konformation
- Funktionalität

Hierbei ist zu beachten, dass die genannten Parameter teilweise miteinander in Beziehung stehen.

II.II Oberflächenplasmonenresonanz

1 Propagierende Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Die Oberflächenplasmonenresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) kann als spektroskopische Methode zur Messung von Schichtdicken und der dielektrischen Eigenschaften dünner Filme angewandt werden.

Obwohl sich Oberflächenplasmonen bereits durch die Theorien von Fresnel und Maxwell [89] aus den Jahren 1821-1832 und 1873 erklären lassen, wurden sie erst 1957 durch Ritchie [90] theoretisch beschrieben.

1968 wurde die Anregung von Oberflächenplasmonen durch geschwächte Totalreflexion erstmals von Otto [91] und in einer anderen Messanordnung von Kretschmann und Raether [92] zur Bestimmung des Brechungsindex verwendet.

Anfang der frühen 90er Jahre wurde das Prinzip der SPR zur Entwicklung einer neuen Klasse von Biosensoren verwendet, welche eine markierungsfreie Analyse biomolekularer Wechselwirkungen in Echtzeit erlauben (Biomolecular Interaction Analysis, BIA).

Im Folgenden sind die theoretischen Grundlagen der Oberflächenplasmonenresonanz dargestellt; die Gleichungen sind, sofern keine anderen Literaturstellen angegeben sind, [93], [94] und [95] entnommen.

1.1 Theoretische Grundlagen der Oberflächenplasmonenresonanz

1.1.1 Anregung nichtstrahlender Oberflächenplasmonen

Das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz kann beobachtet werden, wenn parallel polarisiertes Licht unter den Bedingungen der totalen inneren Reflexion (TIR) auf ein Prisma trifft, dessen Unterseite mit einem dünnen Metallfilm beschichtet ist (s. Abb. II.II.1-1).

Totale innere Reflexion tritt auf, wenn ein Lichtstrahl auf ein Prisma unter einem Einstrahlwinkel Θ trifft, der größer als der kritische Winkel Θ_c ist. In diesem Fall wird das gesamte eingestrahlte Licht reflektiert. Obwohl bei der TIR keine Energie transmittiert wird, erstreckt sich das elektrische Feld der Photonen jedoch etwa eine viertel Wellenlänge hinweg in das optisch dünnere Medium (Luft) hinein, so dass im Totalreflexionsbereich die Intensität des elektromagnetischen Feldes jenseits der Grenzfläche nicht abrupt auf Null abfällt. Stattdessen läuft eine harmonische Welle parallel zur Oberfläche und ein Teil, das sog. *evaneszente Feld*, dringt auch in das optisch dünnere Medium ein. Die Amplitude dieser Welle fällt exponentiell ab.

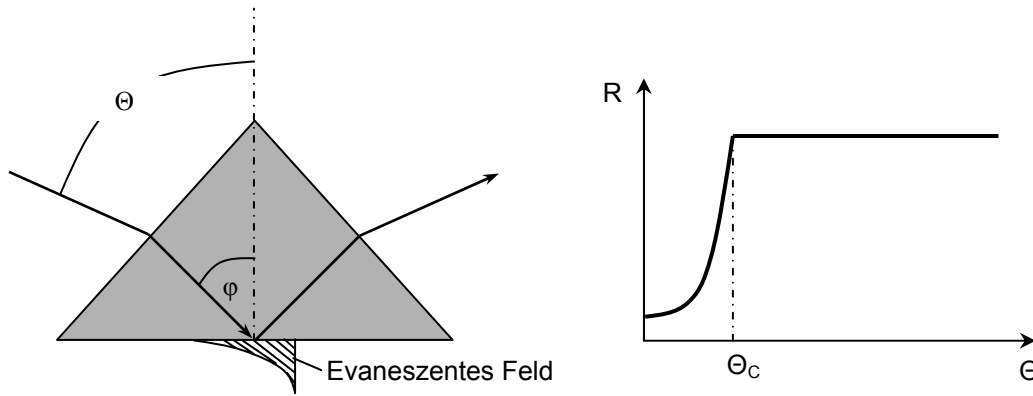


Abb. II.II.1-1: Links: Schematische Darstellung des Strahlengangs bei der TIR (Totale Innere Reflexion) und des sich ausbildenden evaneszenten Feldes. Rechts: Reflexivität in Abhängigkeit vom Einstrahlwinkel.

Wird nun auf der Unterseite des Prismas ein dünner Metallfilm (ca. 50 nm dicker Goldfilm) aufgebracht, so erhöht sich zunächst die Reflexivität unterhalb des kritischen Winkels, da der Metallfilm als teildurchlässiger Spiegel wirkt. Oberhalb der Totalreflexionskante jedoch wechselwirkt das evaneszente Feld mit dem nahezu freien Elektronengas im Metall. Bei einem bestimmten Winkel Θ_0 koppeln Photonen resonant mit den Elektronen und regen eine Plasmaschwingung an. Dieser gekoppelte Zustand (kollektive Schwingung der Leitungsbandelektronen) wird als Oberflächenplasmonenresonanz bezeichnet. In der Reflexionskurve tritt daher beim Winkel Θ_0 ein scharfes Minimum auf, bei dem die gesamte Energie der Photonen im Metall dissipiert wird.

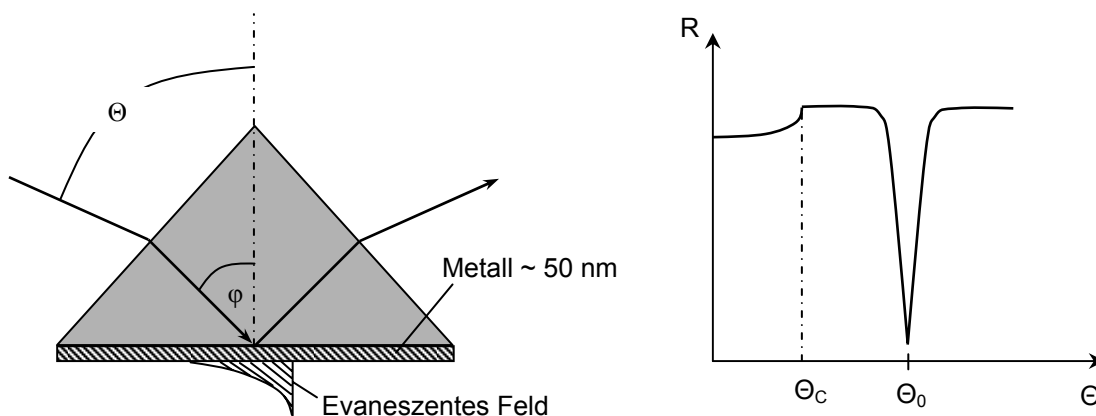


Abb. II.II.1-2: Links: Anregung von Oberflächenplasmonen in der auf der Prismenunterseite aufgetragenen Metallschicht bei der TIR. Rechts: Reflexivität in Abhängigkeit vom Einstrahlwinkel bei zusätzlicher Anregung von Oberflächenplasmonen.

Die Plasmonenschwingung erzeugt ebenfalls ein elektromagnetisches Feld, das dem evaneszenten Feld vergleichbar ist und sich nach beiden Seiten der Metall-Glas-Grenzfläche erstreckt; da die Amplitude exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche abfällt, wird es

ebenfalls als Evaneszentfeld bezeichnet. Die Wellenlänge dieses evaneszenten Feldes entspricht der zur Oberfläche parallelen Komponente des eingestrahlten Lichts. In der Abb. II.II.1-3 ist der sogenannte Kretschmann-Aufbau zur Messung der Oberflächenplasmonen dargestellt.

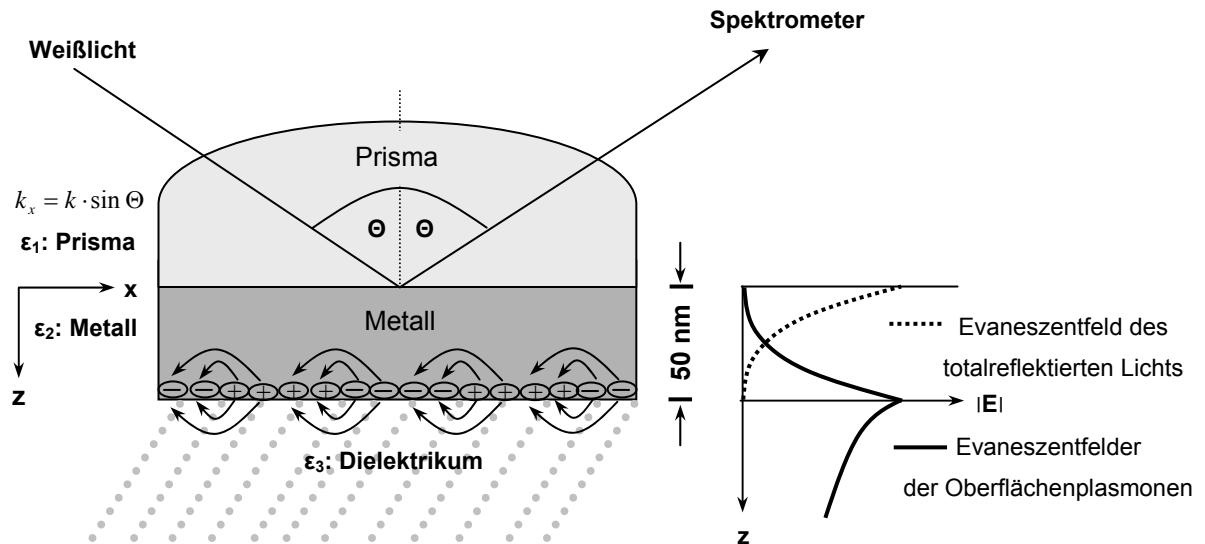


Abb. II.II.1-3: Schematische Darstellung des Kretschmann-Aufbaus zur Detektion angeregter Oberflächenplasmonen; nach [95].

Wie alle physikalischen Prozesse muss auch die bei der Anregung von Oberflächenplasmonen stattfindende Transformation eines Photons in ein Plasmon unter Erhalt von Energie und Impuls erfolgen. Daher müssen sich die Dispersionsrelationen, also die Abhängigkeiten der Energie vom Impuls für Licht und Oberflächenplasmonen, wie in Abb. II.II.1-4 dargestellt, schneiden.

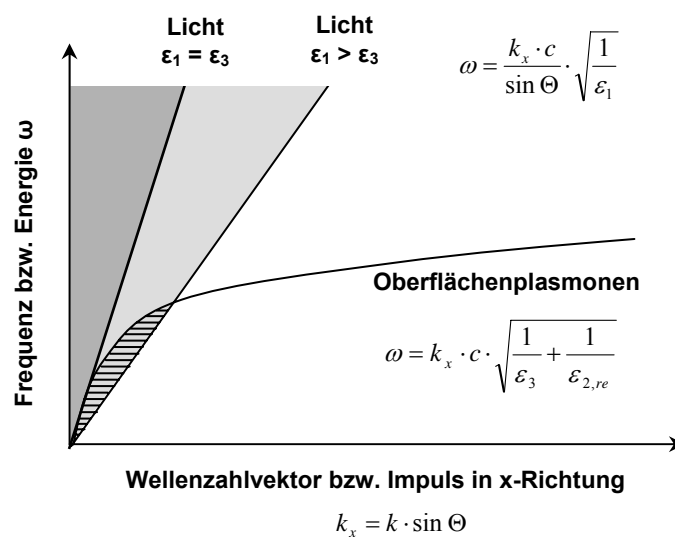


Abb. II.II.1-4: Dispersionsrelationen von Licht im Prisma (ϵ_1) und von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Metall (ϵ_2)/Dielektrikum (ϵ_3); nach [95].

Für die Ausbreitung von Licht in einem Medium mit der dielektrischen Funktion ε_1 , im vorliegenden Fall dem Prisma, gilt nach den *Maxwellgleichungen*:

$$\omega = k \cdot c \cdot \sqrt{\frac{1}{\varepsilon_1}} \quad \text{oder} \quad k = \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\varepsilon_1} \quad (3)$$

mit der Kreisfrequenz ω , dem Betrag des Wellenvektors k und der Lichtgeschwindigkeit c . Für die gezeigte Anordnung gilt nach geometrischer Betrachtung mit dem Betrag des Wellenvektors k_x in Ausbreitungsrichtung der Oberflächenplasmonen x und dem Einstrahlwinkel Θ :

$$\omega = \frac{k_x \cdot c}{\sin \Theta} \cdot \sqrt{\frac{1}{\varepsilon_1}} \quad \text{oder} \quad k_x = \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\varepsilon_1} \cdot \sin \Theta \quad (4)$$

Diese Energie-Impuls-Relation des Lichts im hochbrechenden Prisma bleibt im evaneszenten Feld des totalreflektierten Lichtes erhalten [96].

Verbunden mit den Oberflächenplasmonen sind wie beschrieben zwei Evaneszenzfelder, die von der Grenzfläche Metall/Dielektrikum entlang der z -Achse in beide Medien abfallen. Ohne Berücksichtigung des Prismas, gehen in die Dispersionsrelation des Oberflächenplasmons die dielektrische Funktion ε_3 des Dielektrikums und der Realteil der dielektrischen Funktion $\varepsilon_{2, \text{re}}$ des Metalls ein.

$$\omega = k_x \cdot c \cdot \sqrt{\frac{1}{\varepsilon_3} + \frac{1}{\varepsilon_{2, \text{re}}}} \quad \text{oder} \quad k_x = \frac{\omega}{c} \cdot \sqrt{\frac{\varepsilon_{2, \text{re}} \cdot \varepsilon_3}{\varepsilon_{2, \text{re}} + \varepsilon_3}} \quad (5)$$

Für $\varepsilon_1 \leq \varepsilon_3$ ist die Steigung der Dispersionskurve der Oberflächenplasmonen für jeden Einstrahlwinkel kleiner als die des Lichtes. Die Lichtgerade und die Oberflächenplasmonen-Dispersionskurve schneiden sich, wie in Abb. II.II.1-4 gezeigt, nicht. Der dunkelgraue Bereich markiert den durch die unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten und Einfallswinkel möglichen Bereich der Lichtgeraden.

Für $\varepsilon_1 > \varepsilon_3$ ist jedoch bei genügend großem Einstrahlwinkel Θ und großem Betrag des Realteils der Dielektrizitätskonstanten des Metalls $\varepsilon_{2, \text{re}}$ eine Anregung der Oberflächenplasmonen möglich. Je nach Einstrahlwinkel und ε_1 überschneiden sich die Dispersionskurven innerhalb des schraffierten Bereichs der Abb. II.II.1-4. Der hellgraue Bereich markiert den durch die unterschiedlichen Dielektrizitätskonstanten und Einfallswinkel möglichen Bereich der Lichtgeraden. Damit ist die Notwendigkeit der Verwendung des hochbrechenden Prismas erklärt, da eine direkte Anregung beim Einstrahlen durch das Umgebungsmedium aufgrund des zu geringen Impulses des Lichtes nicht möglich wäre.

1.1.2 Bestimmung der Resonanzwellenlänge

Die Resonanzbedingung ergibt sich durch Gleichsetzen des Impulses bzw. der Energie des Oberflächenplasmons (5) mit der des anregenden Lichts (4):

$$\sin \Theta \cdot \sqrt{\varepsilon_1(\lambda)} = \sqrt{\frac{\varepsilon_{2, \text{re}}(\lambda) \cdot \varepsilon_3(\lambda)}{\varepsilon_{2, \text{re}}(\lambda) + \varepsilon_3(\lambda)}} \quad (6)$$

Diese Gleichung lässt sich bei Kenntnis der Dispersionsverläufe des Prismas, des Metalls und des Dielektrikums numerisch lösen. Eine analytische Lösung unter Berücksichtigung aller Dispersionsverläufe ist nicht möglich.

Die Resonanzgleichung (6) zeigt weiterhin, dass Änderungen der dielektrischen Funktion der an den Metallfilm angrenzenden Schicht (ε_3), hervorgerufen etwa durch Adsorptionsprozesse, somit zu einer Änderung der Resonanzwellenlänge λ bei festem Einstrahlwinkel Θ führen.

1.1.3 Eindringtiefe und Testtiefe

Oberflächenplasmonen sind als oberflächengebundene Wellen mit zwei Evaneszenzfeldern, die von der Grenzfläche senkrecht in den Raum abfallen, verbunden. Ihr Zustandekommen und ihre Reichweite sollen im Folgenden erklärt werden. Der Wellenvektor k_z , der senkrecht zur Grenzfläche ins Medium v gerichtet ist ($v = 2,3$), also Metall oder Dielektrikum (s. Abb. II.II.1-3), berechnet sich nach (3) und geometrischer Betrachtung folgendermaßen:

$$k_{zv} = \sqrt{k_v^2 - k_x^2} = \sqrt{\varepsilon_v \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - k_x^2} \quad (7)$$

Da k_x in beiden Medien konstant bleibt, k_v jedoch kleiner ist als k_x , ist k_{zv} nach (7) imaginär. Damit fällt das elektrische Feld E nach

$$E = E_0 \cdot e^{-|i \cdot k_{zv}| \cdot z} = E_0 \cdot e^{-\frac{z}{l_d}} \quad (8)$$

von der Grenzfläche ab; es existiert ein Evaneszenzfeld. Die Länge, bei der das elektrische Feld auf e^{-1} abgefallen ist, l_d , gibt dabei die Eindringtiefe im Medium v an; sie wird auch als Abschwächungslänge bezeichnet und ist definiert nach:

$$l_d = \frac{1}{|i \cdot k_{zv}|} \quad (9)$$

Physikalisch relevant ist jedoch nicht das elektrische Feld, sondern die Intensität, welche zum Quadrat des elektrischen Feldes proportional ist. Daher gilt:

$$I \propto |E|^2 = |E_0|^2 \cdot e^{-2|i \cdot k_{zv}| \cdot z} = |E_0|^2 \cdot e^{-\frac{2 \cdot z}{l_d}} = |E_0|^2 \cdot e^{-\frac{z}{l_d^I}} \quad (10)$$

Damit kann die Testtiefe l_d^I als halbe Abschwächungslänge (11) definiert werden [97], [98]:

$$l_d^I = \frac{1}{2} \cdot l_d = \frac{1}{2 \cdot |i \cdot k_{zv}|} \quad (11)$$

Einsetzen von (5) und (7) unter Vernachlässigung des Imaginärteils von k_x (für $\varepsilon_i \ll |\varepsilon_r|$ zulässig) in (11) ergibt die Testtiefe im Dielektrikum (ε_3):

$$l_d^I = \left| \frac{i \cdot c \cdot \sqrt{\varepsilon_{2,re} + \varepsilon_3}}{2 \cdot \omega \cdot \varepsilon_3} \right| = \left| \frac{i \cdot \sqrt{\lambda \cdot \varepsilon_{2,re} + \varepsilon_3}}{4 \cdot \pi \cdot \varepsilon_3} \right| \quad (12)$$

Die Abschwächungslänge bzw. Testtiefe bestimmt die Sensitivität dieser Methode; effektiv können daher nur Schichtdicken innerhalb der Abschwächungslänge l_d bestimmt werden.

1.1.4 Berechnung der Reflektivitäten eines Mehrschichtsystems

Die bisherigen Berechnungen wurden auf der Grundlage der *Maxwellgleichungen* durchgeführt. Eine zweite Möglichkeit zur Bestimmung der Resonanzwellenlänge beruht auf der Berechnung der Reflektivitäten eines Mehrschichtsystems für verschiedene Wellenlängen auf Grundlage der *Fresnelgleichungen*. Das Minimum der Reflektivität entspricht der Resonanzwellenlänge.

Die Reflexion eines Zweischichtsystems bei gegebenem Einstrahlwinkel Θ lässt sich durch die Fresnelgleichungen beschreiben. Eine Erweiterung dieser Gleichungen durch rekursive Berechnung ermöglicht auch die Anwendung auf Mehrschichtsysteme [99].

Für den Reflexionsgrad R gilt

$$R = |r|^2 \quad (13)$$

Der Fresnelkoeffizient eines Dreischichtsystems berechnet sich nach:

$$r = \frac{r_{12} + r_{23} \cdot e^{(i \cdot 2 \cdot k_{z2} \cdot d_2)}}{1 + r_{12} \cdot r_{23} \cdot e^{(i \cdot 2 \cdot k_{z2} \cdot d_2)}} \quad (14)$$

r_{12} und r_{23} entsprechen den Fresnelkoeffizienten für die Reflexion an den Grenzflächen 1|2 und 2|3.

$$r_{12} = \frac{\varepsilon_2 k_{z1} - \varepsilon_1 k_{z2}}{\varepsilon_2 k_{z1} + \varepsilon_1 k_{z2}} \quad r_{23} = \frac{\varepsilon_3 k_{z2} - \varepsilon_2 k_{z3}}{\varepsilon_3 k_{z2} + \varepsilon_2 k_{z3}} \quad (15)$$

Die Wellenvektoren sind nach Gleichung (7) definiert.

Bei festem Einstrahlwinkel Θ ist der Reflexionsgrad R also eine Funktion der dielektrischen Konstante der an der Metallschicht angrenzenden Schicht (ϵ_3), welche nach Maxwell dem quadrierten Brechungsindex (n_3) entspricht.

1.1.5 Anregungs- und Detektionsmöglichkeiten

Bei Verwendung eines Kretschmann-Aufbaus wird allgemein entweder Weißlicht parallel eingestrahlt und die Resonanzwellenlänge bestimmt oder monochromatisches Licht unter mehreren Winkeln eingestrahlt und der Resonanzwinkel bestimmt. Diese winkelaufgelöste Detektion wird in dem kommerziell erhältlichen Instrument „BIAcore“ der Firma Pharmacia Biosensor, Schweden, verwendet.

1.2 Einsatz von SPR in der biomedizinischen Diagnostik [94], [98], [100]

Die SPR-Spektroskopie ermöglicht eine Echtzeit-Verfolgung von Änderungen der Schichtdicke als auch des Brechungsindex der an der Metallschicht angrenzenden Sensorschicht, die z.B. durch biomolekulare Adsorptionsprozesse hervorgerufen werden können.

Die praktischen Anwendungen der SPR-Spektroskopie in der biomedizinischen Diagnostik betreffen daher vor allem eine Bestimmung von Affinitätsparametern verschiedener biologischer Wechselwirkungssysteme. Hierbei wird ein Ligand, dieser kann z.B. ein Protein oder DNA-Abschnitt sein, auf der Sensoroberfläche immobilisiert und der in einem geeigneten Puffer gelöste Bindungspartner wird in einem Fließkanal über die Oberfläche geleitet [94]. Durch die Bindung des Analyten ändern sich die dielektrischen Eigenschaften der Sensorschicht, wodurch eine Verschiebung der Oberflächenplasmonenresonanz resultiert. Der Vergleich der gemessenen Plasmonenverschiebung mit einer zuvor erstellten Eichkurve erlaubt eine quantitative Bestimmung der gebundenen Analytkonzentration.

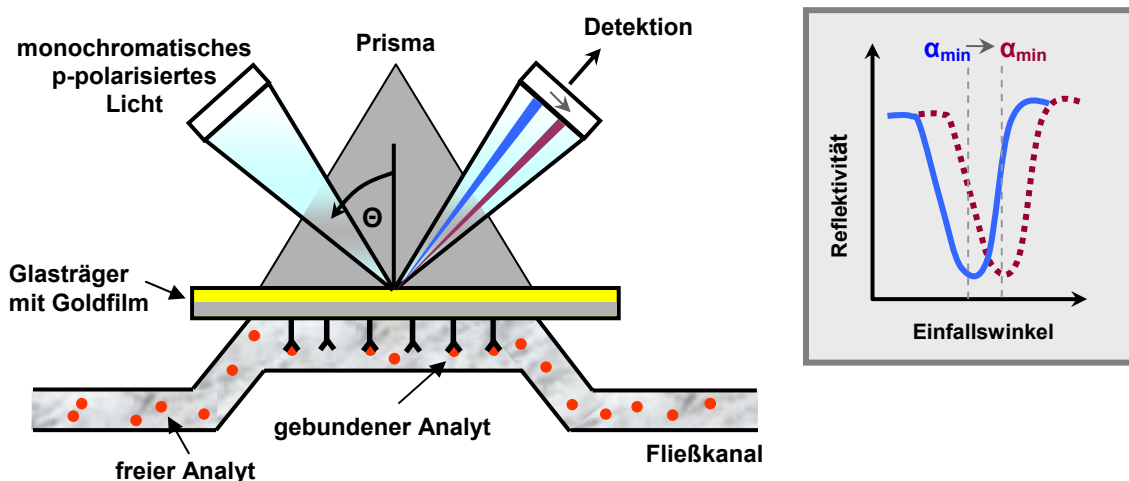


Abb. II.II.1-5: Schematische Darstellung der Detektion biomolekularer Wechselwirkungen mit Hilfe der SPR-Spektroskopie.

Auf diese Weise können unter anderem Bindungs- und Dissoziationskonstanten (z.B. von Antikörper/Antigen-, Enzym/Substrat-, DNA/RNA-, DNA/DNA- und von Protein/Protein-Wechselwirkungen) bestimmt werden.

Die Änderung des Resonanzwinkels wird in der Praxis in Resonanzeinheiten (Resonance Units, RU) angegeben. Einer Antwort von 10^3 RU entspricht eine Winkeländerung von 0,1 Grad, die im Falle einer Bindung von Proteinen ($\eta = 1,5$) mit einer Massenbelegung von etwa 1 ng/mm^2 verbunden ist [100]. Die Ausgabe der Daten erfolgt in Form eines Sensorgramms, in dem der RU-Wert in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen ist.

Die Genauigkeit der Messungen wird bei einer Winkeländerung durch die Goniometerpräzision bestimmt, welche etwa $\Delta\theta = \pm 0,01^\circ$ beträgt und Schichtdickenbestimmungen mit einer Auflösung von 0,1 nm ermöglicht [94].

Die gängigen SPR-Sensoren erlauben eine Detektion von Brechungsindex-Änderungen von weniger als 10^{-5} Einheiten innerhalb einer Zeitauflösung von ein paar Sekunden. Bedingt durch die Abschwächungslänge l_d , welche etwa 200 nm beträgt, können effektiv nur Schichtdicken innerhalb dieses Abstandes von der Sensoroberfläche bestimmt werden [98].

1.3 Quantitative Detektion mittels SPR [98]

Viele SPR-Anwendungen betreffen eine Analyse dünner Filme, deren Schichtdicken sehr viel kleiner als die Abschwächungslänge l_d sind und die somit in den linearen Antwortbereich des Sensors fallen.

Für dickere Filme sagen die Maxwell'schen Gleichungen jedoch eine mit dem Abstand zur Sensoroberfläche exponentiell abnehmende Sensorantwort voraus (s. Gleichung (10)).

Im Folgenden wird kurz ein vereinfachendes Modell dargestellt, das eine Bestimmung von Schichtdicken und Oberflächenkonzentrationen auf Basis der SPR-Verschiebung erlaubt.

1.3.1 Abhängigkeit der SPR-Antwort vom umgebenden Brechungsindex

Die experimentell beobachtete Verschiebung der Resonanzwellenlänge in Abhängigkeit vom Brechungsindex der umgebenden Lösung weist einen ansteigenden Kurvenverlauf auf, der innerhalb eines kleineren Bereiches von η -Werten näherungsweise linear interpoliert werden kann.

$$R = m \cdot \Delta\eta = m \cdot (\eta_{final} - \eta_{initial}) \quad (16)$$

Die Steigung m kann hierbei als Sensitivitätsfaktor des Sensors verstanden werden. Wird jedoch ein größerer Bereich von η -Werten in den Messungen abgedeckt, so muß die Gleichung (16) auf Polynome höheren Grades erweitert werden. Durch Addition eines 2. quadratischen Terms ergibt sich z.B.:

$$R = m_1 \cdot \Delta\eta_1 + m_2 \cdot \Delta\eta_2^2 \quad (17)$$

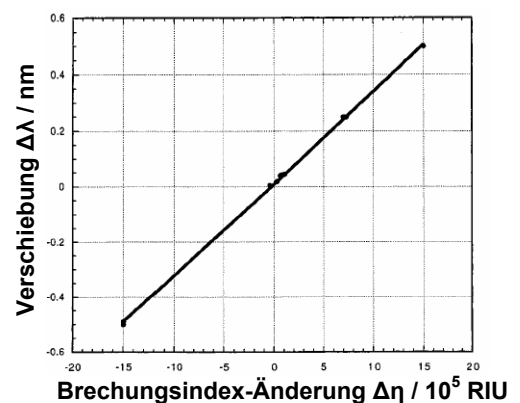


Abb. II.II.1-6: Resonanzverschiebung der SPR in Abhängigkeit von der Änderung des umgebenden Brechungsindex, aus [98].

1.3.2 SPR-Antwort bei einer Monolage einheitlicher Dicke

Bezeichnet man mit η_a den Brechungsindex der reinen adsorbierten Spezies und mit η_s denjenigen der umgebenden Lösung, so sollte der effektive Brechungsindex der sich aus Lösung bildenden Monolage η_{eff} ein geeignet gewichtetes Mittel dieser beiden Werte darstellen. Für die zu erwartende SPR-Antwort R (Änderung der Resonanzwellenlänge oder des Resonanzwinkels) folgt somit bei Anwendung von Gleichung (16)

$$R = m \cdot (\eta_{\text{eff}} - \eta_s) \quad (18)$$

bzw. im Fall von Gleichung (17)

$$R = m_1 \cdot (\eta_{\text{eff}} - \eta_s) + m_2 \cdot (\eta_{\text{eff}} - \eta_s)^2 \quad (19)$$

Es ist anzunehmen, dass die Wichtungsfaktoren in jedem Punkt z der Monolage proportional zur Intensität des Lichts an diesem Punkt sein sollten. Nach (10) ergibt sich der effektive Brechungsindex somit zu:

$$\eta_{\text{eff}} = \left(2/l_d\right) \int_0^{\infty} \eta(z) \cdot \exp(-2z/l_d) \quad (20)$$

Für die beschriebene einfache Bilayer-Struktur mit den Randbedingungen $\eta(z) = \eta_a$ für $0 < z < d$ und $\eta(z) = \eta_s$ für $d < z < \infty$ lautet die Lösung dieses Integrals

$$\eta_{\text{eff}} = \eta_s + (\eta_a - \eta_s) \cdot [1 - \exp(-2d/l_d)] \quad (21)$$

Für die Verschiebung der Resonanzlage folgt somit gemäß Gleichung (18)

$$R = m(\eta_{\text{eff}} - \eta_s) = m(\eta_a - \eta_s)[1 - \exp(-2d/l_d)] \quad (22)$$

Ein zu Gleichung (22) qualitativ ähnliches Ergebnis ergibt sich auch durch Lösen der Maxwell'schen Gleichungen.

Die Abschwächungswellenlänge l_d des evaneszenten Feldes liegt in einem Bereich zwischen $\frac{1}{2}$ bis $\frac{1}{4}$ der Resonanzwellenlänge und beträgt somit etwa 200 - 300 nm. Die Schichtdicke d adsorbierter Lagen ist daher in vielen Fällen im Vergleich zu l_d gering, so dass die Gleichung (22) weiter vereinfacht werden kann. Die Entwicklung in eine Taylor-Reihe um den Nullpunkt führt bei Abbruch nach dem 2. Glied zu

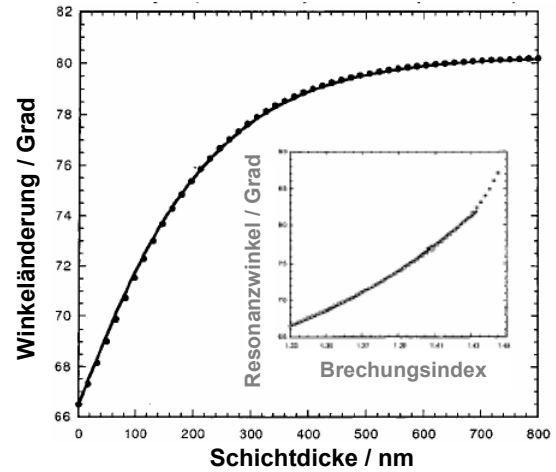


Abb. II.II.1-7: Resonanzverschiebung der SPR (Winkeländerung) in Abhängigkeit von der Schichtdicke aufgebrachtener Adsorbatlagen (Inset: Abhängigkeit vom Brechungsindex); aus [98].

$$R = m \cdot (\eta_a - \eta_s) \cdot 2 \cdot d / l_d \quad (23)$$

also einem linearen Zusammenhang zwischen Schichtdicke und Sensorantwort. Kann im Messbereich jedoch keine Proportionalität zwischen der Änderung des Brechungsindex und der Sensorantwort angenommen werden, so folgt für Gleichung (19)

$$R = m_1 (\eta_a - \eta_s) [1 - \exp(-2d / l_d)] + m_2 \{ (\eta_a - \eta_s) [1 - \exp(-2d / l_d)] \}^2 \quad (24)$$

1.3.3 Schichtdickenbestimmung

Die Gleichungen (22) bzw. (24) erlauben eine Abschätzung der Schichtdicke auf Grundlage der beobachteten Änderung der Resonanzlage R , sofern die Sensitivitätsparameter m bzw. m_1 und m_2 zuvor durch entsprechende Eichmessungen ermittelt wurden.

Aus der Gleichung (22) erhält man für die Adsorbat-Schichtdicke den folgenden Ausdruck

$$d = -(l_d / 2) \cdot \ln(1 - R / R_{\max}) \quad (25)$$

R_{\max} bezeichnet hierbei die maximale Sensorantwort, welche einer unendlich dicken Adsorbatlage zu zuordnen ist

$$R_{\max} = m(\eta_a - \eta_s) \quad (26)$$

Im Vergleich zu l_d geringe Schichtdicken d führen somit zu einer linearen Beziehung zwischen den Änderungen von Schichtdicke und der Resonanzlage; eine Reihenentwicklung der Funktion (25) um den Nullpunkt unter Vernachlässigung höherer Glieder ergibt

$$d = (l_d / 2) \{ R / m(\eta_a - \eta_s) \} \quad (27)$$

Ist außerdem die Dichte des Moleküls im adsorbierten Zustand bekannt, so kann über die Schichtdickenbestimmung hinaus auch eine Ermittlung des Bedeckungsgrades erfolgen.

1.3.4 Abschätzung der Abschwächungswellenlänge l_d

In den oben angegebenen Gleichungen ist die Abschwächungslänge l_d ein Schlüsselparameter, welcher zugleich die effektive Sensitivität der SPR-Methode bestimmt. Sie kann auf etwa 37% ($\pm 13\%$) der Resonanzwellenlänge abgeschätzt werden [101], [102], [103].

Eine etwas genauere Ermittlung von l_d basiert auf den Maxwell'schen Gleichungen:

$$l_d = (\lambda / 2\pi) / \operatorname{Re} \left\{ -\eta_{\text{eff}}^4 / (\eta_{\text{eff}}^2 + \varepsilon_{\text{metal}}) \right\}^{1/2} \quad (28)$$

Hierbei steht λ für die Resonanzwellenlänge und ϵ_{metal} für die komplexe dielektrische Konstante des verwendeten Metalls bei dieser Wellenlänge; η_{eff} ist der effektive Brechungsindex der Adsorbatslage.

Allerdings sollte beachtet werden, dass der Ansatz eines einheitlichen Wertes für l_d über die gesamte Probentiefe hinweg nur eine Näherung darstellt, da dieser eigentlich vom lokalen Brechungsindex $\eta(z)$ abhängt und somit ortsabhängig ist; der effektive η_{eff} -Wert in Gleichung (20) wurde nur vereinfachend angenommen. Für die meisten Anwendungen ist jedoch der Ansatz eines einheitlichen l_d -Wertes möglich, da dieser zum einen nach (28) nur geringfügig vom Brechungsindex der angrenzenden Schicht abhängig ist und die meisten Schichtdicken d im Vergleich zu l_d gering sind, so dass die $\eta(z)$ -Werte im betrachteten Bereich auch nur geringfügig variieren.

1.3.5 SPR-Antwort von Multilayer-Strukturen

In vielen Adsorptionsstudien kommen Trilayer-Strukturen folgender Art vor

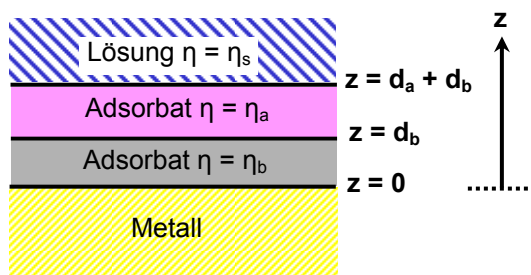


Abb. II.II.1-8: Schematische Darstellung einer Trilayer Struktur. Die Metallschicht ist mit einer Adsorbatschicht b funktionalisiert. Über dieser befinden sich wiederum die Schicht a und die freie Lösung s .

Hierbei wird die Sensoroberfläche zunächst mit einer Adsorbatschicht b funktionalisiert, welche wiederum zur selektiven Kopplung des sich in Lösung befindenden Analyten a unter Ausbildung der Adsorbatschicht a dient.

Analog zu Gleichung (21) kann auch ein effektiver Brechungsindex η_{eff} für die Trilayer-Struktur berechnet werden

$$\eta_{\text{eff}} = \eta_b \left[1 - \exp(-2d_b / l_d) \right] + \eta_a \left[\exp(-2d_b / l_d) \right] - \exp[-2(d_a + d_b) / l_d] + \eta_s \exp[-2(d_a + d_b) / l_d] \quad (29)$$

Für die durch die Bindung des Analyten a hervorgerufene Änderung der Resonanzlage folgt somit

$$R = m(\eta_a - \eta_s) \cdot \left[1 - \exp(-2d / l_d) \right] \cdot \exp(-2d / l_d) \quad (30)$$

Ein Vergleich mit Gleichung (22), welche für Bilayer-Systeme gilt zeigt, dass beide Gleichungen sich nur um den Faktor $\exp(-2d_b / l_d)$ unterscheiden; der Betrag der SPR-Antwort wird da-

her durch die zusätzliche Zwischenschicht b gerade um diesen Faktor abgeschwächt. Ist die Schichtdicke der Zwischenlage im Vergleich zu l_d gering, so beträgt dieser Faktor näherungsweise 1 und die Sensorantwort R wird durch die Anwesenheit der zusätzlichen Zwischenschicht b nicht wesentlich vermindert.

Liegt b jedoch in der Größenordnung von l_d , so kann dieser Abschwächungsfaktor nicht weiter vernachlässigt werden; der Betrag der Resonanzverschiebung wird durch Anwesenheit der Zwischenlage b auf etwa ein siebtel reduziert.

1.3.6 Korrekturen bei uneinheitlichem Bedeckungsgrad

Es tritt oft auf, dass die Adsorbatlage keinen homogenen Bedeckungsgrad aufweist, da die Adsorbatspezies uneinheitlich auf der Oberfläche unter Ausbildung von Clusterregionen bindet. Liegen die Ausdehnungen dieser Adsorbatinseln in der Größenordnung von l_d , so ist der lineare Antwortbereich des Sensors überschritten und eine Interpretation der Daten muss auf Grundlage der Gleichung (22) vorgenommen werden.

Die Größe vieler inselartig adsorbierenden Makromoleküle (z.B. der meisten Proteine und Antikörper) ist jedoch sehr viel geringer als l_d . Diese Adsorptionsprozesse fallen somit in den linearen Antwortbereich des Sensors und können daher nach Gleichung (23) interpretiert werden. Die Schichtdicke d entspricht hierbei einer parallel zur Oberfläche gemittelten Adsorbat-Dicke.

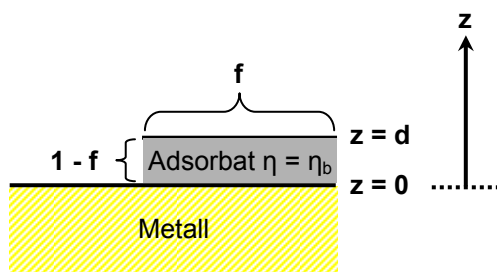


Abb. II.II.1-9: Schematische Darstellung einer Bilayer-Struktur, bei der die Schicht b unter Ausbildung von Cluster-Regionen auf der Metalloberfläche adsorbiert.

Wurde zur gezielten Proteinbindung (Proteinschicht a) bereits eine Lage Rezeptormoleküle b mit einer Dicke von d_b auf der Sensoroberfläche aufgebracht, so fällt die durch die Proteinbindung hervorgerufene Resonanzverschiebung R noch um einen Faktor $\exp(-2d_b/l_d)$ geringer aus und wird durch die Gleichung (30) beschrieben.

Die obigen Ausführungen zeigen, dass für Adsorbatlagen mit $d < l_d$ bei vorhergehender Eichung des Systems auf einfache Weise Schichtdicken und somit Oberflächenkonzentrationen bzw. der Bedeckungsgrad bestimmt werden kann. Die anzusetzende Abschwächungslänge kann grob aus der Resonanzwellenlänge oder etwas genauer nach Gleichung (28) berechnet werden. Für den Brechungsindex der Adsorbatlage η kann dabei in vielen Fällen, bei denen der Adsorptionsprozess nicht mit wesentlichen Konformations- und somit Dichteänderungen verbunden ist, derer für den puren, kondensierten Zustand der jeweiligen Ad-

sorbatspezies verwendet werden. Dies gilt z.B. für den Adsorptionsprozess vieler Proteine, deren tatsächlich bindender Bereich im Vergleich zum Gesamtmolekül nur einen kleinen Teil ausmacht.

Eine etwas komplexere Methode zur Abschätzung von Brechungsindices stellt die Anwendung der Clausius-Mosotti-Gleichung dar. Für den reinen, kondensierten Zustand lautet sie:

$$(\eta_j^2 - 1)/(\eta_j^2 + 2) = N_{j,0} A_j / (3\epsilon_0) \quad (31)$$

$N_{j,0}$ entspricht hierbei der Teilchendichte und A_j der frequenzabhängigen Polarisierbarkeit des Moleküls.

Angewandt auf eine Lösung zweier Komponenten j und k führt sie zur Lorentz-Lorentz-Gleichung, mit deren Hilfe ein effektiver Brechungsindex für die binäre Mischung η_{sol} berechnet werden kann.

$$(\eta_{sol}^2 - 1)/(\eta_{sol}^2 + 2) = f_j [(\eta_j^2 - 1)/(\eta_j^2 + 2)] + f_k [(\eta_k^2 - 1)/(\eta_k^2 + 2)] \quad (32)$$

Hierbei steht f für die Volumenanteile der Komponenten.

Diese sagt eine nahezu lineare Reaktion des effektiven Brechungsindex bei Änderung des Volumenanteils einer der Bestandteile voraus. Zur Berechnung des Brechungsindex komplizierterer Moleküle empfiehlt sich eine Inkrementrechnung auf Basis der für einzelne funktionelle Gruppen angegebenen Literaturwerte.

1.4 Vor- und Nachteile konventioneller SPR-Spektroskopie

Die Vorteile der SPR-Spektroskopie zur Detektion biomolekularer Wechselwirkungen liegen im Vergleich zu anderen Methoden vor allem darin, dass sie eine markierungsfreie Echtzeit-Analyse mit recht hoher Sensitivität ermöglicht. Ein chemisch aufwendiges labeling des betreffenden Analyten ist hier also nicht erforderlich.

Die Sensitivität gängiger, auf SPR-beruhender Chemo- und Biosensoren liegt in einer Größenordnung von etwa $2 \cdot 10^6$ nm/RIU (RIU = refractive index unit), so dass Detektionen im Bereich von 10^{-1} pg/mm² möglich sind [98], [104].

Zudem kann aufgrund der relativ langen Abschwächungslänge (etwa 200 - 300 nm) über einen weiten Bereich von bis zu 200 nm näherungsweise eine lineare Abhängigkeit zwischen Sensorantwort und der Dicke der Adsorbatlage angenommen werden.

Der Echtzeit-Modus der Methode eröffnet weiterhin die Möglichkeit zu kinetischen Messungen auf einer Zeitskala von etwa 10^{-1} bis 10^3 Sekunden.

SPR-Spektroskopie kann außerdem in verschiedenen Betriebsmodi durchgeführt werden; so kann entweder die Änderung des Resonanzwinkels oder der -wellenlänge registriert werden.

Ihre laterale Auflösung liegt in einer Größenordnung von etwa 10 μm (= freie Ausbreitungslänge der Plasmonen) und erlaubt somit eine Miniaturisierung dieser Technik [104], [105], [106]. Wird die SPR-Spektroskopie im Array-Format durchgeführt, so bezeichnet man sie auch als SPR-Imaging, da die Auswertung des Bindungsmusters in diesen Anwendungen in der Form eines farbigen Bildes erfolgt [107].

Ein weiterer Pluspunkt ist zudem der leichte Zugang zu dieser Technologie, da SPR-Sensoren in großem Umfang kommerziell zur Verfügung stehen.

Nachteile betreffen jedoch vor allem die instrumentellen Kosten, welche zwischen etwa 115 bis 230 tausend Euro liegen.

Die Art ihrer Detektion ist darüber hinaus für eine Anwendung im Hochdurchsatz-Verfahren mit höherem technischen Aufwand verbunden, so dass Applikationen zur Wirkstoffsuche in miniaturisierten Array-Ansätzen (Bio-Chips) bislang eher die Seltenheit sind [107], [95].

Die einerseits vorteilhafte, hohe Sensitivität gegenüber Änderungen des Brechungsindex erfordert zudem ein Arbeiten bei definierter Temperatur (n ist temperaturabhängig); SPR-Sensoren benötigen daher integrierte Vorrichtungen zur Temperaturkontrolle [104], [105], [106].

2 Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz (LSPR)

Kolloidale Goldnanopartikel sind seit über 1000 Jahren bekannt. Neben Anwendungen in der antiken und mittelalterlichen Medizin wurden sie zur Rotfärbung von Kirchenfenstern und Weinpokalen verwendet [108], [109].

Später waren ihre optischen Eigenschaften Thema der Untersuchungen bekannter Physiker wie etwa Faraday. Das auffälligste Merkmal einer kolloidalen Gold-Lösung ist dabei ihre leuchtend rote Farbe, währenddessen massives Gold einen typisch metallisch gelben Glanz zeigt. Ursache dieser Färbung ist, dass die metallischen Nanopartikel im Gegensatz zum reinen Metall eine starke Absorptionsbande im UV/Vis-Bereich besitzen. Diese tritt auf, wenn



Abb. II.II.2-1: *Lycurgus-Becher* (Glas; Britisches Museum; 4. Jhd. v. Chr.). Rechts: von Außen beleuchtet erscheint der Becher grün. Links: von Innen bestrahlt leuchtet er jedoch rot.

die eingestrahlte Photonenfrequenz geeignet ist, um eine kollektive Oszillation der Leitungsbandelektronen anzuregen und wird als lokale Oberflächenplasmonen-Resonanz (Localized Surface Plasmon Resonance; LSPR) bezeichnet. Die Lage dieser LSP-Resonanz hängt sowohl von der Partikelgröße und -gestalt als auch vom Brechungsindex des umgebenden Mediums ab. Die folgenden theoretischen Betrachtungen sind, sofern keine anderen Angaben erfolgen [95], [108], [110], [111], [112] entnommen.

2.1 Partikelplasmonen (Lokalisierte Oberflächenplasmonen)

Trifft eine elektromagnetische Welle auf ein metallisches Nanopartikel, so werden im Resonanzfall die freien Leitungsbandelektronen des Metalls relativ zu den ortsfesten, positiv geladenen Atomrümpfen kollektiv ausgelenkt. Die Coulomb-Anziehung zwischen den entgegengesetzten Ladungen bildet eine Rückstellkraft und ruft auf diese Weise eine mit der Frequenz des anregenden Lichtes getriebene harmonische Oszillation der Elektronen vor. Das der kollektiven Schwingung zugeordnete Quasi-Teilchen wird als Partikelplasmon bezeichnet; in der Literatur ist jedoch auch der

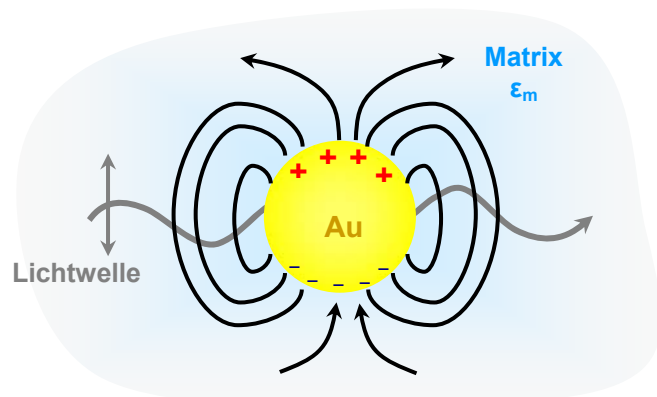


Abb. II.II.2-2: Anregung von lokalisierten Oberflächenplasmonen bei Lichteinstrahlung in einem kolloidalen Goldpartikel; nach [32].

Ausdruck „Lokalisiertes Oberflächenplasmonen“ gebräuchlich.

Verbunden mit dieser Dipolschwingung ist wiederum ein elektromagnetisches Feld, das als Streulicht beobachtet werden kann. Ein Teil der anregenden Energie wird somit durch einen strahlenden Zerfall dissipiert. Die Intensität dieses Streulichts hängt von der natürlichen Frequenz des Oszillators ab; LSPR kann daher sowohl im Absorptions- als auch im Streulicht-Modus detektiert werden.

Neben dem strahlenden Abbau gibt es jedoch noch weitere nicht-strahlende Dämpfungsmechanismen, die zum Zerfall des Partikelplasmons führen. Zu nennen sind hierunter vor allem Intra- und Interband² Elektron-Loch-Paar Anregungen, sowie eine Streuung der Elektronen untereinander, mit Verunreinigungen, mit Phononen und der Partikeloberfläche [110]. Letzterer Prozess fällt erst ins Gewicht, wenn der Durchmesser des Nanopartikels deutlich kleiner ist als die mittlere freie Weglänge der Elektronen im Metall l_{∞} ($l_{\infty} = v_F / \tau_{\infty}$; v_F = Fermi-Geschwindigkeit, τ = Relaxationszeit). Für Gold beträgt die Fermi-Geschwindigkeit $v_F = 1,4 \text{ nm/fs}$ und die mittlere Relaxationszeit $\tau = 29 \text{ fs}$; daraus ergibt sich eine mittlere freie Weglänge von 41 nm. Für Nanopartikel mit Durchmessern über 20 nm ist dieser Effekt daher noch vernachlässigbar. Andernfalls bewirkt er einen zusätzlichen Dämpfungsbeitrag, der eine $1/r$ -Abhängigkeit zeigt und daher mit abnehmendem Partikel-Radius kontinuierlich zunimmt.

Die Lage der Resonanzposition der LSPR hängt auf der einen Seite von der geometrischen Form, Größe und dem Material des betreffenden Nanopartikels ab, andererseits übt jedoch auch die Polarisierbarkeit (bzw. die dielektrischen Eigenschaften) des umgebenden Mediums einen Einfluss auf die Rückstellkraft der Oszillation aus.

Letztere Eigenschaft stellt die Basis zur ihrer Verwendung in sensorischen Anwendungen und als Markierungsmittel dar, da Änderungen in ihrer unmittelbaren Umgebung in ein optisches Signal umgewandelt werden können (bzw. sich in einer Änderung ihrer Absorptions- und Streulichtspektren äußern).

2.2 Optische Eigenschaften von massivem Gold

Die dielektrische Funktion eines Metalls ist eine komplexe Größe, deren Realteil $\epsilon_{\text{Re}} = \text{Re}(\epsilon(\omega))$ die Polarisierung aufgrund eines externen Feldes beschreibt und deren Imaginärteil $\epsilon_{\text{Im}} = \text{Im}(\epsilon(\omega))$ die Absorption und Phase der Antwort bezüglich des externen Feldes ausdrückt; alle intrinsischen Dämpfungsmechanismen sind daher ebenfalls in ϵ_{Im} enthalten.

$$\epsilon = \epsilon_{\text{Re}} + i \cdot \epsilon_{\text{Im}} \quad (33)$$

² Gold besitzt im Sichtbaren Interbandübergänge bei Energien von $\approx 1,8 \text{ eV}$ und $\approx 2,4 \text{ eV}$.

Liegt die Frequenz des anregenden elektrischen Feldes im optischen Bereich, so wird die dielektrische Funktion von Edelmetallen üblicherweise über die elektrische Suszeptibilität ausgedrückt:

$$\varepsilon(\omega) = 1 + \chi_D(\omega) + \chi_B(\omega) \quad (34)$$

Hierbei steht χ_D für den komplexen Beitrag der quasi-freien Leitungsband-Elektronen; χ_B beschreibt den komplexen Anteil der gebundenen Rumpfelektronen in energetisch tiefer liegenden Bändern des Metalls.

Im sichtbaren Bereich hängt der die Polarisierbarkeit aller Rumpfelektronen beschreibende Realteil von χ_B ($\chi_{B,Re}$) nur im geringen Umfang von der Frequenz ab und kann daher als näherungsweise konstant angenommen werden. Ersetzt man in der Gleichung (34) daher $(1 + \chi_{B,Re}) = \text{const} = \varepsilon_\infty$, so folgt:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \chi_D(\omega) + i \cdot \chi_{B,Im}(\omega) \quad (35)$$

2.2.1 Drude-Sommerfeld Modell

Das Drude-Sommerfeld Modell stellt eine Näherung zur Beschreibung der dielektrischen Funktion $\varepsilon(\omega)$ der Metalle dar. Es berücksichtigt nur die freien Leitungsbandelektronen; der auf die Rumpfelektronen zurückzuführende Beitrag wird außer Acht gelassen, da er nur im Bereich höherer Anregungsfrequenzen von Bedeutung ist.

Der Einfluss eines externen elektromagnetischen Feldes $\vec{E} = \vec{E}_0 \cdot \exp(-i\omega t)$ auf die Bewegung der Elektronen wird in diesem Modell durch Lösen der Bewegungsgleichung

$$m_e \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial t^2} + m_e \Gamma \frac{\partial \vec{r}}{\partial t} = q \vec{E}_0 e^{-i\omega t} \quad (36)$$

(m_e = Elektronenmasse, r = Auslenkung aus der Ruhelage, Γ = Dämpfungskonstante) ermittelt. Als Ergebnis erhält man die durch das Feld verursachte Auslenkungsamplitude \vec{r}_0 der freien Elektronen aus ihrer Ruhelage; über diese kann wiederum das pro Elektron induzierte Dipolmoment $\vec{p} = e \cdot \vec{r}_0$ und durch Multiplikation mit der Elektronendichte n die makroskopische Polarisation P und somit auch die Frequenzabhängigkeit der auf die Leitungsbandelektronen zurückzuführenden elektrischen Suszeptibilität des Metalls $\chi_D(\omega) = P/(\varepsilon_0 E)$ berechnet werden. Für die dielektrische Funktion des Elektronengases ε_D folgt somit:

$$\varepsilon_D(\omega) = 1 + \chi_D(\omega) = 1 - \frac{\omega_P^2}{\omega^2 + i\Gamma_\infty \omega} \quad (37)$$

Hierbei bezeichnet ω_p die Plasmafrequenz und Γ_∞ die Dämpfungskonstante der erzwungenen Schwingung:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{\epsilon_0 m_e}} \quad \Gamma_\infty = \frac{v_F}{l_\infty} \quad (38)$$

(e = Elementarladung; ϵ_0 = Dielektrizitätskonstante des Vakuums, m_e = Elektronenmasse; n = Elektronendichte).

Die Dämpfungskonstante wird durch die mittlere freie Weglänge der Elektronen l_∞ und die Fermigeschwindigkeit v_F bestimmt. Zur Dämpfung tragen wie bereits beschrieben mehrere Effekte bei. Sind diese voneinander unabhängig, so können sie einfach aufsummiert werden: $\Gamma_\infty = \sum_i \Gamma_i$; experimentell zugänglich ist Γ_∞ über die Messung des elektrischen Widerstandes.

Setzt man nun die Drude-Suszeptibilität χ_D in die allgemeine dielektrische Funktion (35) ein, so ergibt sich unter Vernachlässigung der Intradbanddämpfung (der Term $i \cdot \chi_{B,Im}(\omega)$ entfällt):

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\Gamma_\infty \omega} = \epsilon_\infty - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \Gamma_\infty^2} + i \frac{\omega_p^2 \Gamma_\infty}{\omega(\omega^2 + \Gamma_\infty^2)} \quad (39)$$

Da nach der Maxwell-Beziehung für den Brechungsindex einer nichtmagnetischen Substanz gilt

$$\tilde{\eta} = \sqrt{\epsilon(\omega)} \quad (40)$$

ist demnach auch der Brechungsindex eine komplexe Größe und kann in Real- und Imaginärteil aufgespalten werden:

$$\tilde{\eta}(\omega) = \eta(\omega) + i\kappa(\omega) \quad (41)$$

Diese Teilfunktionen können aufgrund der Maxwell-Beziehung über die dielektrische Funktion dargestellt werden [113]:

$$\eta(\omega) = \sqrt{\frac{\epsilon_{Re}(\omega)}{2} + \frac{\sqrt{\epsilon_{Re}(\omega)^2 + \epsilon_{Im}(\omega)^2}}{2}} \quad (42)$$

$$\kappa(\omega) = \sqrt{-\frac{\epsilon_{Re}(\omega)}{2} + \frac{\sqrt{\epsilon_{Re}(\omega)^2 + \epsilon_{Im}(\omega)^2}}{2}} \quad (43)$$

η ist der (normale) Brechungsindex, κ der sog. Absorptionskoeffizient, welcher mit dem Ex-tinktionskoeffizienten des Lambert-Beer'schen Gesetzes γ in Beziehung steht (s. Gleichung (46)).

2.3 Optische Eigenschaften kolloidaler Goldpartikel

2.3.1 Grundlagen

Zur Beschreibung der optischen Eigenschaften kolloidaler Goldpartikel kann die in Abschnitt 2.2.1 hergeleitete dielektrische Funktion (39) ebenfalls angewandt werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass eine Intrabanddämpfung in dieser Gleichung nicht berücksichtigt wird; diese ist jedoch nur bei höheren Anregungsenergien von Bedeutung und kann im sichtbaren Bereich vernachlässigt werden.

Für sphärische Gold-Nanopartikel wie auch für andere Partikel, deren Durchmesser in der Größenordnung der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts liegt, setzt sich die Extinktion bei einer gegebenen Wellenlänge aus den Beiträgen von Absorption und Streuung am Partikel zusammen. Der Extinktionsquerschnitt σ_{Ext} ergibt sich somit zu

$$\sigma_{Ext} = \sigma_{Abs} + \sigma_{str} \quad (44)$$

und kann über eine Bestimmung des Extinktionswertes E nach dem Lambert Beer'schen Gesetz experimentell bestimmt werden.

$$\sigma_{Ext} = \frac{1}{N \cdot D} \ln\left(\frac{I_0}{I}\right) = \frac{1}{N \cdot D} \cdot E \quad (45)$$

Hierbei steht D für die vom Lichtstrahl durchlaufene Strecke; N entspricht der Volumendichte an Streu- und Absorptionszentren.

Für den Extinktionskoeffizienten $\gamma(\lambda)$ gilt weiterhin

$$\gamma(\lambda) = N \cdot \sigma_{Ext} = \frac{4\pi\kappa(\lambda)}{\lambda}, \quad (46)$$

2.3.2 Mie-Theorie

Gustav Mie war von 1902-1917 Professor in Greifswald; in dieser Zeit veröffentlichte er eine wesentliche Arbeit zur Lichtstreuung (Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen; Annalen der Physik, Vierte Folge, Band 25, 1908, No. 3, S. 377-445), die bislang über 2600mal in der wissenschaftlichen Literatur zitiert wurde [114].

Die auf Mie zurückgehende Theorie bezieht sich auf die Absorption und Streuung an einem einzelnen kugelförmigen Metallteilchen; mit ihrer Hilfe lassen sich sowohl die Streu- und Absorptionsquerschnitte, als auch die Verteilung des elektromagnetischen Feldes innerhalb und außerhalb eines sphärischen Partikels exakt berechnen.

Um die Extinktion eines einzelnen Metallkolloids zu berechnen, löste Mie die in sphärische Koordinaten transformierten Maxwell-Gleichungen für eine aus dem Unendlichen kommende und auf das Partikel treffende monochromatische ebene Welle.

Die elektromagnetischen Felder innerhalb und außerhalb des Partikels werden in Kugelflächenfunktionen, d.h. nach Multipolen entwickelt. Dabei treten vier Entwicklungskoeffizienten a_L , b_L , c_L und d_L auf, wobei der Index L die Ordnung der sphärisch harmonischen Multipol-schwingungen im Teilchen nummeriert (Multipolordnung). Die Koeffizienten lassen sich durch Randbedingungen, die die Stetigkeit der tangentialen Feldkomponenten von E und H an der Partikeloberfläche fordern, berechnen. Im Folgenden werden nur die Koeffizienten für das Feld außerhalb des Partikels, a_L und b_L , betrachtet; diese geben den Beitrag der L-ten elektrischen (a_L) bzw. magnetischen Multipol-schwingung (b_L) an [110].

$$a_L = \frac{m\psi_L(mx)\psi'_L(x) - \psi_L(x)\psi'_L(mx)}{m\psi_L(mx)\xi'_L(x) - \zeta_L(x)\psi'_L(mx)} \quad (47)$$

$$b_L = \frac{\psi_L(mx)\psi'_L(x) - m\psi_L(x)\psi'_L(mx)}{\psi_L(mx)\xi'_L(x) - m\xi_L(x)\psi'_L(mx)} \quad (48)$$

Hierbei steht $m = \eta_p/\eta_m$ für das Verhältnis der Brechungsindices von Partikel und dem ihn umgebenden Medium. \vec{k} bezeichnet den Wellenvektor der einfallenden Welle und der Größenparameter $x = |\vec{k}|R = 2\pi R/\lambda$ beschreibt das Verhältnis von Partikelradius R zur Wellenlänge. Die Funktionen $\psi_L(z)$ und $\xi_L(z)$ sind die Ricatti-Bessel-Funktionen; $\psi'_L(z)$ und $\xi'_L(z)$ sind die Ableitungen nach den Argumenten in den Klammern [111].

Für den Extinktions- und Streuquerschnitt erhält man auf diese Weise:

$$\sigma_{Ext}(\lambda) = \frac{\lambda^2}{2\pi\epsilon_m} \sum_{L=1}^{\infty} (-1)^L \text{Im}(a_L - b_L) \quad (49)$$

$$\sigma_{Str}(\lambda) = \frac{\lambda^2}{2\pi\epsilon_m} \sum_{L=1}^{\infty} \frac{|a_L|^2 - |b_L|^2}{2L+1} \quad (50)$$

$$\sigma_{Abs}(\lambda) = \sigma_{Ext}(\lambda) - \sigma_{Str}(\lambda) \quad (51)$$

Die Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums, ϵ_m , wird hierbei als wellenlängenunabhängig angenommen. Die optischen Eigenschaften eines kugelförmigen Metallkolloids werden daher durch seine Größe R und die optischen (bzw. dielektrischen) Eigenschaften des umgebenden Mediums (η_m) bestimmt.

Diese Gleichungen können numerisch gelöst werden und erlauben eine exakte Bestimmung der Querschnitte.

2.3.2.1 Quasistatische Näherung (Rayleigh-Näherung)

Im Folgenden wird die quasistatische oder Rayleigh-Näherung vorgestellt, mit der die optischen Spektren von Nanopartikeln bis zu einem Durchmesser von etwa 50 nm auch ohne Zuhilfenahme von Rechnerleistung noch gut beschrieben werden können. Ausgangspunkt dieser Näherung ist die Annahme, dass der Partikelradius sehr viel kleiner ist als die Wellenlänge des Lichtes. Entsprechend ist die Amplitude und Phase des elektrischen Feldes räumlich über das gesamte Nanopartikel hinweg konstant – also statisch.

In diesem Fall ($R \ll \lambda$) folgt für die Koeffizienten a_L und b_L [108]:

$$a_L = (-1)^L \frac{L+1}{L} \frac{\alpha_R^{2L+1}}{[(2L-1)!]^2} \frac{\varepsilon_p(\lambda) - \varepsilon_m}{\varepsilon_p(\lambda) + \frac{L+1}{L} \varepsilon_m} \quad (52)$$

$$b_L = (-1)^L \frac{\alpha_R^{2L+3}}{[(2L+1)!]^2} \frac{\varepsilon_p(\lambda) - \varepsilon_m}{\varepsilon_m (2L+3)(2L+1)} \quad (53)$$

$$\alpha_R = 2\pi \frac{R}{\lambda} \sqrt{\varepsilon_m} \quad (54)$$

(ε_p = Dielektrizitätskonstante des Partikels, ε_m = Dielektrizitätskonstante des Mediums, R = Radius des Partikels).

Für den Fall $\alpha_R \ll 1$, d.h. in der Regel für Teilchen, deren Radien sehr viel größer sind als die Wellenlänge des Lichts, wird die Extinktion durch den elektrischen Streukoeffizienten a_L der dipolaren Partialwelle dominiert. Die Streuung von Lichtwellen an den Kolloiden sowie die in den Kolloiden angeregten magnetischen Moden können vernachlässigt werden $\sigma_{Str}(\lambda) \approx 0$. In diesem Fall gilt für den Extinktionsquerschnitt der dipolaren Absorption [108], [112]:

$$\sigma_{Ext}^{DIP}(\lambda) = \frac{24\pi^2 R^3}{\lambda} \frac{\varepsilon_m^{3/2} \varepsilon_{p,lm}(\lambda)}{(\varepsilon_{p,Re}(\lambda) + 2\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_{p,lm}(\lambda)^2} \quad (55)$$

Die optischen Eigenschaften eines kugelförmigen Metallkolloids können daher über seine Größe R und mit Hilfe der optischen (bzw. dielektrischen) Eigenschaften des umgebenden Mediums ε_m berechnet werden. Die Gleichung (55) erlaubt eine Simulation der Extinktionsspektren kolloidaler Goldlösungen (für den quasistatischen Grenzfall; gültig für Partikel mit Radien bis zu etwa 50 nm), die mit den experimentell Gemessenen verglichen werden können. Die Lage der Resonanzfrequenz ω_{Res} im quasistatischen Fall kann ebenfalls anhand

der Gleichung (55) berechnet werden; Resonanzverhalten tritt ein, wenn der Nenner in Gleichung (55) minimal und die beobachtete Absorption somit maximal wird.

$$\left(\varepsilon_{p,\text{Re}}(\omega) + 2\varepsilon_m\right)^2 + \varepsilon_{p,\text{Im}}(\omega)^2 = \min \quad (56)$$

Falls der Imaginärteil der dielektrischen Funktion $\varepsilon_{p,\text{Im}}$ klein oder die Frequenzabhängigkeit $\partial\varepsilon_{p,\text{Im}}/\partial\omega$ (Berechnung der Extrema nach Gleichung (56)) gering ist, so kann der 2. Term in Gleichung (56) vernachlässigt werden; der Resonanzfall entspricht dann der Bedingung:

$$\varepsilon_{p,\text{Re}}(\omega_{\text{Res}}) = -2\varepsilon_m \quad (57)$$

Eine Resonanz tritt daher nur für Materialien mit negativem Realteil $\varepsilon_{p,\text{Re}}$ in der dielektrischen Funktion auf.

Mit Hilfe des Realteils der dielektrischen Funktion aus Gleichung (39) ($\varepsilon_{p,\text{Re}}$) erhält man unter der Voraussetzung $\omega \gg \Gamma_\infty$ die Resonanzfrequenz für den quasistatischen Fall:

$$\omega_{\text{Res}} = \frac{\omega_p}{\sqrt{\varepsilon_\infty + 2\varepsilon_m}} \quad (58)$$

Für Gold-Nanopartikel mit einem Durchmesser von 40 nm erhält man in einer wässrigen Umgebung ($\varepsilon_m = 1,77$) beispielsweise eine Resonanzwellenlänge von 498 nm (2,49 eV).

2.3.2.2 Einfluss der Nanopartikelkonzentration in flüssiger Phase

Die Mie-Theorie gilt nur für ein einzelnes Nanopartikel bzw. für Proben, in denen der Abstand zwischen den Partikeln so groß ist, dass Wechselwirkungen zwischen ihnen vernachlässigt werden können. Bei höheren Nanopartikelkonzentrationen werden die dielektrischen Eigenschaften der Matrix ε_m jedoch auch durch die umgebenden Partikel bestimmt.

Um reale Proben beschreiben zu können, wird ein Maß für die Konzentration, der so genannte Füllfaktor eingeführt:

$$f = V_0 N = \frac{4}{3} \pi R^3 N \quad (59)$$

Bei einer Volumendichte N der Teilchen im Medium, wobei jedes von ihnen ein Volumen V_0 einnimmt, gibt der Füllfaktor f das Volumenverhältnis der Partikel zum Gesamtvolumen an.

Bei zunehmender Konzentration wird der mittlere Abstand der Kolloide immer kleiner und die elektrischen Wechselwirkungen der Teilchen untereinander können nicht mehr vernachlässigt werden.

Die Umgebung eines Kolloids wird zur mathematischen Behandlung in zwei verschiedene Bereiche unterteilt. Die Wechselwirkungen nahe benachbarter Kolloide mit dem betrachteten Kolloid müssen detailliert behandelt werden (d.h. Streufelder und räumliche Verteilung). Der Einfluss weiter entfernter Kolloide wird durch eine Polarisationsladung an einer fiktiven Kugel um das betrachtete Kolloid, der sog. Lorentz-Kugel, ersetzt [110], [113]. Der Radius dieser Kugel wird dabei so groß gewählt, dass die Umgebung außerhalb der Kugel als homogen (für das gewählte Kolloid) betrachtet werden kann. Dies erlaubt die Einführung eines effektiven Feldes, in welcher das aus Partikeln und Lösung bestehende Mischmedium (Bereich innerhalb bzw. außerhalb der Lorentzkugel) als quasikontinuierlich mit einer effektiven dielektrischen Funktion $\epsilon_{\text{Sol,eff}}(\lambda)$ betrachtet werden kann.

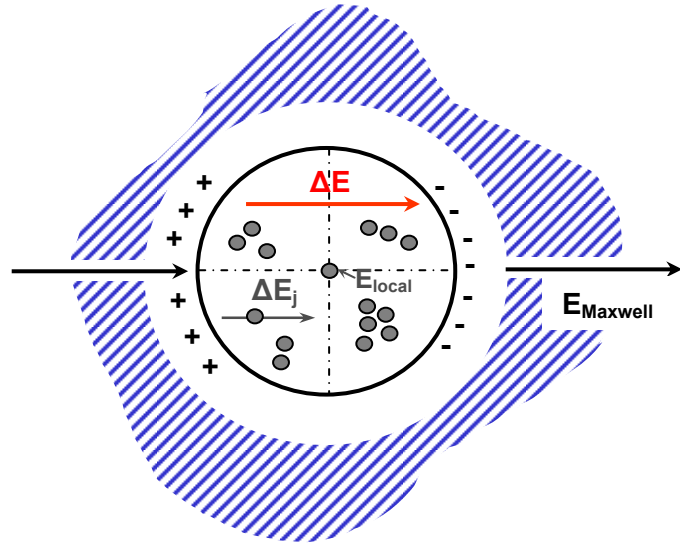


Abb. II.II.2-3:

Schematische Darstellung der Lorentzkugel zur Einführung eines effektiven elektrischen Feldes ΔE bestehend aus Partikeln und umgebender Lösung, nach [110].

Für kleine Füllfaktoren ($f < 10^{-3}$) können die elektrischen Wechselwirkungen der Kolloide untereinander vernachlässigt werden; der kollektive Effekt der Probe entspricht dann dem N-fachen Effekt eines einzelnen Teilchens. Für diesen Grenzfall kann das Ergebnis der Mie-Theorie (Gleichung (55); quasistatischer Grenzfall) verwendet werden. Für den Extinktionskoeffizienten γ der Partikellösung ergibt sich in diesem Fall:

$$\gamma(\lambda) = N\sigma_{\text{ext}}^{\text{dip}}(\lambda) = \frac{18\pi}{\lambda} f \frac{\epsilon_m^{3/2} \epsilon_{\text{Im}}(\lambda)}{(\epsilon_{\text{Re}}(\lambda) + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon_{\text{Im}}(\lambda)^2} \quad (60)$$

Für größere Füllfaktoren wird zwar angenommen, dass sich keine anderen Kolloide innerhalb der Lorentzkugel befinden bzw. sich die Wechselwirkungen aufgrund der statistischen Anordnung gegenseitig aufheben, jedoch wird der Beitrag der Kolloide außerhalb der Lorentzkugel in die Betrachtung mit einbezogen. Unter der Voraussetzung kugelförmiger Teilchen erhielten Maxwell und Garnett einen Ausdruck für die dielektrische Funktion der Partikellösung $\epsilon_{\text{Sol,eff}}(\lambda)$:

$$\frac{\epsilon_{\text{Sol,eff}}(\lambda) - \epsilon_m}{\epsilon_{\text{Sol,eff}}(\lambda) + 2\epsilon_m} = f \frac{\epsilon_p(\lambda) - \epsilon_m}{\epsilon_p(\lambda) + 2\epsilon_m} \quad (61)$$

Über die Einführung einer normalisierten Teilchenpolarisierbarkeit $\Lambda_{MG}(\lambda)$:

$$\Lambda_{MG}(\lambda) = \frac{\varepsilon_p(\lambda) - \varepsilon_m}{\varepsilon_p(\lambda) + 2\varepsilon_m} \quad (62)$$

erhält man aus der obigen Gleichung die effektive Dielektrizitätsfunktion der Partikellösung:

$$\varepsilon_{Sol,eff}(\lambda) = \varepsilon_m \frac{1 + 2f\Lambda_{MG}(\lambda)}{1 - f\Lambda_{MG}(\lambda)} \quad (63)$$

Diese Gleichung erlaubt die Bestimmung der optischen Eigenschaften bei höheren Füllfaktoren.

Auf Basis der nach Gleichung (63) bestimmten effektiven dielektrischen Funktion $\varepsilon_{Sol,eff}(\lambda)$ kann über die Maxwell-Beziehung (40) der Absorptionskoeffizient $\kappa(\lambda)$ nach (41) und somit nach Gleichung (46) auch der Extinktionskoeffizient der Partikellösung $\gamma(\lambda)$ berechnet und mit dem experimentell Gemessenen verglichen werden.

Auf diese Weise simulierte Spektren zeigen bei großen Füllfaktoren ($f > 10^{-3}$) eine gute Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Maxima-Positionen; bezüglich der Halbwertsbreite der Absorptionsbanden treten jedoch Abweichungen auf. Diese beruht hauptsächlich auf einer inhomogenen Linienverbreiterung, die auf unterschiedliche Partikelgrößen (Polydispersität) und -formen (Abweichungen von der Kugelform) zurückgeführt werden kann.

2.3.2.3 Resonanzverschiebung durch molekulare Bindungsereignisse

Die Gleichung (58) zeigt, dass die Lage der LSP-Resonanz metallischer Nanopartikel empfindlich vom umgebenden Brechungsindex abhängt; diese Eigenschaft stellt (analog zur konventionellen SPR) die Grundlage zu ihrer Verwendung in sensorischen Anwendungen, insbesondere zur Detektion von Bindungsereignissen dar: Die Funktionalisierung (kovalent, adsorptiv) der Partikeloberfläche führt zu einer lokalen Änderung des Brechungsindex um den Partikel und äußert sich daher in einer Verschiebung der Plasmonenresonanz.

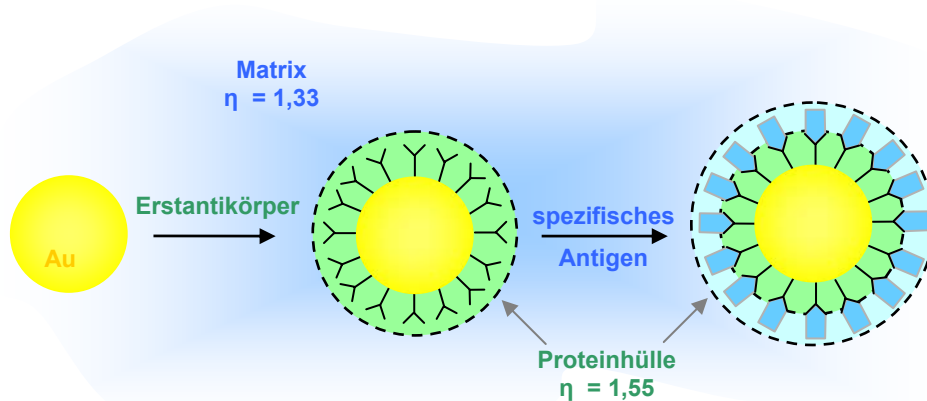


Abb. II.II.2-4: Schematische Darstellung der Funktionalisierung von Goldnanopartikeln (links) mit Proteinen in Lösung unter Ausbildung von Schalenstrukturen. Bindung des Erstantikörpers (mitte) und Umsetzung mit dem spezifischen Antigen (rechts); nach [32].

In immunodiagnostischen Anwendungen können z.B. mit Rezeptormolekülen funktionalisierte Partikel zur gezielten Detektion des spezifischen Liganden genutzt werden, da dessen Bindung mit einer Änderung des lokalen Brechungsindex und somit einer Resonanzverschiebung verbunden ist.

Erweiterung der Mie-Theorie auf Schalenpartikel

Durch eine Erweiterung der Mie-Theorie auf Schalenpartikel (s. Abschnitt 2.4.1) ist es außerdem möglich, die optische Reaktion in Bezug auf der Partikeloberfläche stattfindender Bindungsereignisse mit ihrer Hilfe theoretisch vorherzusagen [32], [115], [116].

Der Anwendung dieser theoretischen Erweiterung liegt die Voraussetzung zugrunde, dass der Bindungsprozess mit einer nahezu vollständigen und homogenen Funktionalisierung des Partikels verbunden ist, so dass auf diese Weise eine Schalenstruktur um den Partikel herum resultiert.

In [32] wurde der Einfluss einer kontinuierlich ansteigenden Proteinhülle ($\eta_{\text{pro}} = 1,55$) auf die Resonanzverschiebung von Goldnanopartikeln mit einem Durchmesser von 40 nm in wässriger Lösung ($\eta_{\text{H}_2\text{O}} = 1,33$) mit diesem Modell simuliert. Mit zunehmendem Abstand von der Partikeloberfläche ergab sich eine kontinuierliche Abnahme der optischen Sensitivität (bzw. der Resonanzverschiebung) gegenüber stattfindenden Bindungsereignissen; diese zeigt infolge der exponentiellen Feldstärkenabnahme des mit der Plasmenschwingung verbundenen elektromagnetischen Nahfeldes ebenfalls einen näherungsweise exponentiell abnehmenden Verlauf. In der angegebenen Referenz konnte die erhaltene Kurve für Proteinschichtdicken bis hin zu $d \approx 15$ nm mit hinreichender Genauigkeit daher durch eine Funktion der Form

$$R = a(1 - e^{-d/l_d}) \quad (64)$$

angepasst werden ($a = 55$ meV; $l_d = 9,4$ nm); der Parameter a gibt hierbei die Resonanzverschiebung im Limit großer Schalendicken ($d \rightarrow \infty$) an. Die Funktion (64) ist der Gleichung (22) $\Delta\lambda_{\text{max}} = m\Delta\eta(1 - e^{-2d/l})$ sehr ähnlich, die in Abschnitt 1.3.2 zur vereinfachten Beschreibung der Resonanzverschiebung propagierender Oberflächenplasmonen (SPR) hergeleitet wurde [117]. Unter bestimmten Bedingungen kann daher sowohl die Reaktion der LSPR als auch der SPR auf stattfindende Bindungsereignisse auf sehr ähnliche Weise interpretiert werden [118], [119], [120].

Hierbei ist jedoch zu beachten, dass sich die Abschwächungslängen l_d in beiden Fällen (LSPR, SPR) erheblich unterscheiden. Im propagierenden Fall beträgt dieser Wert etwa 100-200 nm [98] und liegt um einen Faktor 10-20 höher als die für lokalisierte Oberflächenplasmonen ermittelten Werte

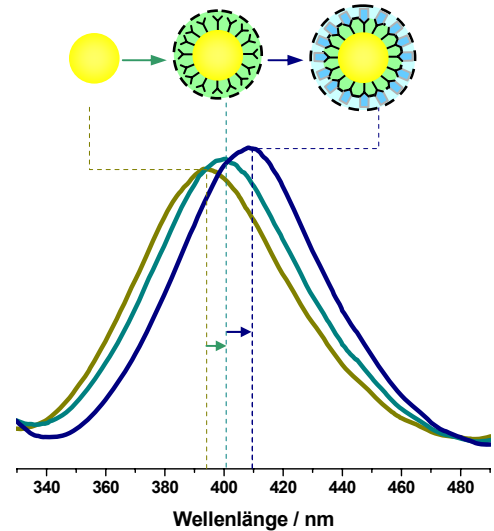


Abb. II.II.2-5: Resonanzverschiebung der LSPR bei Zunahme der den Goldnanopartikel umgebenden Proteinhülle.

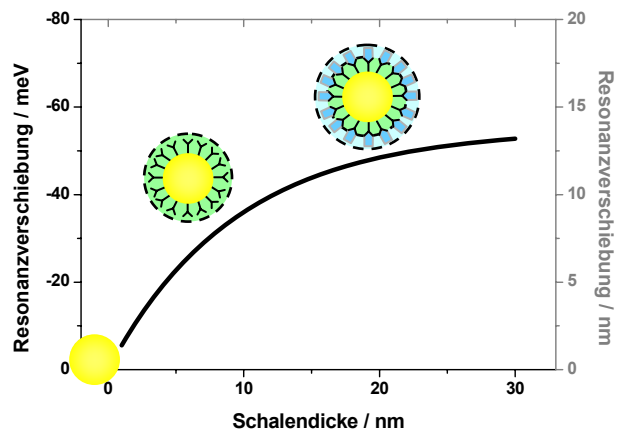


Abb. II.II.2-6 Mie-theoretisch ermittelter Zusammenhang zwischen der LSP-Resonanzverschiebung und der Dicke der den Goldpartikel umgebenden Proteinschale; nach [32].

[32], [121]; mit Hilfe der Mie-Theorie wurde z.B. für die 40nm-Goldpartikel in [32] ein Wert von 9,4 nm erhalten. Die unterschiedlichen Abschwächungslängen sind hinsichtlich einer sensorischen Anwendung mit bestimmten Vor- und Nachteilen verbunden (s. Abs. 3).

Die Sensitivität der LSPR ist infolge der geringen Eindringtiefe des zur Detektion genutzten evaneszenten Feldes auf die allernächste Nanoumgebung der Partikel beschränkt. Dieser eingeschränkte Sensitivitätsbereich grenzt allerdings unter Umständen ihren Einsatz in immunodiagnostischen Anwendungen ein. Die in diesen zur Detektion biomolekularer Wechselwirkungen eingesetzten Biomoleküle führen zu einer Ausbildung von Sandwich-Strukturen, deren Dimensionen in vielen Fällen in der Größenordnung der Abschwächungslänge des evaneszenten Feldes liegen und lokale Schichtdickenmaxima von bis zu 20 nm aufweisen (lineare Ausdehnung der Antikörper ~ 10 nm; bei globulärer Struktur ~ 7 nm [122], [123]); innerhalb dieses Abstandes (20 nm) von der Oberfläche ist im Fall einer Abschwächungslänge von nur 10 nm die exponentiell genäherte Sensorantwort (Gleichung (64)) gegenüber einer linearen Reaktion zur Schichtdicke bereits um etwa 57% vermindert (s. Abbildung II.II.2-7).

Dagegen bewirkt die relativ hohe Abschwächungslänge l_d der SPR, dass zwischen Sensorantwort und der Schichtdicke der adsorbierten Lagen über einen weiten Abstandsbereich ein näherungsweise linearer Zusammenhang zwischen Sensorantwort und der Dicke adsorbierter Schichten angenommen werden kann [98]. In der Abbildung II.II.2-8 ist die nach Gleichung (22) (exponentieller Verlauf) genäherte Sensorantwort sowie ihre lineare Näherung (Gleichung (23)) unter der Annahme einer für SPR charakteristischen Abschwächungslänge von 300 nm in Abhängigkeit von der Schichtdicke der Adsorbatlagen aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass selbst bei einer Schichtdicke von 25 nm beide Näherungen nahezu iden-

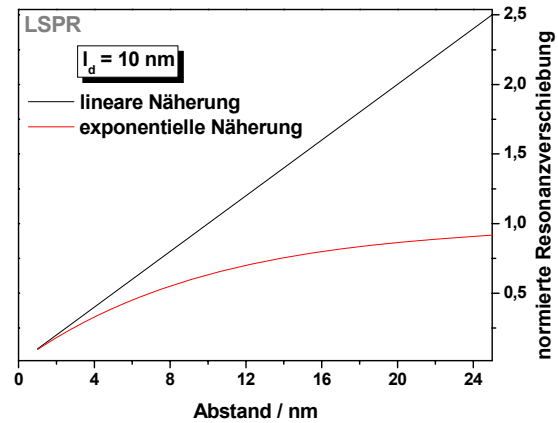


Abb. II.II.2-7: Exponentiell und linear genäherte Sensorantwort bei der LSPR; Abschwächungslänge 10 nm.

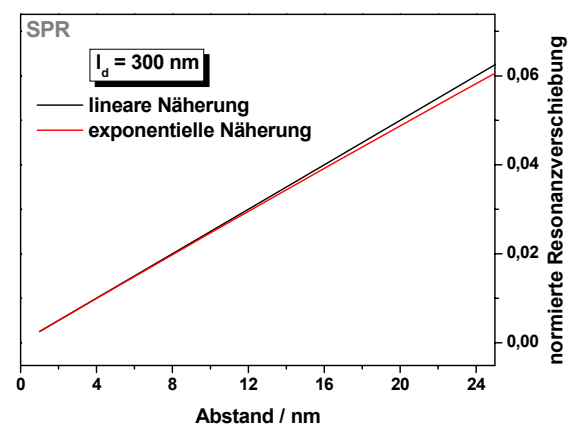


Abb. II.II.2-8: Exponentiell und linear genäherte Sensorantwort bei der SPR; Abschwächungslänge 300 nm.

tische Resonanzverschiebungen ergeben; die Abweichung liegt in diesem Fall bei nur etwa 3,3%.

Nachteilig an einer so hohen Eindringtiefe ist jedoch, dass die Methode ebenfalls auch empfindlich auf Änderungen des Brechungsindex in der umgebenden Lösung reagiert. Diese Eigenschaft schränkt wiederum die Aussagekraft der in immunodiagnostischen Anwendungen erhaltenen Ergebnisse ein. Da z.B. der Brechungsindex von Blutplasma von Patient zu Patient variiert und außerdem auch von der Temperatur abhängt, führen diese Rahmenbedingungen zu einer Beeinflussung der Sensorantwort; falsche Positivtests können daher nur durch eine aufwendige Kalibrierung des SPR-Geräts und durch Referenzmessungen ausgeschlossen werden; die Handhabung einer Vielzahl von Proben in klinischen Studien ist daher mit hohem Mess- und Zeitaufwand verbunden.

2.3.3 Einfluß von Partikelgröße und –form auf die LSPR-Antwort

Mit Hilfe der Mie-Theorie wurde z.B. vorausgesagt [32], dass einer Zunahme des Partikeldurchmessers von 40 auf 170 nm eine kontinuierliche Zunahme der durch Bindungsereignisse (Zunahme einer Proteinschicht von 3 auf 10 nm) hervorgerufenen Resonanzverschiebung einhergehen sollte; nach den in [32] durchgeführten Rechnungen steigt die Sensitivität der Methode in diesem Bereich auf etwa doppelte so hohe Werte an. Allerdings ist mit der Zunahme des Durchmessers auch ein beträchtlicher Anstieg der homogenen Linienbreite verbunden, die wiederum eine exakte Bestimmung der Maxima-Position erschwert.

Angemerkt sei hier, dass eine Änderung des Partikeldurchmessers auch die Resonanzposition beeinflusst; mit zunehmendem Partikelradius wird diese zu höheren Wellenlängen verschoben. Die Streulichtspektren *einzelner* Nanopartikel zeigten in [32] bei einer Zunahme des Durchmessers von 40 auf 150 nm eine Verschiebung um etwa 140 nm ins Rote. Diese ist allerdings aufgrund der zunehmenden Strahlungsdämpfung mit einer erheblichen Zunahme der (*homogenen*) Linienbreite verbunden (in dem genannten Beispiel nimmt sie etwa um den Faktor 3,5 zu). Aber nicht nur der Partikeldurchmesser, sondern auch die geometrische Form der Nanopartikel hat Einfluss auf die Größe der resultierenden Resonanzverschiebung. So zeigen z.B. stäbchenartige Nanopartikel (20 nm x 20 nm x 60 nm) eine etwa doppelt so hohe Resonanzverschiebung wie sphärische ($\varnothing = 40$ nm) [32], [124]. Vorteilhaft an solchen Strukturen ist außerdem eine geringe Linienbreite, die auf eine reduzierte Interband- und Strahlungsdämpfung zurückgeführt werden kann. Letztere resultiert aus dem geringeren Goldvolumen; die verminderte Interbanddämpfung ist darauf zurückzuführen, dass die Resonanzenergie kleiner ist, als für die Anregung des Interbandübergangs bei $\approx 2,4$ eV in Gold nötig wäre.

2.3.4 LSPR-Antwort bei Adsorption auf einem festen Träger

In vielen Anwendungen werden LSPR-aktive Nanopartikel auf festen Trägern fixiert, so dass optische aktive Oberflächen resultieren, die analog zur konventionellen SPR-Methode zu einer markierungsfreien Detektion von Bindungsereignissen eingesetzt werden können.

Bedingt durch die Fixierung der Partikel ist es jedoch nicht mehr möglich, den Brechungsindex der kompletten Partikelumgebung zu ändern.

In der Literatur existieren zwar einige Modelle, die die Resonanzspektren von auf metallischen und dielektrischen Substraten adsorbierten Nanopartikeln beschreiben, diese gehen aber von experimentell nur schwer zu realisierenden Voraussetzungen aus oder erfordern sehr hohen Rechenaufwand [110], [32], [125].

Die Mie-Theorie kann allerdings auch auf diese Systeme übertragen werden, indem analog zu Abschnitt 2.3.2.2 ein effektiver Brechungsindex für die den Partikel umgebende heterogene Matrix angesetzt wird. Dieser stellt eine geeignete Gewichtung der Beiträge des festen Trägers (η_{Sub}) und des restlichen Mediums (η_m) dar [110], [32].

$$\eta_{m,\text{eff}} = g \cdot \eta_m + (1 - g) \cdot \eta_{\text{Sub}} \quad (65)$$

Der Gewichtungsfaktor g hängt unter anderem sehr empfindlich vom Abstand zwischen Substrat und Partikel ab; in bestimmten Einzelfällen sollte er daher experimentell ermittelt werden.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin den Faktor abzuschätzen, indem eine von der Partikeloberfläche exponentiell abnehmende Empfindlichkeit gegenüber des umgebenden Brechungsindex angenommen wird; die Sensitivität ist somit nur auf ein begrenztes Volumen um den Partikel herum beschränkt. Ein Teil dieses Volumens wird vom festen Substrat mit η_{Sub} ausgefüllt, der restliche Teil vom umgebenden Medium mit η_m . Setzt man diese Volumina ins Verhältnis, erhält man einen Gewichtungsfaktor von $g \approx 0,7$ [126].

In [32] wurde der Einfluss eines festen Trägers auf die Sensitivität gegenüber Änderungen des lokalen Brechungsindex mit Hilfe der Mie-Theorie und unter Verwendung eines Gewichtungsfaktors von 0,7 modelliert (Goldnanopartikel mit \emptyset

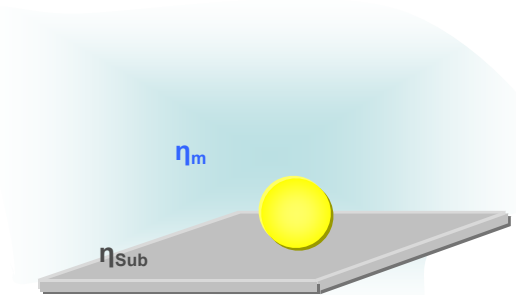


Abb. II.II.2-9: Schematische Darstellung der heterogenen Umgebung eines Oberflächen-adsorbierten Goldnanopartikels.

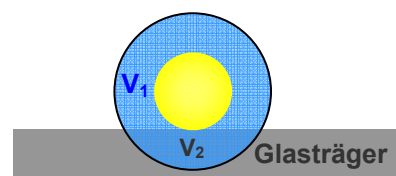


Abb. II.II.2-10: Berechnung der Gewichtungsfaktoren g anhand der unterschiedlichen Volumenanteile seiner heterogenen Umgebung.

= 40 nm). Hierbei ergab sich, dass die Sensitivität gegenüber der in einer Matrix mit homogenem Brechungsindex η_m eingebetteten Partikel bei Adsorption auf einem Glaträger mit $\eta_{\text{Sub}} = 1,5$ um etwa 30% reduziert wird.

2.4 Optische Eigenschaften der Core-Shell-Partikel (Kern-Hülle-Partikel)

Auch sogenannte Core-Shell-Nanopartikel, die aus einem dielektrischen Kern und einer nur wenige Nanometer dicken metallischen Hülle (Gold, Silber) bestehen, zeigen im sichtbaren Bereich eine ausgeprägte Resonanz, die auf LSPR zurückzuführen ist. $\text{Au}_2\text{S}/\text{AU}$ -Kern/Schale-Nanopartikel mit halbleitendem Au_2S -Kern und einer metallischen Goldhülle wurden erstmals Mitte der neunziger Jahre von Zhou et al. synthetisiert [127]. In den darauf folgenden Jahren wurde die Synthese von Halas et al. verfeinert und die optischen Eigenschaften der Nanopartikel eingehend untersucht [128]-[133]. Inzwischen bestehen eine Vielzahl weiterer Varianten zur Synthese von Core-Shell Partikeln, die sich unterschiedlicher Kernmaterialien bedienen (z.B. SiO_2 , Polystyrol). Ein wesentlicher Fortschritt der die Verwendung dielektrischer Materialien betrifft, ist, dass diese im Gegensatz zu festen metallischen Partikeln in einem wesentlich engeren Bereich von Größenverteilungen zugänglich sind. Die geringere Polydispersität hat auf diese Weise sowohl schärfere optische Resonanzen als auch höhere Extinktionswerte (in Ensemble-Messungen) zur Folge, da die inhomogene Linienverbreiterung wesentlich reduziert werden kann (größenabhängiger Dämpfungsterm; s. Abschnitt 2.1). Außerdem weisen sie in Bezug auf eine sensorische Anwendung eine Reihe weiterer Vorteile auf, die sowohl auf Grundlage der Mie-Theorie vorausgesagt als auch bereits teilweise experimentell bestätigt werden konnten.

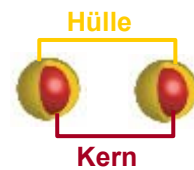


Abb. II.II.2-11:

Schematische Darstellung von Core-Shell-Partikeln (Nanopartikel mit dielektrischem Kern und metallischer Hülle; nach [32].

2.4.1 Anwendung der Mie-Theorie auf Kern/Hülle-Partikel

Die in Kapitel 2.3.2 zur Beschreibung der optischen Eigenschaften von Gold-Nanopartikeln vorgestellte Mie-Theorie lässt sich auf konzentrische, sphärische Schalenstrukturen erweitern, so dass sie auch zur Beschreibung der optischen Eigenschaften dieser Kern/Hülle-Systeme angewandt werden kann [32], [115], [116] und [134].

Hierbei ergaben sich zum Teil sehr gute Übereinstimmungen zwischen den theoretischen Voraussagen und den experimentell gewonnenen Ergebnissen. Die Streukoeffizienten a_L und b_L werden hierzu iterativ für den Lichtdurchtritt von Schale zu Schale ermittelt, wobei eine Rekursionsformel zur Berücksichtigung einer beliebigen Anzahl an Schalen um einen

Kern mit beliebiger dielektrischer Funktion herangezogen wird. Eine mathematische Abhandlung ist in der Literatur zu finden.

2.4.2 „Optische Vorteile“ von Kern/Hülle-Partikeln

Die Vorteile der Core-Shell- gegenüber der rein metallischen Nanopartikel bezüglich einer Verwendung zu sensorischen Zwecken betreffen vor allem die über das Kern/Hülle-Verhältnis steuerbare Lage der LSP-Resonanz, ihre höhere Sensitivität gegenüber Änderungen des lokalen Brechungsindex sowie die geringeren Linienbreiten [32], [135], [136].

Sowohl experimentell als auch auf Grundlage Mie-theoretischer Berechnungen (Erweiterung auf Schalenpartikel) konnte gezeigt werden, dass durch eine Variation des Verhältnisses von Kerndurchmesser und Schalendicke die Resonanz über einen großen Spektralbereich (über den gesamten sichtbaren bis hin zum nahen-Infrarotbereich) gezielt eingestellt werden kann. Dies ist für biologische Anwendungen (z.B. bei der Detektion von Antigenen in einer Blutplasma-Lösung) besonders wichtig, da es auf diese Weise möglich ist, die Resonanz gezielt außerhalb des Absorptionsbereiches störender Substanzen (z.B. Hämoglobin und Wasser, die hohe Absorptionen in einem Energiebereich von 1,1 bis 1,8 eV, entsprechend einem Wellenlängenbereich von 690 bis 1127 nm, zeigen) zu platzieren [137]. Eine Zunahme des Kern/Hülle-Verhältnisses hat dabei eine Resonanzverschiebung in den kürzerwelligen Bereich zur Folge.

Zudem kann bei Verwendung dieser Systeme sowohl die homogene als auch die inhomogene Linienverbreiterung reduziert werden. Eine homogene Linienbreite beruht auf intrinsischen Dämpfungsmechanismen sowie der Oberflächendämpfung; die inhomogene Linienbreite ist hingegen auf unterschiedliche Partikelgrößen und -formen zurückzuführen. Anhand von *Einzelpartikel*-Messungen (Streulichtspektren) konnte gezeigt werden, dass die homogene Linienbreite von Core-Shell-Partikeln im Vergleich zu derer von soliden Nanopartikeln mit vergleichbarem Radius geringer ausfällt [32]. In der angegebenen Referenz zeigten z.B. Au₂S/Au-Core-shell Partikel mit einem Durchmesser von 35 - 40 nm (Schalendicke ~ 5 nm) eine Linienbreite von etwa 180 meV; diejenige der rein metallischen Goldpartikel mit einem Durchmesser von 40 nm betrug dagegen 250 meV. Die reduzierte Linienbreite wurde auf eine Abnahme der Interband- und Strahlungsdämpfung zurückgeführt. Letztere resultiert aus dem geringeren Goldvolumen der Nanoschale; die verminderte Interbanddämpfung ist darauf zurückzuführen, dass die Resonanzenergie kleiner ist, als für eine Anregung des Interbandübergangs bei $\approx 2,4$ eV in Gold nötig wäre.

Da die typischerweise als Kernmaterialien genutzten dielektrischen Materialien (SiO₂, Polystyrol) zudem in einem wesentlich engeren Bereich an Größenordnungen und in homogeneren Formen zugänglich sind, kann auf diese Weise außerdem auch die inhomogene Linienbreite reduziert werden. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Kernsystemen handelt es

sich um SiO_2 -Nanopartikel mit einem Durchmesser von 400 nm und einer Größenverteilung von etwa ± 40 nm (Polyscience).

Core-Shell-Systeme zeichnen sich somit durch wesentlich schärfere Extinktionen aus, die eine exaktere Bestimmung der Resonanzmaxima erlauben.

Außerdem besitzen sie im Vergleich zu ähnlich großen soliden Goldpartikeln eine höhere Sensitivität gegenüber Änderungen des umgebenden Brechungsindex; dies konnte sowohl anhand Mie-theoretischer Berechnungen als auch in experimentellen Anwendungen gezeigt werden [32], [135], [136]. Die oben beschriebenen $\text{Au}_2\text{S}/\text{Au}$ -Core-Shell Partikel (Durchmesser von etwa 35 - 40 nm; 5 nm dicke Goldschale) zeigten eine etwa 3-fach höhere Resonanzverschiebung als solide Goldnanopartikel mit einem vergleichbaren Durchmesser (40 nm). Messungen in Lösungen unterschiedlicher Brechungsindices ergaben für dieses Core-Shell-System eine Sensitivität von etwa 3,3 meV bezüglich einer Änderung des Brechungsindex von $\Delta n = 0,1$ Einheiten; für die soliden metallischen Partikel betrug dieser Wert dagegen nur 2,0 meV/0,01. Die höhere Sensitivität der Core-Shell Partikel bleibt dabei auch im adsorbierten Zustand erhalten, wie jüngst auch an Filmen aus SiO_2/Au -Core/Shell Partikeln gezeigt werden konnte [136].

Angemerkt sei hier, dass Mie-theoretische Berechnungen für die Adsorption von Thiolverbindungen an Core-Shell Partikeln mit einer äußeren Goldschale geringfügig niedrigere Resonanzverschiebungen voraussagen als tatsächlich experimentell beobachtet wird [135]. In [32] wird postuliert, dass eventuell die Ausbildung der Gold-Schwefel-Bindung dazu führt, dass eine atomar dünne Goldschicht ($\sim 0,25$ nm; Gitterkonstante von Gold) ihren metallischen Charakter verliert; dadurch wird die Dicke der Goldschale reduziert und es resultiert eine zusätzliche Resonanzverschiebung ins Rote.

2.5 Einsatz von LSPR in der biomedizinischen Diagnostik

Die LSPR metallischer Nanopartikel wird hauptsächlich zu 2 verschiedenen Anwendungen eingesetzt: zu einer Detektion von Bindungsereignissen sowie zu einer Markierung von Molekülen (analog zu einer Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen) [100]-[106].

Je nach Anwendungszweck bedient man sich dabei verschiedener Einflussparameter auf ihre optischen Resonanzen.

Eine Detektion von Bindungsereignissen nutzt in vielen Fällen die Reaktion der Resonanzlage auf Änderungen des lokalen Brechungsindex aus. Abstandsabhängige Dipol-Dipol-Kopplungen, die mit einer elektromagnetischen Wechselwirkung zwischen den Partikeln verbunden sind, führen jedoch ebenfalls zu einer Beeinflussung ihrer optischen Resonanzen.

Im Fall einer Markierung mit Metallkolloiden nutzt man zur Visualisierung die durch die LSPR-Anregung hervorgerufene Absorption und Streuung.

2.5.1 Detektion mit LSPR in Lösung

Zur Detektion biospezifischer Wechselwirkungen mittels Nanopartikel-LSPR in Lösung kann z.B. die Sensitivität der Resonanzlage in Bezug auf interpartikuläre Wechselwirkungen eingesetzt werden. Beträgt der Abstand zwischen den Partikeln weniger als ihr Durchmesser, so treten über Dipol-Dipol-Kopplungen vermittelte elektromagnetische Wechselwirkungen zwischen ihnen auf [100]-[106]. Diese sind mit einer Verbreiterung und einer Verschiebung der LSPR in den längerwelligen Bereich verbunden und können durch eine Aufnahme von Extinktions- (Detektion von Absorption und Streuung; UV/Vis-Spektroskopie) oder Streulichtspektren nachgewiesen werden.

In der Literatur finden sich z.B. viele Anwendungen, welche ein Labeling von Einzelstrang-DNA mit Goldnanopartikeln nutzen, um die Hybridisierung mit dem ebenfalls markierten Komplementärstrang zu detektieren. Diese führt über eine Verminderung der Partikelabstände zu einer Änderung der Resonanzlage und kann durch eine Aufnahme von UV/Vis-Spektren verfolgt werden [138], [139], [140].

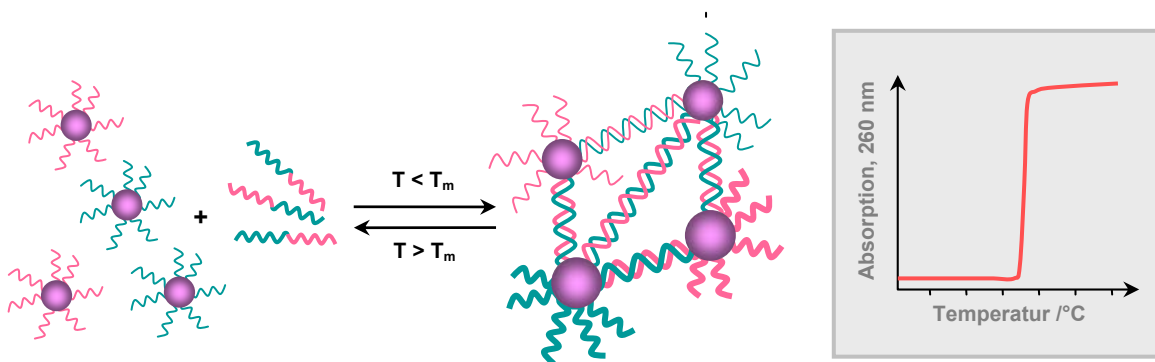


Abb. II.II.2-12: Die temperaturabhängige Hybridisierung von mit Einzelstrang-DNA funktionalisierten Goldnanopartikeln führt in Gegenwart der Komplementärsequenz zu einer Verschiebung des LSPR-Extinktionsmaximums und somit zu einer Änderung der Absorption bei fester Wellenlänge; nach [139].

Die untere Detektionsgrenze dieser Methode liegt bei einigen 10 femtomol Komplementär-DNA; solche Nanopartikel-Aggregations-Assays übertreffen somit die Sensitivität konventioneller, auf Fluoreszenzmarkierung beruhender Markierungsmethoden um etwa 2 Größenordnungen.

In der Literatur sind darüber hinaus eine Vielzahl weiterer Beispiele zu finden, in denen eine Markierung mit Goldnanopartikeln zur gezielten Detektion biospezifischer Bindungsprozesse in Lösung (z.B. von Protein-Protein- und DNA-DNA-Wechselwirkungen) eingesetzt wird [138], [141].

Zur Detektion biomolekularer Wechselwirkungen kann jedoch auch die Abhängigkeit der Resonanzlage vom lokalen Brechungsindex herangezogen werden; auf diese Weise können z.B. Bindungsprozesse auf der Partikeloberfläche anhand der Resonanzverschiebung detek-

tiert werden. So konnten z.B. Gold-gecoatete Siliziumdioxid-Nanopartikel (sog. Core-Shell-Partikel; s. Abschnitt 2.4) bereits erfolgreich zur gezielten Detektion bestimmter Antigene aus einer Blutplasma-Lösung eingesetzt werden, indem sie vorher mit dem spezifischen Immunglobulin funktionalisiert wurden [137]. Die mit der Bindung des Antigens verbundene Änderung des lokalen Brechungsindex führt zu einer Verschiebung der Resonanzlage in den längerwelligen Bereich. Die Durchführungszeit eines solchen Immunoassays beträgt weniger als 30 min und ermöglicht eine Detektion von Antigen-Konzentrationen im pg/ml-Bereich. Durch eine Optimierung des Verhältnisses von Kern- und Hüllenradius war es in dieser Anwendung zudem möglich, die Resonanzlage außerhalb des Absorptionsbereiches von Wasser und Hämoglobin zu platzieren.

Ebenso kann ein Labeling von Proteinen mit kolloidalem Gold genutzt werden, um induzierte Konformationsänderungen über eine Veränderung ihrer LSPR zu verfolgen. Auch dieser Ansatz nutzt die Sensitivität gegenüber einer Änderung des umgebenden Brechungsindex, der hier auf die mit der Konformationsänderung verbundene Dichteänderung zurückgeführt werden kann [100].

2.5.2 LSPR auf festen Trägersystemen

Eine Immobilisierung metallischer Nanopartikel auf festen Trägersystemem bietet einen Weg zur Erzeugung neuartiger, auf LSPR-beruhender, optisch aktiver Sensoroberflächen. Diese können analog zur konventionellen SPR-Spektroskopie zu einer markierungsfreien Detektion von Bindungsereignissen eingesetzt werden. In dieser Form der Anwendung beruht der Detektionsmechanismus daher auf der Sensitivität der Resonanzlage gegenüber Änderungen des Brechungsindex, die mit den Adsorptionsprozessen auf der Oberfläche verbunden sind [32], [118], [120].

Der wesentliche Vorteil eines solchen trägerbasierten Ansatzes gegenüber einer Detektion mittels LSPR in Lösung betrifft die Möglichkeit, im immobilisierten Zustand definierte Rezeptor-Positionen einzustellen. Er stellt somit den ersten Schritt zu einer Entwicklung von Sensoroberflächen dar, die in Biochips integriert werden können, in denen sie die parallele Analyse einer Vielzahl im Mikroarray-Format aufgebracht Komponenten erlauben.

Die in dieser Arbeit präparierten Nanopartikel-Oberflächen bestehen aus Core-Shell- (Nanopartikel mit dielektrischem Kern und einer metallischen Hülle) anstelle von rein metallischen Partikeln und zeichnen sich daher durch besondere optische Charakteristika aus; sie werden deshalb in einem separaten Kapitel besprochen. In diesem Abschnitt werden dagegen ausschließlich rein metallische Systeme, die in der Literatur bereits beschrieben sind, vorgestellt und in Abschnitt 3 hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile der konventionellen SPR-Methode gegenübergestellt.

Varianten eines solchen Träger-basierten Ansatzes betreffen zum einen die Anordnung der metallischen Nanopartikel auf dem festen Substrat. Diese können entweder statistisch homogen oder in einer strukturierten Form auf die Oberfläche aufgebracht werden. Eine solche Strukturierung bietet Vorteile, da der Feldstärkenverlauf des sich bei der LSPR ausbildenden und zur Detektion genutzten evaneszenten Feldes sowohl von der Größe und Gestalt als auch vom Abstand der erzeugten Nanopartikel-(Cluster) abhängt. Diese Parameter können daher zu einer Verbesserung ihrer sensorischen Sensitivität eingesetzt werden. Zudem kann auf diese Weise auch die laterale Auflösung der Detektionsmethode gegenüber derjenigen im homogen adsorbierten Zustand erhöht werden.

Zur Beschichtung von Oberflächen mit metallischen Nanostrukturen kann z.B. die NSL-(nanosphere lithography) Technik eingesetzt werden, die sich der Verwendung monodisperser Nanopartikel als nanolithographischer Masken bedient [142], [143]. Letztere kristallisieren in einer hexagonal-dichten Anordnung auf den Oberflächen aus und können in dieser Form als Depositionsmaske zur Metallabscheidung genutzt werden. Auf diese Weise entstehen dreieckige metallische Nanostrukturen, deren defekt-freie Domänen in einer Größenordnung von 10 bis 100 μm liegen. Solche metallischen Nanostrukturen mit einer lateralen Ausdehnung von etwa 100 nm und einer Höhe von 51 nm erwiesen sich bereits als ausgezeichnete LSPR-Sensoroberflächen mit einer sehr hohen Sensitivität in Bezug auf der Oberfläche stattfindender Bindungsereignisse.

Bezüglich der Bindung von Streptavidin an eine solche biotinylierte Oberfläche wurde z.B. eine Sensitivität von etwa 76,4 nm/RIU (RIU = refractive index unit) bestimmt; die untere Detektionsgrenze lag bei etwa 16 mM Streptavidin. Anhand von LSPR-Messungen konnte die Bindungskurve für dieses Bindungssystem ermittelt und die Bindungskonstante $K_{a,\text{surf}}$ zu 10^{11} M^{-1} bestimmt (Literaturwert $K_{a,\text{surf}} = 10^{13} \text{ M}^{-1}$) werden; dem Sättigungszustand entsprach eine Verschiebung der Resonanzlage um etwa 26,5 nm [120].

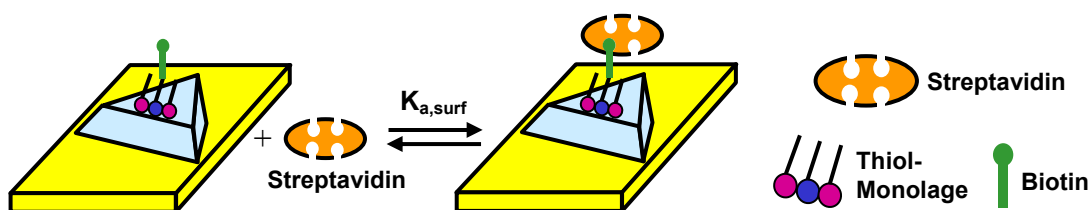


Abb. II.II.2-13: Schematische Darstellung nanolithographisch erzeugter triangularer Ag-Strukturen und deren Funktionalisierung mit Biotin zur Bestimmung der Streptavidin-Bindungskonstante anhand der Verschiebung der LSP-Resonanzlage; nach [120].

Ihre Funktionalisierung mit Hexadecanthiol war mit einer Resonanzverschiebung von etwa 40 nm verbunden und wurde einer Adsorption von näherungsweise 60.000 Molekülen pro Nanopartikel zugeordnet.

Dass solche, auf LSPR-beruhenden Detektionssysteme tatsächlich die Basis zur Entwicklung einer neuen und ausreichend sensitiven Klasse von Nano-Biosensoren darstellen, zeigt ihre erfolgreiche Anwendung in selbst komplizierten immunodiagnostischen Fragestellungen; mit ihrer Hilfe konnten z.B. die zwei unterschiedlichen (epitop-spezifischen) Bindungsdomänen des polyklonalen M71 Anti-ADDL-Antikörpers nachgewiesen und ihre jeweiligen Bindungskonstanten ermittelt werden [144]. Dieser bindet spezifisch bestimmte oligomere Peptide, sog. ADDLs (amyloid-derived diffusible ligands), die sich durch Selbstaggregation aus einzelnen Amyloid- β -Fragmenten (A β), einem aus 42 Aminosäuren-bestehendem Peptid, bilden. Ihre Ablagerungen in Hirnregionen werden als Entstehungsursache der Alzheimer-schen Krankheit (AD) angesehen. Mit Hilfe einer Anti-ADDL-funktionalisierten Sensoroberfläche konnte zudem durch Behandlung mit Proben aus humaner Cerebronspinalflüssigkeit zwischen gesunden und den an der AD-erkrankten Patienten, welche erhöhte ADDL-Konzentrationen aufweisen, unterschieden werden. Der beschriebene LSPR-Nanosensor erwies sich hierbei als ausreichend sensitiv, um ADDL-Konzentrationen im pmol-Bereich nachzuweisen zu können.

In einem anderen Ansatz wurde eine Goldoberfläche homogen mit kolloidalen Goldpartikeln beschichtet und diese LSPR-aktive Oberfläche ebenfalls zur Detektion biomolekularer Wechselwirkungen eingesetzt. Im Gegensatz zu konventionellen SPR-Sensoren, die ausschließlich auf propagierenden Oberflächenplasmonenresonanzen beruhen, ergaben sich in diesem Ansatz höhere Sensitivitäten. Dieses Phänomen wurde auf eine Wechselwirkung zwischen den propagierenden Oberflächenplasmonen der Metallschicht und den lokalisierten Plasmonen der Partikel zurückgeführt (s. Abs. 4) [145].

2.6 Quantitative Detektion mit LSPR-aktiven Nanosensor-Oberflächen

Die Vielzahl unterschiedlicher Parameter, durch welche sich optisch aktive Nanopartikeloberflächen auszeichnen, trägt dazu bei, dass eine vollständige physikalische Beschreibung dieser Systeme sehr schwierig ist und daher oft mit Näherungen gearbeitet wird.

Form, Gestalt und Ausdehnung der Nanopartikel bestimmen so z.B. sowohl die Stärke als auch den Verlauf des sich bei der LSPR ausbildenden und zur Detektion eingesetzten evaneszenten Feldes [124], [136].

In vielen Fällen befinden sich die immobilisierten metallischen oder metallisierten Nanopartikel durch Ausbildung von Kontaktpunkten zudem noch in einem elektrisch leitenden Zustand, so dass sowohl lokalisierte (auf den einzelnen Partikel beschränkte) als auch propagierende Plasmonen-Resonanzen auftreten, über deren gegenseitige Wechselwirkungen bislang noch keine eindeutigen Erkenntnisse vorliegen [146], [147].

Außerdem gibt es Systeme, welche aus Core-shell-Nanopartikeln bestehen (s. Abs. 4); diese setzen sich aus einem dielektrischen Kern und einer metallischen Schale zusammen. Der Einfluss des dielektrischen Kerns sowie das Verhältnis von Kern-/Hüllenradius sind hier zusätzliche, die LSPR-charakterisierende Parameter.

Weitere Unterschiede solcher Nanosensoren betreffen zudem die Art des verwendeten Trägermaterials; in vielen Fällen werden Goldoberflächen verwendet, so dass Wechselwirkungen zwischen den propagierenden Plasmonen des Substrats und der lokalisierten Plasmonen der Nanopartikel zu erwarten sind [145], [146], [147].

Insgesamt wird somit verständlich, dass infolge der Vielzahl an Parametern und ihres zum Teil unbekanntem Einflusses auf die optischen Eigenschaften zur Beschreibung dieser Systeme sehr oft Näherungen herangezogen werden. Unter anderem werden hierzu z.B. die in Abschnitt 1.3 angegebenen Gleichungen herangezogen, die eigentlich zur vereinfachten Beschreibung der propagierenden Oberflächenplasmonenresonanzen hergeleitet wurden [117]-[121].

Zur physikalischen Interpretation wurden unter anderem elektrodynamische Berechnungen auf Grundlage der DDA-Methode (discrete dipole approximation) mit Erfolg durchgeführt [142].

Ebenso ergaben auch Mie-theoretische Berechnungen in einigen Anwendungen eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Diese kann über die Einführung eines effektiven Brechungsindex für die Umgebung auf die trägerbasierten Ansätze übertragen werden [32], [126]. Durch eine Erweiterung der Theorie auf Schalenpartikel ist es zudem möglich, die optischen Eigenschaften von Core-Shell-Partikeln zu beschreiben; diese theoretische Erweiterung kann auch zur Interpretation von Bindungsprozessen herangezogen werden, die zu einer homogenen Funktionalisierung der Partikel führen. Auf diese Weise konn-

ten Berechnungen hinsichtlich der Abhängigkeit der Resonanzverschiebung von der Dicke d aufgebracht Schichten durchgeführt werden [32]. Dabei ergab sich, wie bereits in Abschnitt 2.3.2.3 dargestellt, dass die Sensorantwort innerhalb eines Schichtdickenbereiches von etwa 15 nm (l_d beträgt in diesem Beispiel 9,4 nm) näherungsweise durch eine Funktion der Form

$$\Delta\lambda_{\max} = a(1 - e^{-d/l_d}) \quad (66)$$

beschrieben werden kann, die der Gleichung (22) $\Delta\lambda_{\max} = m\Delta\eta(1 - e^{-2d/l})$ aus Abschnitt 1.3.2 sehr ähnlich ist [32], [117]. Es zeigt sich somit, dass die in Abschnitt 1.3 zur quantitativen Beschreibung der SPR hergeleiteten Näherungen unter bestimmten Voraussetzungen daher auch zu einer vereinfachenden Interpretation der auf LSPR-beruhenden Systeme angewandt werden können.

Trotz der Vielzahl an Parametern, die diese Systeme beschreiben, reichen daher in den meisten Anwendungen nur wenige (l_d , η) aus, um ihre wesentliche Reaktion auf die betrachteten Änderungen (Δd , $\Delta\eta$) auf vereinfachende Weise interpretieren zu können.

Hierbei muss jedoch angemerkt werden, dass sich die Abschwächungslängen l_d der ausschließlich auf lokalisierten Plasmonenresonanzen beruhenden Systeme von denen der propagierenden gravierend unterscheiden. Diese betragen im propagierenden Fall etwa 100 – 200 nm [98] und liegen somit um einen Faktor 10 – 40 höher als im lokalisierten Ansatz ($l_d = 5 - 10$ nm) [32]-[121]. Da die Abschwächungslänge die Schichtdicke somit gewöhnlich weit überschreitet ($l_d \gg d$), wird im propagierenden Fall sehr oft eine lineare Beziehung zwischen Schichtdicke und Sensorantwort beobachtet; in lokalisierten Systemen nimmt die Sensorantwort mit der Schichtdicke infolge der sehr viel kleineren Abschwächungslänge jedoch exponentiell ab.

3 Gesamtüberblick: SPR vs. LSPR

Die bislang in der Literatur beschriebenen Nanosensoren zeichnen sich im Vergleich zu den konventionellen SPR-Sensoren durch recht ähnliche Sensitivitäten aus [117]-[121]. Nach Gleichung (22) basieren hohe Sensitivitäten entweder auf einer entsprechenden Empfindlichkeit gegenüber Änderungen des Brechungsindex (m) und/oder kleinen Abschwächungslängen l_d .

Für die in [117]-[121] beschriebenen triangularen Ag-Nanopartikeloberflächen wurde z.B. eine Sensitivität von etwa $2 \cdot 10^2$ nm/RIU bestimmt [121]. Verglichen mit der entsprechenden Sensitivität konventioneller, auf propagierender SPR beruhender Sensoren von $2 \cdot 10^6$ nm/RIU wurde daher zunächst vermutet, dass sich dieser Nanosensor durch eine etwa 10.000-fach geringere Sensitivität auszeichnen sollte. Beide Sensorklassen zeigen in der Tat jedoch recht ähnliche Empfindlichkeiten gegenüber Änderungen ihrer biomolekularen Umgebung. Ursache für diese Erscheinung ist der große Unterschied ihrer Abschwächungswellenlängen l_d . Über eine Analyse der Sensorantwort bei Aufbringen mehrere Alkanthiolmonolagen durch eine Cu^{2+} -vermittelte layer-by-layer-Adsorption wurde dieser Parameter für den Nanosensor zu 5 - 15 nm (1-3% der Resonanzwellenlänge) bestimmt [121]; dagegen liegt der l_d -Wert propagierender Oberflächenplasmonen bei ca. 200 - 300 nm (20-40% der Resonanzwellenlänge).

Somit ist, wie anhand von Gleichung (22) zu erkennen, der gegenüber der konventionellen SPR drastisch niedrigere l_d -Wert die Ursache ihrer hohen Sensitivität gegenüber Änderungen der dielektrischen Eigenschaften in der unmittelbaren Umgebung.

Bei der Entwicklung neuer Nanosensoren sollte der Schwerpunkt jedoch auf einer hohen Sensitivität gegenüber Änderungen des umgebenden Brechungsindex gesetzt werden, da kleine Abschwächungslängen wiederum den Sensitivitätsbereich der Methode eingrenzen.

Neben einer recht hohen und vergleichbaren Sensitivität ist ein weiterer gemeinsamer Vorteil der LSPR- und SPR-Methoden, dass sie beide eine markierungsfreie Echtzeit-Analyse auf einer Zeitskala von 10^{-1} bis 10^3 sec ermöglichen [104]-[106]. Ein chemisch aufwendiges labeling des zu detektierenden Analyten ist somit nicht erforderlich; der Echtzeit-Modus ermöglicht zudem kinetische Messungen.

Die LSPR weist jedoch eine Reihe von Vorteilen gegenüber der konventionellen SPR auf, welche sie zu einer neuen und zukunftssträchtigen Methode der biomedizinischen Diagnostik machen. Diese betreffen vor allem die technisch einfachere und zudem kostengünstigere Art der Detektion als auch die Möglichkeit zu einer höheren lateralen Auflösung. Die LSPR kann durch eine einfache Aufnahme von Extinktions-Spektren beobachtet werden; bei der SPR wird hingegen eine Winkeländerung registriert. Die LSPR-Methode besitzt somit die zu einer Miniaturisierung und Parallelisierung nötigen Voraussetzungen, während diese im Fall der SPR auch heute noch eine technische Herausforderung darstellen [95] und mit komplizierten

und aufwendigen Aufbauten verbunden ist [107]. Zudem ist die laterale Auflösung bei der LSPR im Prinzip auf die Größe der sie erzeugenden Nanostrukturen beschränkt; theoretisch sollten somit Auflösungen im nm-Maßstab möglich sein [147], wohingegen die maximale Auflösung bei der SPR auf etwa $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ beschränkt ist (Ausbreitungslänge der Oberflächenplasmonen) [104].

Die LSPR-Methode bietet sich daher besonders zu einer Anwendung in Array-basierten Ansätzen zum Wirkstoff-Screening an (Protein-, DNA-Arrays); sie ermöglicht eine markierungsfreie Analyse von Bindungsereignissen mit einer sehr hohen lateralen Auflösung selbst bei Anwendung einer technisch einfachen Art der Detektion (Aufnahme von Extinktionsspektren).

Weiterhin ist es mit Hilfe der RRS(resonant Rayleigh scattering)-Spektroskopie oder der Dark-Field-Mikroskopie möglich, die LSPR *einzelner* Nanopartikel zu beobachten [104], [32]. Diese Spektroskopiearten ermöglichen somit eine wesentliche Einsparung an Probenmaterial.

4 LSPR-aktive Oberflächen durch Beschichtung mit Core-shell-Partikeln

Die in dieser Arbeit präparierten und zur markierungsfreien Detektion von Bindungsereignissen eingesetzten optisch-aktiven Nanopartikeloberflächen bestehen aus Gold-beschichteten Trägersystemen, welche mit SiO₂-Nanopartikeln funktionalisiert und anschließend über eine stromlose Goldabscheidung mit einer weiteren Metallschicht überzogen wurden.

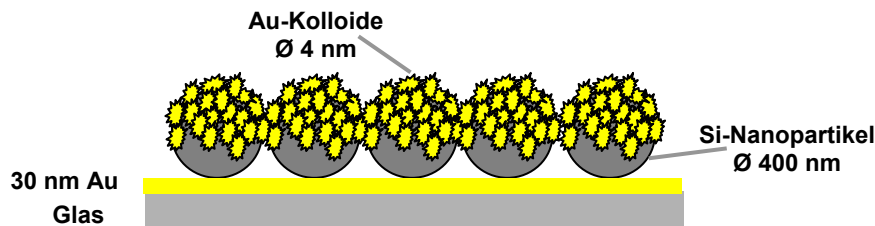


Abb. II.II.4-1: Schematische Darstellung der präparierten LSPR-aktiven Nanopartikel-Oberflächen.

Auf diese Weise entstehen sogenannte Core-shell-Partikel, deren dielektrischer Kern von einer metallischen Hülle umgeben ist und welche durch den homogenen Goldüberzug und die mit dem Selbstaggregationsprozeß verbundene Ausbildung von Kontaktpunkten zudem elektrisch leitend verbunden sind [146], [147].

Bei Einstrahlung von Licht geeigneter Wellenlänge können daher sowohl lokalisierte, das heißt auf einzelne Partikel beschränkte, als auch propagierende Oberflächenplasmonenresonanzen in der oberen Metallschicht angeregt werden, die miteinander wechselwirken und sich gegebenenfalls verstärken können [145], [147].

In der benachbarten Metallschicht des verwendeten metallisierten Trägers werden ebenfalls Plasmaschwingungen angeregt; das mit ihnen verbundene elektrische Feld tritt mit dem sich in der oberen Metallschicht ausbildenden in Wechselwirkung und bewirkt eine Verstärkung der Signalintensität, wenn beide Felder in Phase schwingen.

4.1 Core-Shell-Partikel

Partikel mit einer metallischen Hülle und einem dielektrischen Kern sind vielversprechende Kandidaten für das Design von Materialien mit neuen optischen Eigenschaften [131], [148], [149].

Ein wesentlicher Vorteil ist unter anderem, dass sie in einem sehr engen Bereich von Größenverteilungen präparierbar sind [150], [151], [152]. Gegenüber der Verwendung fester metallischer Partikel führt diese homogene Größenverteilung sowohl zu schärferen (reduzierte inhomogene Linienbreite) als auch höheren Extinktionswerten der optischen Resonanzen.

Zudem bietet das Verhältnis zwischen Kern- und Hüllenradius einen Parameter, durch welchen sich die optischen Eigenschaften der Partikel wesentlich verändern lassen; unter anderem ist es auf diese Weise möglich, die Position ihrer optischen Resonanz über einen weiten Bereich vom sichtbaren bis hin zum nahen Infrarot-Bereich gezielt einzustellen [131], [148], [149].

Zusätzlich besitzen sie gegenüber rein metallischen Systemen eine höhere Sensitivität bezüglich Änderungen des umgebenden Brechungsindex; dies wurde sowohl Mie-theoretisch vorausgesagt als auch bereits experimentell bewiesen (s. Abs. 2.4).

4.1.1 Herstellung von Core-Shell-Partikeln durch Layer-by-Layer-Technik

Die Layer-by-Layer-(LBL)-Technik stellt eine Methode zur Erzeugung stabiler Multischichtsysteme dar. Sie wurde von G. Decher entwickelt und beruht auf einer sequentiellen Abscheidung entgegengesetzt geladener Komponenten auf einem festen Substrat. Auf diese Weise können Multischichten komplexer Funktionalität aus einer Vielzahl von Reagentien auf unterschiedlichen Substraten hergestellt werden [153], [154]. Anwendungen finden solche Multischichten z.B. im Korrosionsschutz [155] sowie zur Erzeugung antireflektierender, antistatischer und biokompatibler Beschichtungen [156].

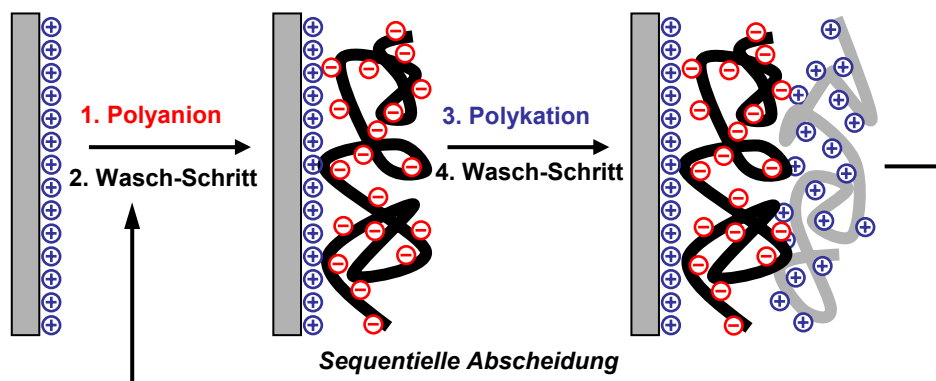


Abb. II.II.4-2: Schematische Darstellung der LBL(Layer-by-Layer)-Technik zur Erzeugung stabiler Multischichtsysteme durch sequentielle Abscheidung entgegengesetzt geladener Komponenten auf einem festen Substrat; nach [153].

In der Abb. II.II.4-2 ist der LBL-Prozess schematisch dargestellt, hier werden nacheinander entgegengesetzt geladene Polyelektrolyte auf einer positiv geladenen Oberfläche adsorbiert. Die LBL-Technik ist jedoch nicht auf eine sequentielle Polyelektrolyt-Abscheidung beschränkt; das Prinzip kann auch auf eine Adsorption von Nano- und Mikropartikeln angewandt werden, die sowohl synthetischen (Latex, Metalle, etc.) [157], [158] als auch biologischen (Proteine, Zellen, usw.) Ursprungs sein können [159].

Der Arbeitsgruppe um Prof. Möhwald am MPI für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm gelang es, die LBL-Methode auf gekrümmte Oberflächen zu übertragen, wodurch eine Möglichkeit zur Beschichtung von kolloidalen Mikro- und Nanopartikeln eröffnet wurde [158]. Diese Anwendung stellt einen viel versprechenden Ansatz zur Darstellung von beschichteten Partikeln mit speziellen optischen oder biologischen Eigenschaften dar, deren Applikationen auf verschiedensten Gebieten, wie etwa der Biosensorik [146], [147] der Enzymkatalyse [160] oder im Drug delivery [161] liegen können. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Variante der Layer-by-Layer-Technik zur Beschichtung von SiO₂-Nanopartikeln ($\varnothing = 400$ nm) mit Goldkolloiden ($\varnothing = 4$ nm) verwendet. Durch Adsorption metallischer Kolloidteilchen konnten (ggf. unter beliebiger Wiederholung der sequentiellen Abscheidungsschritte) leitfähige Schalen um die Partikel herum ausgebildet werden, sofern nach der Adsorption zusätzlich eine stromlose Metallabscheidung an den als Katalysator wirkenden Metallpartikeln erfolgt. Auf diese Weise resultieren LSPR-aktive Core-Shell-Partikel, die zu sensorischen Zwecken verwendet wurden (s. Kapitel IV.II) [147].

Halas et al. nutzten ebenfalls die LBL-Technik zur Synthese von Core-Shell-Partikeln. Sie verwendeten SiO₂-Nanopartikeln (Durchmesser zwischen 60 und 120 nm), welche zur Erzeugung positiver Oberflächenladungen zunächst aminoterminiert und anschließend durch eine elektrostatische Abscheidung Citrat-stabilsierter Goldkolloide metallisiert wurden. Nach diesem Schritt lag die Goldbedeckung bei ca. 30%; durch eine weitere Behandlung mit einer Gold(III)-haltigen Reduktionslösung konnte auch hier über eine stromlose Goldabscheidung eine nahezu geschlossene Metallschale erzeugt werden [148].

Eine Grundvoraussetzung zur erfolgreichen Beschichtung von Nano- und Mikro-Teilchen mit kleineren Kolloiden (diese werden im Folgenden allgemein als Kolloide bezeichnet) ist jedoch die Stabilität der Komponenten in Lösung. Diese wird durch besondere kolloid-chemische Eigenschaften determiniert und beruht auf einer geeigneten Balance der zwischen ihnen bestehenden elektrostatischen und (gegebenenfalls auch sterischen) Abstoßungskräfte einerseits und der attraktiven van-der-Waals-Kräfte andererseits (s. folgender Abschnitt). Zur erfolgreichen LBL-Beschichtung in Lösung müssen daher zuvor Parameter wie Partikelkonzentration und -größe, Polyelektrolytkonzentration, -länge und -art sowie der Salzgehalt der Lösung optimiert werden.

4.1.2 Grundlagen kolloidaler Stabilität

Aufgrund des großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen wird die Chemie von Kolloiden durch Oberflächeneffekte bestimmt. Kolloide sind aufgrund ihrer großen Oberfläche thermodynamisch instabil gegenüber der kompakten (aggregierten) Form; ihre Stabilität ist daher nicht thermodynamisch, sondern kinetisch begründet.

Die anziehende Wechselwirkung zwischen den Teilchen wird durch die langreichweitigen van der Waals-Wechselwirkungen hervorgerufen. Zur Stabilisierung benötigt man daher Mechanismen, die dieser Kraft entgegenwirken und eine irreversible Koagulation verhindern. Eingesetzt werden unter diesem Aspekt vor allem die sterische und die Ladungsstabilisierung [162].

Bei der sterischen Stabilisierung werden die Kolloide mit einer Polymerschicht überzogen, die bei einer Annäherung der Teilchen durch Überlappung der Polymerhüllen entropische Abstoßungskräfte verursacht und eine Koagulation unterbindet.

Die Ladungsstabilisierung beruht hingegen auf der Erzeugung von Oberflächenladungen durch Funktionalisierung der kolloidalen Partikel. Hierbei kann es sich sowohl um anorganische Ionen oder dissoziierbare Verbindungen handeln, so dass die Oberflächenladung bei Kenntnis des pKs-Werts der adsorbierten Spezies durch Einstellung des pH-Wertes der Lösung reguliert werden kann.

Das Kolloidteilchen kann dann als Makroion mit 100 – 1000 Elementarladungen aufgefasst werden. Die Gegenionen der adsorbierten Ionen verbleiben nahe der Oberfläche und bilden eine elektrische Doppelschicht um die Kolloide aus, so dass ihre Ladungen gegeneinander abgeschirmt werden. Mit der Doppelschicht verbunden ist somit ein elektrisches Potential an der Oberfläche der Teilchen, welches als elektrokinetisches oder Zeta-Potential bezeichnet wird [163].

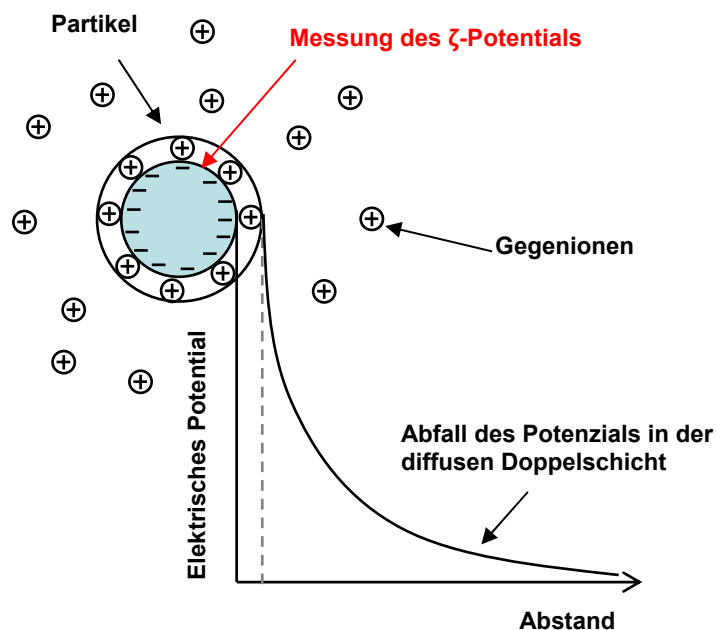


Abb. II.II.4-3: Schematisches Modell der elektrostatischen Doppelschicht eines Kolloidteilchens und Darstellung des Zetapotentials im Potentialverlauf; nach [164].

Da die Doppelschicht im Allgemeinen diffus ist und die Teilchen nur unvollständig voneinander abschirmt, besteht zwischen ihnen eine elektrostatische Abstoßung, welche die van der Waals–Anziehung übersteigt und die Koagulation auf diese Weise verhindert.

Eine Erhöhung der Ionenstärke (Zugabe von Salzen) kann die Abschirmung zwischen den Teilchen jedoch erhöhen, wodurch die Reichweite der Coulombkraft verringert wird. Die Abschirmlänge oder Debye-Länge, die aus der Debye-Hückel'schen Theorie folgt, nimmt durch die zusätzlich vorhandenen Ionen ab. Das abgeschirmte Coulomb-Potential V_i im Abstand r kann nach der Gleichung (67) berechnet werden [165]:

$$V_i = \frac{z_i^2 \cdot e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r} \cdot \exp\left(-\frac{r}{r_D}\right) \quad (67)$$

(z_i = Teilchenladung, e = Elementarladung, ϵ_0 = Vakuumdielektrizitätskonstante, ϵ_r = Dielektrizitätskonstante der Umgebung).

Für die Debye'sche Länge r_D gilt:

$$r_D = \sqrt{\frac{e^2 \cdot z_i n_i}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}} \quad (68)$$

mit der Anzahldichte n_i der Ionen. Die elektrostatische Doppelschicht wird also durch die Erhöhung der Ladungsdichte komprimiert. Eine Erhöhung der Ionenstärke kann somit zu einer Koagulation der Teilchen führen.

Eine stabile kolloidale Suspension setzt daher eine Optimierung von Parametern wie Partikelkonzentration, Ionenstärke der Lösung und im Fall einer Ladungsstabilisierung über dissoziierbare Gruppen auch des pH-Wertes der Pufferlösung voraus.

4.2 Beschichtung von Oberflächen mit kolloidalen und Core-Shell-Partikeln

Aus kolloidalen Partikeln bestehende Beschichtungen haben in den letzten Jahren an Bedeutung entscheidend zugenommen. Anwendungen finden sie in einer Vielzahl verschiedener Felder, wie z. B. im Nanotechnologie- [166] und Life-science-Bereich [145], [167].

Zur Beschichtung von Oberflächen mit Core-Shell-Partikeln bestehen insgesamt 2 Möglichkeiten.

Diese können zum einen nach dem Layer-by-Layer-Verfahren zunächst in wässriger Lösung hergestellt [164], [168], [169] und anschließend über unterschiedliche nasschemische Prozesse auf den Oberflächen aggregiert werden.

Ein anderer Weg besteht darin, die dielektrischen Partikel zunächst auf den Oberflächen zu adsorbieren und erst im Nachhinein mit Metall unter Ausbildung von Core-Shell-Partikeln zu

umhüllen [146], [147]. Dies kann durch eine Variation des in Lösung genutzten LBL-Verfahrens erfolgen. Diese Strategie führt zu höheren Belegungsdichten und wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt. Da sich die Partikel nach der Adsorption häufig berühren, kommt es im Gegensatz zur Adsorption vorbeschichteter Partikel zur Ausbildung von elektrischen Kontaktpunkten. Die unterschiedlichen Belegungsdichten der beiden Verfahren sind daher auch mit unterschiedlichen optischen Eigenschaften verbunden (s. Abs. 4.3).

Ebenso bestehen auch bezüglich der Partikel-Adsorption verschiedene Varianten. Eine mögliche Methode stellt z.B. eine elektrostatisch vermittelte Adsorption dar. Beschichtet man die Partikel vor ihrer Adsorption mit einem geeigneten Polyelektrolyten, so können diese anschließend auf einem durch chemische Funktionalisierung entgegengesetzt geladenem festen Träger über elektrostatische Kräfte vermittelt adsorbiert werden [147].

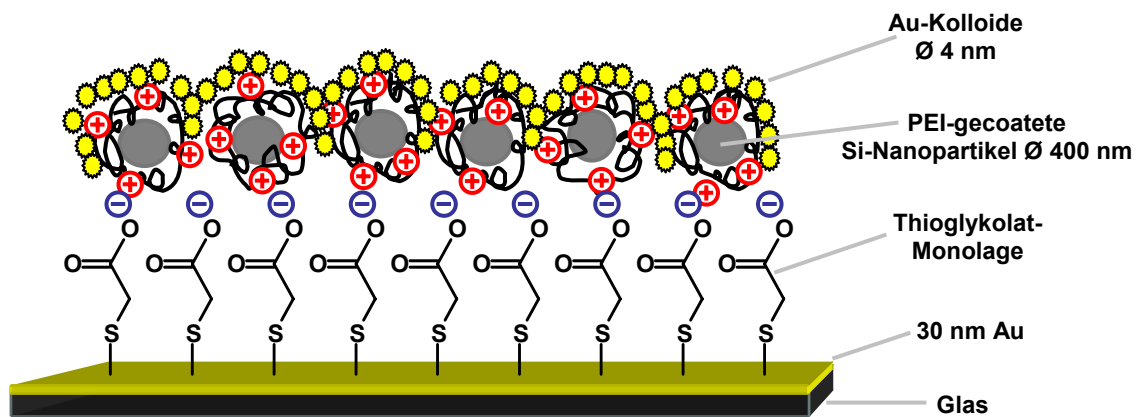


Abb. II.II.4-4: Schematische Darstellung des molekularen Aufbaus der präparierten Nanopartikel-Oberflächen.

Ebenso ist jedoch auch eine kovalente Bindung zwischen zuvor chemisch funktionalisierten Partikeln und Oberflächen möglich, die gegebenenfalls zu stabileren Systemen führt. So konnten z.B. aminoterminierte Silikapartikel synthetisiert werden, die anschließend kovalent an carboxyterminierte Träger gekoppelt wurden und sich durch höhere Stabilitäten gegenüber Systemen auszeichnen, die auf rein elektrostatischen Kräften beruhen [20].

Ein weiterer Vorteil, der mit der Verwendung metallisierter Partikel verbunden ist, betrifft die Möglichkeit zu einer leichten Oberflächen-Modifikation durch Ausbildung selbst-aggregierender Monolagen.

Solche chemischen Oberflächenmodifikationen (Funktionalisierung durch Chemi- und Physisorption) sind für ihre Adsorption auf festen Substraten von entscheidender Bedeutung, da sie zum einen eine Kontrolle des Abstandes im adsorbierten Zustand ermöglichen und zugleich einen Weg zu ortsselektiven Adsorptionsprozessen und somit zu strukturierten Nanopartikel-Beschichtungen eröffnen. Da durch die Art (Geometrie) und Ausmaße der Struktu-

rierung zum einen die Sensitivität bezüglich Änderungen des umgebenden Brechungsindex [117], [119], [121], [142], [143], [171] als auch die laterale Auflösung der (auf LSPR-basierenden) Detektionsmethode bestimmt wird [147], stellen solche strukturierten Ansätze einen bedeutenden Parameter zur Kontrolle ihrer optischen Eigenschaften dar.

4.2.1 Strukturierte Beschichtungen von kolloidalen und Core-Shell-Partikeln

Ein weiterer Ansatzpunkt zur Modifikation und Kontrolle der optischen Eigenschaften von aus metallischen oder metallisierten (Core-shell-Partikel) Partikeln bestehenden Beschichtungen stellt die auf der Oberfläche erzeugte Struktur, insbesondere deren Geometrie und Ausmaße dar [117], [119], [121], [142], [143], [171].

Die Ursache dafür ist, dass zum einen der Feldstärkenverlauf des bei der LSPR ausgebildeten und zur Detektion genutzten evaneszenten Feldes von der Geometrie und den Ausmaßen der Partikel und somit auch von der Struktur der auf der Oberfläche aufgetragenen Partikel-Cluster abhängt [104], [32], [124].

Des Weiteren zeigen die optischen Eigenschaften adsorbierter Core-shell-Partikel, wie auch theoretisch vorausgesagt wird [172], eine hohe Empfindlichkeit bezüglich des interpartikulären Abstandes [146], [147]; eine durch Strukturierung erzielte Kontrolle des Abstandes im adsorbierten Zustand stellt somit auch in dieser Hinsicht einen Ansatzpunkt zur Beeinflussung ihrer optischen Eigenschaften dar.

Von besonderer Bedeutung im Hinblick auf eine Anwendung in chip-basierten Array-Ansätzen zum Wirkstoff-screening ist jedoch die Tatsache, dass die laterale Auflösung dieser Detektionsmethode infolge der lokalisierten Natur der Resonanzen in der Größenordnung der sie erzeugenden Objekte liegt. Werden Partikel in μm - oder sogar nm -Maßstab auf der Oberfläche strukturiert, so resultieren sehr viel höhere Auflösungen als bei den derzeit verfügbaren SPR-Vorrichtungen (Bereich von etwa $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$); es bestehen daher die wesentlichen Voraussetzungen für eine starke Miniaturisierung und Parallelisierung dieser Methode.

Eine Möglichkeit zur strukturierten Adsorption liegt z.B. in der Verwendung chemisch modifizierter Oberflächen [173] und/oder Partikel [174]-[176]. Da es sich hierbei oft um metallisierte Oberflächen handelt, bietet sich eine chemische Funktionalisierung unter Ausbildung Selbstaggregierender Monolagen an (s. Abschnitt 4.4.1).

Zur Strukturierung dieser SAMs existieren bereits eine Vielzahl etablierter Techniken. Zu nennen sind unter diesem Aspekt z. B. die Photolithographie [177], das Mikrokontaktdrucken (μCP) [178] und die chemische Nanolithographie [179].

μCP , eine vielseitige nicht-lithographische Technik, ermöglicht z.B. die Erzeugung von Oberflächenmustern im Mikro- und Submikrometer-Bereich. Die Anwendung dieser Stempeltechnik zur Immobilisation von Thiolen eröffnet somit den Weg zur Erzeugung einer Vielzahl von

Oberflächenstrukturen mit Dimensionen im μm -Bereich. Diese soft-lithographische Methode konnte bereits erfolgreich zur Erzeugung strukturierter Nanopartikelbeschichtungen eingesetzt werden. Die Oberflächen wurden hierzu zunächst mittels μCP chemisch vorstrukturiert und anschließend mit geeignet funktionalisierten Partikeln umgesetzt [147]. Auf diese Weise konnten sowohl Linienstrukturen mit einer Breite von $2\ \mu\text{m}$ als auch aus Nanopartikel-Clustern bestehende Punktmuster mit einem Durchmesser von etwa $2,5\ \mu\text{m}$ erzeugt werden. Die Elektronenstrahl-Lithographie erlaubt dagegen eine Erzeugung von chemischen Mustern im nm-Bereich. Durch Elektronenbeschuss eines 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol-SAMs auf Au konnte so z.B. eine Umwandlung der terminalen NO_2 - in NH_2 -Gruppen sowie zugleich eine Quervernetzung des darunter liegenden aromatischen Films erreicht werden [179]. Die kleinsten auf diese Weise generierbaren Strukturen sind momentan Linien mit einer Breite von $10\ \text{nm}$. Diese NH_2 -terminierte Nano-Struktur kann dann z. B. als Templat für folgende Kopplungs-Reaktionen dienen und stellt somit eine Möglichkeit zur Erzeugung von im nm-Maßstab strukturierten Nanopartikelbeschichtungen dar.

Vorteilhaft an den beschriebenen Techniken ist sowohl die hohe laterale Ausdehnung der erzeugten 2-dimensionalen Muster (die bei der Elektronenstrahl-Lithographie in einem Bereich von einigen $100\ \mu\text{m}$ liegt) sowie die mit ihnen verbundene Kontrolle zur Durchführung ortsselektiver Depositionen.

Eine weitere Möglichkeit zur Strukturierung im Nanometer-Maßstab stellt die kolloidale Lithographie dar, welche sich der Verwendung nanolithographischer Masken bedient [142],

[143]. Das Prinzip dieser Methode besteht in einer Voradsorption von Nanopartikeln mit einer möglichst engen und homogenen Größenverteilung; diese kristallisieren aufgrund der zwischen ihnen bestehenden starken van der Waals'schen Anziehungskräfte auf den Oberflächen in einer hexagonal-dichten Kugelpackung aus. Dieses Muster wird anschließend als Depositionsmaske z.B. zur Metallabscheidung genutzt, so dass regelmäßige dreieckige Strukturen im nm-Bereich resultieren, deren Ausdehnungen durch die Größe der verwendeten Partikel bestimmt werden. Solche Strukturen mit einer lateralen Ausdehnung von etwa

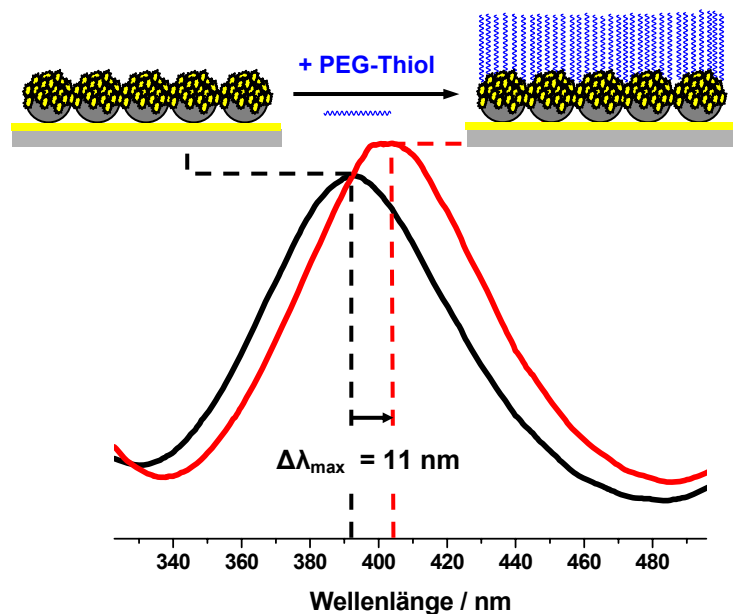


Abb. II.II.4-5: Verschiebung der LSP-Resonanz oberflächenadsorbierter Core-Shell Partikel bei Funktionalisierung dieser Sensoroberflächen (Adsorption von Thiolverbindungen).

100 nm und einer Höhe von ca. 50 nm erwiesen sich bereits als ausgezeichnete LSPR-aktive Sensoroberflächen mit sehr hoher Sensitivität.

Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass die erzeugten Muster nur eine relativ geringe laterale Ausdehnung besitzen; defektfreie Domänen liegen typischerweise in einer Größenordnung von etwa 10 bis 100 μm .

4.3 Optische Eigenschaften Oberflächen-adsorbierter Core-shell-Partikel

Untersuchungen zum Verständnis der optischen Eigenschaften von Core-Shell-Partikeln sind noch ein relativ junges Gebiet [131], [148], [149], [180]. Sie können, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, z.B. durch eine Erweiterung der Mie-Theorie auf Schalenpartikel beschrieben werden [32]-[116]; hierbei wurde eine gute Übereinstimmung zwischen den theoretisch vorausgesagten und experimentell ermittelten Werten erhalten.

Die Anregung von Plasmaschwingungen in der den Partikel umgebenden Metallschale führt ebenso wie bei rein metallischen Nanopartikeln zum Auftreten sogenannter lokalisierter Oberflächenplasmonen-Resonanzen in ihren Absorptions- und Streulichtspektren. Außerdem zeigen sie wie diese eine hohe Sensitivität bezüglich Änderungen des lokalen Brechungsindex, welche zu einer markierungsfreien Detektion von Bindungsereignissen eingesetzt werden kann und die Grundlage zu einer Anwendung in der Immundiagnostik darstellt [32], [137], [147].

Im Hinblick auf eine solche Anwendung besitzen diese binären Systeme im Vergleich zu rein metallischen Partikeln jedoch einige Vorteile, die auch im adsorbierten Zustand erhalten bleiben und nachfolgend noch einmal kurz zusammengefasst werden.

Dies ist zum einen die Möglichkeit, dass durch Variation des Verhältnisses von Kern/Hüllenradius die Position der LSP-Resonanz über den gesamten sichtbaren bis hin zum nahen Infrarot-Bereich gezielt eingestellt [131], [148], [149] und somit außerhalb des Absorptionsfensters von Störkomponenten (in immunodiagnostischen Anwendungen hauptsächlich Hämoglobin und Wasser) platziert werden kann; dies wurde bereits im Jahre 1989 theoretisch vorhergesagt [181].

Ein weiterer Vorteil betrifft die geringeren Linienbreiten, die eine exaktere Bestimmung der Resonanzlage ermöglichen. Diese sind zum einen auf eine mit der Schalenstruktur verbundene geringere Oberflächendämpfung als auch auf eine Reduktion der inhomogenen Linienverbreiterung zurückzuführen. Letztere ist in der engeren Größenverteilung der typischerweise verwendeten dielektrischen Kernmaterialien (SiO_2 , Polystyrol) begründet [150]-[152]. Zusätzlich konnte sowohl in Mie-theoretischen Ansätzen als auch experimentell gezeigt werden, dass sich Kern/Hülle-Systeme gegenüber rein metallischen Partikeln vergleichbarer

Größenordnung durch eine höhere Sensitivität bezüglich Änderungen des lokalen Brechungsindex auszeichnen [32], [147].

Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanzen besitzen zudem im Vergleich zu propagierenden drastisch niedrigere Abschwächungslängen ($l_d = 5 - 10 \text{ nm}$) [32], [121]; diese sind um etwa einen Faktor 10 - 40 niedriger als im propagierenden Fall (100 - 200 nm). Ihre Sensitivität ist daher auf ihre unmittelbare Nanoumgebung beschränkt; damit verbunden ist eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Änderungen des Brechungsindex in der umgebenden Lösung (z.B. hervorgerufen durch Temperaturänderungen), die wiederum eine eindeutige und quantitative Auswertung der zu detektierenden Bindungsereignisse stören kann. Aufwendige Kalibrierungen und Referenzmessungen sind im Gegensatz zur konventionellen SPR-Spektroskopie daher nicht nötig.

Die mit einer Abnahme der Abschwächungslänge verbundene Einschränkung des Sensitivitätsbereiches hat allerdings auch negative Konsequenzen, sofern die in den Bindungsstudien resultierenden Schichtdicken in ihrer Größenordnung liegen; die typischerweise in immunodiagnostischen Anwendungen ausgebildeten und aus relativ großen Makromolekülen bestehenden Sandwichstrukturen erreichen dabei sehr schnell Schichtdicken, die den Detektionsbereich des Sensors gegebenenfalls ($d \gg l_d$) überschreiten [122], [123].

Die Fixierung der Core-Shell-Partikel auf einem festen Träger ist jedoch auch mit einer Änderung ihrer optischen Eigenschaften verbunden. So ist es in dieser Form z.B. nicht mehr möglich den Brechungsindex der kompletten Partikelumgebung zu ändern [126]. Eine einfache Schlussfolgerung ist daher zunächst, dass sich solche Systeme durch eine reduzierte Sensitivität bezüglich Brechungsindexänderungen auszeichnen sollten. Dies konnte auch theoretisch mit Hilfe der Mie-Theorie gezeigt werden, die auch zur Beschreibung solcher Systeme angewandt werden kann, wenn für den Brechungsindex der heterogenen Matrix ein geeigneter Effektivwert angesetzt wird [32]. Theoretische Rechnungen ergaben für den adsorbierten Zustand (bei Adsorption auf einem Glasträger) um etwa 30% reduzierte Sensitivitäten gegenüber einer Detektion in Lösung.

Allerdings hängt die Sensitivität im adsorbierten Zustand noch von einer Reihe weiterer Parameter ab, die in der genannten Referenz nicht berücksichtigt wurden und gezielt genutzt werden können, um die Empfindlichkeit gegenüber einer Anwendung in Lösung noch erheblich zu erhöhen. Diese betreffen zum einen den interpartikulären Abstand [146], [147] und die Art des verwendeten Trägermaterials.

Es wurde bereits theoretisch vorhergesagt [172], dass im Fall sich berührender Partikel eine signifikante Resonanzverstärkung resultieren sollte. Durch experimentelle Arbeiten von Himmelhaus und Takei konnte diese Vorhersage bestätigt werden [146]. Diese beschäftigten sich mit den optischen Eigenschaften Oberflächen-adsorbierter PS(Polystyrol)-Partikel, welche durch Gold-Bedampfung der oberen Schicht – durch Erzeugung sog. gold half-shells

(caps) – in einen verbundenen und somit elektrisch leitenden Zustand überführt wurden. Bei hohen Au-Bedeckungen und somit einer starken Verbindung der einzelnen Partikel wurde eine erhebliche Steigerung der Extinktionswerte des von der Oberfläche reflektierten Lichts festgestellt. Diese liegen um etwa 3 Größenordnungen höher als die gewöhnlich für oberflächenadsorbierte metallische Nanopartikel beobachtet; auf diese Weise kann somit eine erhebliche Steigerung des Signal/Rausch-Verhältnisses erreicht werden. Da sich die Partikel in diesem Fall in einem leitenden Zustand befinden, können in der oberen Metallschicht ebenfalls auch propagierende Plasmaschwingungen angeregt werden. Die verstärkte Absorption ist daher wahrscheinlich auf das kombinierte Auftreten von lokalisierten als auch propagierenden Oberflächenplasmonenschwingungen zurückzuführen.

Wird zur Adsorption der Partikel eine metallisierte Trägerschicht verwendet, tritt zudem eine erhebliche Sensitivitätssteigerung bezüglich Änderungen des lokalen Brechungsindex auf. Bei einer Adsorption von Oktadekanthiol wurde z.B. eine Resonanzverschiebung von etwa 55 nm beobachtet [147]. Gegenüber der konventionellen SPR-Spektroskopie entspricht dies einer etwa 5-fach höheren Empfindlichkeit. Zudem tritt zusätzlich eine Zunahme der optischen Extinktionswerte und somit des Signal/Rausch-Verhältnisses auf. Es wird vermutet, dass auch diese Effekte auf ein kombiniertes Auftreten von propagierenden und lokalisierten Plasmaschwingungen zurückgeführt werden können. Sowohl in der oberen (sofern die Partikel Kontaktpunkte ausbilden) als auch in der benachbarten unteren Metallschicht des Trägers bilden sich bei einer Anregung von Plasmaschwingungen elektrische Felder aus, deren Amplituden sich gegenseitig verstärken können, wenn sie miteinander in Phase schwingen.

Die Ausbildung homogener Nanopartikellagen hat jedoch zur Folge, dass die theoretisch maximal mögliche laterale Auflösung infolge der Ausbildung von Kontaktpunkten und des damit verbundenen kombinierten Auftretens von propagierenden Oberflächenplasmonen wieder herabgesetzt wird. Im Fall isolierter Partikel treten hingegen rein lokalisierte, das heißt auf einzelne Partikel beschränkte Resonanzen auf; die Auflösung liegt daher in diesem Fall in der Größenordnung der eingesetzten Partikel und somit im nm-Bereich. Propagierende Oberflächenplasmonen haben hingegen eine mittlere freie Ausbreitungslänge von etwa 10 μm ; die maximale Auflösung ist bei der SPR-Spektroskopie daher auf diesen Wert beschränkt. Werden die Nanopartikel hingegen in einer strukturierten Form auf der Oberfläche adsorbiert [142], [143] so kann man hinsichtlich der lateralen Auflösung wieder von ihrer lokalisierten Natur profitieren; diese entspricht in diesem Fall den Ausmaßen der ausgebildeten Nanopartikelcluster. Zur Strukturierung im μm - und nm-Maßstab stehen bereits eine Vielzahl an Methoden zur Verfügung (s. Abschnitt 4.2.1), die zum Teil bereits erfolgreich zur Erzeugung strukturierter Nanopartikelbeschichtungen eingesetzt werden konnten.

Die Möglichkeit zu einer sehr hohen lateralen Auflösung sowie die technisch einfache und kostengünstige Art der Detektion stellen insgesamt die wesentlichen Voraussetzungen zu

einer Miniaturisierung und Parallelisierung der LSPR-Methode dar. Als fester Träger in solchen Chip-basierenden Ansätzen stellen diese Sensoroberflächen somit ein zukunftssträchtiges Instrument zur Wirkstoffsuche im Hochdurchsatzverfahren dar. Dagegen ist die Anwendung der SPR-Spektroskopie auf diesem Gebiet bislang immer noch mit höheren technischen Anforderungen bezüglich der Detektion [107] sowie einer geringeren lateralen Auflösung verbunden und daher im Routineeinsatz nur schlecht implementierbar.

Von der Firma Pharmacia Biosensor wurden mit dem Ziel der Miniaturisierung z.B. SPR-Sensoren auf der Basis von integriert optischen Wellenleitern und optischen Fasern entwickelt. Die Sensitivität integriert optischer oder faseroptischer Sensoren ist allerdings etwa 1 Größenordnung schlechter als diejenige konventioneller SPR-Sensoren, so dass die Produktion faseroptischer Sensoren bereits nach wenigen Jahren eingestellt wurde [95]. Der SPR-Einsatz in Array-Anwendungen (üblicherweise als SPR-Imaging bezeichnet) erfolgt

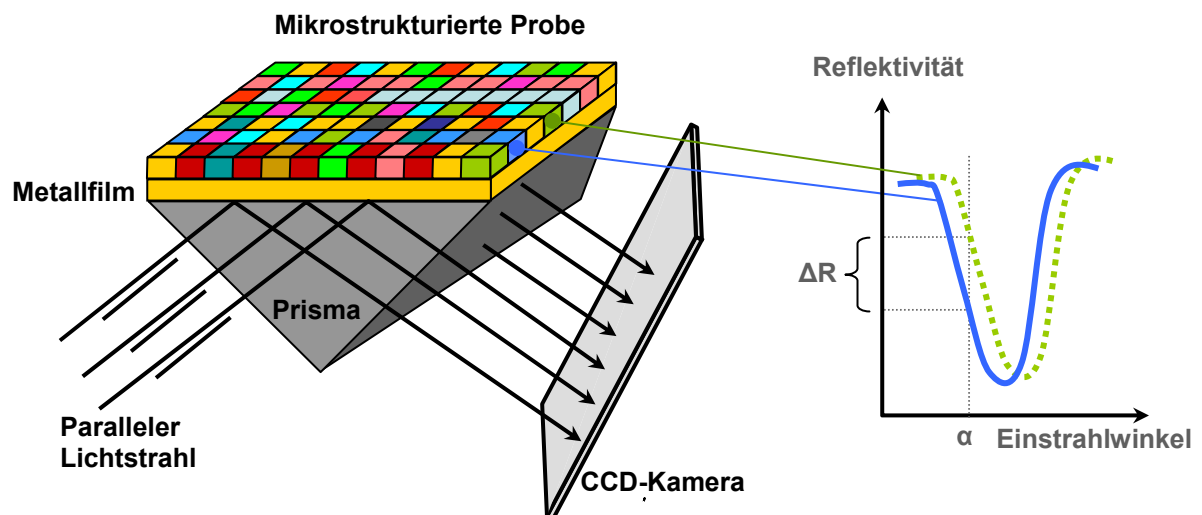


Abb. II.II.4-6: Ortsaufgelöste SPR-Spektroskopie an mikrostrukturierten Oberflächen (SPR-Imaging) durch Einsatz von CCD-Kameras.

außerdem über die Verwendung von CCD-Kameras, wobei monochromatisches Licht parallel unter einem konstanten Winkel α auf ein Prisma eingestrahlt werden und die Intensität des reflektierten Lichts ortsaufgelöst mit Hilfe einer CCD-Kamera detektiert wird [107]. Zur Verbesserung des Kontrastes wird diese Detektionsmethode auch im Interferenz-Modus durchgeführt (SPRI imaging = SPR Interferometry imaging).

Dagegen kann die (L)SPR optisch aktiver Nanopartikeloberflächen durch eine einfache Aufnahme von UV/Vis-Spektren beobachtet werden [100], [104], [147] (um die Messzeit zu verkürzen, empfiehlt sich allerdings auch hier der Einsatz von CCD-Kameras; selbst mit einem einfachen in Reflexionsgeometrie arbeitendem Faser-optischen Aufbau konnten auf diese Weise bereits Strukturen im μm -Bereich auf markierungsfreiem Wege visualisiert (s.

Kapitel IV.II Abs. 4 und Referenz [147]) und die jeweiligen Bindungsereignisse zudem auch quantifiziert werden (Kap. IV.II Abs. 4).

Die auf (L)SPR-beruhenden Sensoroberflächen stellen somit ein zukunftssträchtiges Instrument zur Integration in Bio-Chips dar (DNA-, Protein-Arrays); sie ermöglichen analog zur konventionellen SPR eine markierungsfreie und quantitative Echtzeitanalyse von Bindungsereignissen – die maximale laterale Auflösung liegt bei dieser Methode theoretisch in nm-Bereich.

4.4 Anforderungen zur Anwendung in der biomedizinischen Diagnostik

Neben einer entsprechenden Empfindlichkeit und einer hohen lateralen Auflösung erfordert ein erfolgreicher Einsatz der LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen in Array-basierten Ansätzen zur Wirkstoffsuche jedoch noch weitere Kriterien. Diese betreffen vor allem die Spezifität der beobachteten Wechselwirkungen sowie ihre Quantifizierung [182].

Eine eindeutige Identifizierung von Effektstoffen setzt die Spezifität der beobachteten Wechselwirkungen voraus. Weitere Schwerpunkte dieser Arbeit betrafen daher unter anderem die Erzeugung proteinresistenter Oberflächenbeschichtungen für die beschriebenen Sensoroberflächen, welche zum einen geeignete chemische Funktionalitäten zur Integration immunodiagnostisch genutzter Rezeptoren (z.B. Antikörper und Peptidpitope) aufweisen, in ihrer Anwendung jedoch unspezifische Bindungsereignisse (hauptsächlich Proteinadsorption) weitgehend unterdrücken. Diese können somit z.B. als Matrix zu einer Integration von Peptid-Arrays genutzt werden können.

4.4.1 Proteinresistente Oberflächenbeschichtungen

Die genaue Bestimmung kleiner molekularer Konzentrationen sowie die Verfolgung von Bindungsereignissen, welche sich durch nur geringe Affinitäten der beteiligten Bindungspartner zueinander auszeichnen, wird in der biomedizinischen Diagnostik wesentlich durch das Auftreten unspezifischer Adsorptionsprozesse behindert [182]. Eine mögliche Lösung dieses Problems stellt die Integration der verwendeten Rezeptoren in eine inerte Matrix, wie z. B. dünne Filme von Poly- [39] und Oligoethylenglykolen [183] dar.

Während die proteinresistenten Eigenschaften des PEGs allgemein auf sterische Repulsionskräfte zurückgeführt werden [184], ist das Vorliegen dieser Eigenschaften im Fall der OEGs immer noch nicht gänzlich geklärt [185].

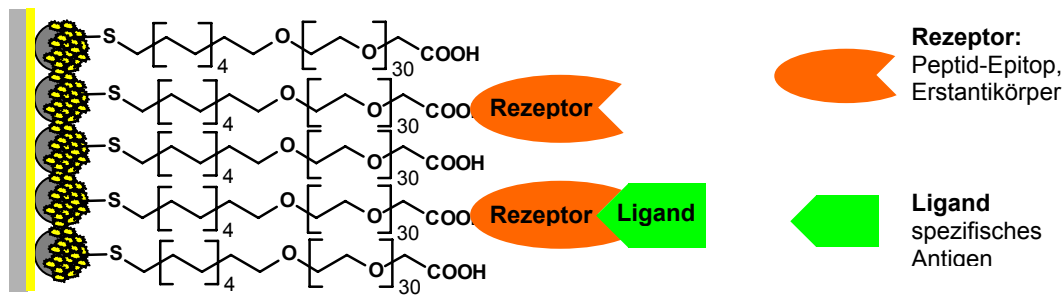


Abb. II.II.4-7: Beschichtung der Nanopartikeloberflächen mit proteinresistenten und endgruppenfunktionalisierten PEG-Matrices durch Ausbildung selbstaggregierender Monolagen und kovalente Integration immunodiagnostisch genutzter Rezeptoren.

Die meist genutzte Technik zur Integration biospezifischer Erkennungsmuster in PEG- bzw. OEG-terminierte Monolagen stellt eine Koadsorption binärer Misch-Lösungen, bestehend aus einem proteinresistenten (P)EG-Molekül und einer zweiten, als Rezeptor dienenden funktionalisierten Spezies dar [186]. Bioselektive Beschichtungen mit reduzierter nicht-spezifischer Adsorption können auf diese Weise z.B. durch eine Koadsorption von NH_2 - und OEG-terminierten Alkanthiolen und einer anschließenden kovalenten Antikörper-Bindung an die Aminogruppen hergestellt werden [187].

Alternativ dazu ist auch eine Kopplung von Rezeptoren an entsprechend endfunktionalisierte PEG-Moleküle möglich. In der Literatur ist mit einem carboxyfunktionalisiertem PEG-Thiol bereits eine Molekülklasse beschrieben worden [182], welche sowohl proteinresistente Eigenschaften als auch geeignete chemische Funktionalitäten für Kopplungsreaktionen aufweist. Von dieser Strategie ist auch in der vorliegenden Arbeit Gebrauch gemacht worden.

4.4.2 Quantifizierung biospezifischer Wechselwirkungen

Zur eindeutigen Charakterisierung biologischer Wechselwirkungssysteme reicht eine einfache qualitative Detektion von Bindungsereignissen allein jedoch nicht aus. Vielmehr ist man an quantitativen Aussagen interessiert, welche z.B. essentiell zur Bestimmung systemspezifischer Bindungs- und Dissoziationskonstanten sind [100], [118], [120], [144].

Ist durch eine Integration der Rezeptoren in eine proteinresistente Matrix die Spezifität der beobachteten Bindungseffekte gesichert, so ist zunächst nur eine der zwei grundsätzlichen Voraussetzungen zu einer Quantifizierung erfüllt. Eine quantitative Interpretation erfordert zudem eine genaue Analyse der Sensorantwort in dem betrachteten Bereich von Massenbelegungen bzw. eine Eichung [98], [117], [121], [171], [188] der verwendeten Detektionssysteme. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit betraf daher die Kalibrierung der verwendeten Sensoroberflächen; es wurden Sensitivitätsfaktoren ermittelt, mit Hilfe derer anhand

der beobachteten Resonanzverschiebung direkt auf die vorliegende Massenbelegung bzw. Schichtdicke der Adsorbatlage geschlossen werden kann.

II.III Grundlagen der analytischen Methoden

1 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

1.1 Prinzip

Wird eine Oberfläche mit Röntgenstrahlen der Energie $E = h\nu$ bestrahlt, so werden kernnahe Elektronen mit der Bindungsenergie E_B freigesetzt, wenn die Energie der Röntgenstrahlung größer ist als die Bindungsenergie (Photoeffekt) [189].

Die emittierten Elektronen besitzen nach der Einstein'schen Formel die kinetische Energie

$$E_{kin} = h\nu - E_B \quad (69)$$

Die freigesetzten Photoelektronen werden detektiert und ihre kinetische Energie gibt Aufschluss über die Bindungsenergie, die zur Freisetzung des Photoelektrons benötigt wurde [190].

1.2 Chemische Verschiebung

Die Ionisierungs- oder Bindungsenergie eines Elektrons ist nicht nur elementspezifisch (abhängig von der Kernladung bzw. Ordnungszahl), sondern wird auch von seiner chemischen Umgebung bestimmt. Elektronegative Elemente vermindern die Elektronendichte am Zentralatom, was zur Folge hat, dass die effektive Kernladung erhöht wird und die Bindungsenergie der Elektronen folglich ansteigt. Elektropositive Nachbaratome erniedrigen dagegen die effektive Kernladung und verursachen daher eine Verschiebung in Richtung niedrigerer Bindungsenergie. Die resultierende Änderung liegt in einem Bereich von einigen eV, weshalb es möglich ist, mithilfe der XP-Spektroskopie nicht nur das jeweilige Element zu bestimmen, sondern auch seine chemische Umgebung zu analysieren [191], [192].

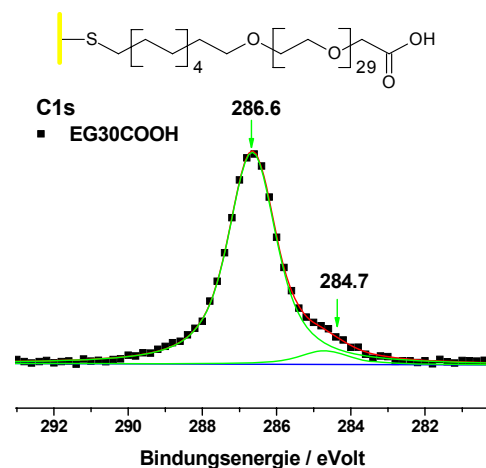


Abb. II.III.1-1: C1s-Detailspektrum einer adsorbierten EG30COOH-Monolage. Die C1s-Ether-Atome entsprechen der Signallage bei 286.6 eV; die C1s-Alkyl-Atome der Signallage bei 284.7 eV.

Dabei folgt aufgrund obiger Erläuterungen, dass Atome mit elektronegativeren Nachbaratomen bei niedrigerer kinetischer Energie, solche mit elektropositiveren Nachbaratomen hingegen bei höherer kinetischer Energie detektiert werden.

In der Abbildung II.III.1-1 ist das C1s-Detailspektrum der auf einem Gold-bedampften Si-wafer adsorbierten Thiolverbindung EG30COOH dargestellt.

Diese Monolage enthält Kohlenstoff in zwei verschiedenen chemischen Umgebungen. Der Peak bei geringerer Bindungsenergie (284,7 eV) entspricht den Alkyl-Kohlenstoffatomen, derjenige bei höherer Bindungsenergie (286,6 eV) den Ether-Kohlenstoffatomen.

1.2.1 Multiplett-Aufspaltung

In XP-Spektren treten sowohl Singulett- als auch Multiplett-Signale auf. Für das Auftreten von Multiplettstrukturen sind zwei Prozesse verantwortlich:

Spin-Bahn-Kopplung

Hier kommt es zu einer Wechselwirkung des Spins (s) eines ungepaarten, kernnahen Elektrons mit dem Bahndrehimpuls (l) des Orbitals. Der hieraus resultierende Gesamtbahndrehimpuls (j) ist durch $j = l + s$ gegeben [193].

Da der Elektronenspin sowohl parallel ($s = 1/2$) als auch antiparallel ($s = -1/2$) ausgerichtet sein kann, resultieren zwei unterschiedliche Energiezustände.

Das Intensitätsverhältnis dieser Signale wird durch die Besetzungswahrscheinlichkeit der verschiedenen Zustände bestimmt, welche wiederum durch die Multiplizität $M = 2j + 1$ beschrieben wird.

Für das Au4f Signal ergibt sich beispielsweise mit dem Bahndrehimpuls $l = 3$ ein Gesamtbahndrehimpuls von $j = 7/2$ bei paralleler und $j = 5/2$ bei antiparalleler

Ausrichtung des Elektronenspins s . Da es sich bei $j = 7/2$ und $j = 5/2$ um zwei verschiedene Energiezustände handelt, kommt es zu einer Dublettaufspaltung mit einem Intensitätsverhältnis von 4:3. Der energetische Unterschied beträgt in diesem Fall etwa 3.7 eV. Im Fall des S2p-Signals ergibt sich ein Dublett ($S2p_{3/2}$; $S2p_{1/2}$) mit einem Intensitätsverhältnis von 2:1.

Da die Stärke der Spin-Bahn-Kopplung mit der Ordnungszahl Z der Atome ($\propto Z^4$) zunimmt, wird sie auch als Schweratom-Effekt bezeichnet [194].

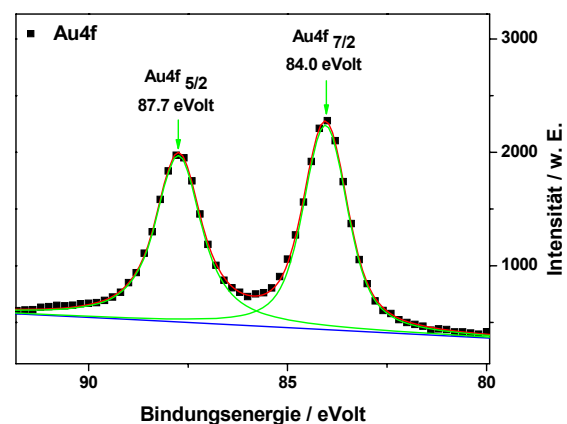


Abb. II.III.1-2: Die Spin-Bahn-Kopplung führt zu einer Aufspaltung des Au4f-Signals in ein Dublett mit einem Intensitätsverhältnis von $Au4f_{5/2} : Au4f_{7/2} = 3 : 4$.

Spin-Spin-Kopplung

Dieser Effekt tritt nur bei Atomen oder Molekülen auf, die im Grundzustand paramagnetisch sind. Es kommt zu einer Wechselwirkung zwischen einem ungepaarten Elektron aus einem Valenzorbital und einem ungepaarten Rumpfelektron, das durch die Photoemission entstanden ist. Sie führt wiederum zu mehr als einem Energiezustand und somit zur Signal-Aufspaltung.

1.3 Quantitative Analyse

Neben einer qualitativen Analyse kann die XP-Spektroskopie auch zu einer quantitativen Analyse der Zusammensetzung von Festkörper-Oberflächen herangezogen werden [195]. Unter der Annahme, dass der Wirkungsquerschnitt eines Rumpfelektrons (der ein Maß für die Ionisationswahrscheinlichkeit ist; Ionisations-Wirkungsquerschnitt) unabhängig vom Valenzzustand des Elements ist (Koopmann'sches Theorem), verhält sich die Signalintensität I_i eines Elements i proportional zu dessen Anteil in der Probe. Einen quantitativen Zugang zu der Messgröße der Signalintensität gibt folgender Ausdruck:

$$I_i = \sigma_i(h\nu) \cdot D(E_i) \int_{\gamma=0}^{\pi} \gamma \int_{\phi=0}^{2\pi} \phi \cdot L_i(\gamma) \int_x \int_y J_0(x, y) T(x, y, z, \phi, E_i) \cdot \int_z N_i(x, y, z) \cdot \exp[-d / \lambda_i(E_i) \cos \theta] dx dy dz d\phi d\gamma \quad (70)$$

$\sigma_i(h\nu)$	Wirkungsquerschnitt für die Emission eines Photoelektrons
$D(E_i)$	Empfindlichkeit des Detektors
E_i	Energieniveau des Rumpfelektrons
γ	Winkel zwischen Einfall- und Ausgangsrichtung der Röntgenstrahlung
ϕ	Azimutwinkel (für die Rotation um die Analysatorachse)
$L_i(\gamma)$	Winkelabhängigkeit der Photoemission (berücksichtigt die räumliche Ausdehnung der Orbitale)
$J_0(x, y)$	Fluss der Primärelektronen auf der Oberfläche xy
x, y, z	kartesische Koordinaten der Probenoberfläche
T	Transmission des Energieanalysators
$N_i(x, y, z)$	Teilchendichte von i an der Stelle x, y, z
d	Dicke der vermessenen Schicht
λ_i	Abschwächungslänge der Photoelektronen
θ	Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Analysatorachse

Der Wirkungsquerschnitt σ_i und die Abschwächungslänge λ_i sind element- und energieabhängig. Der Wirkungsquerschnitt stellt die Ionisierungswahrscheinlichkeit der Atome dar. Als Abschwächungslänge oder mittlere freie Weglänge bezeichnet man den Weg, den das Elektron im Mittel zurücklegt, bevor es durch inelastischen Stoß zu einem Energieverlust und einer Richtungsänderung kommt.

Da einige Parameter nur schwer zugänglich sind (z.B. Detektorempfindlichkeit $D(E_i)$ oder der Photonenfluss J_0) ist die aufgeführte Gleichung für eine numerische Auswertung zu komplex. Eine Vereinfachung ergibt sich aber insofern, als dass diese Variablen konstant gehalten werden [196].

Die Einflüsse der räumlichen Ausdehnung der Atomorbitale L_i und des Öffnungswinkels des Analysators φ können auf Grund ihrer Geringfügigkeit vernachlässigt werden. Die Integration über x und y vereinfacht sich, weil die bestrahlte Fläche relativ groß ist und gleichmäßig ausgeleuchtet wird. Unter der Annahme, dass die Photoelektronen unter den gleichen Bedingungen gemessen werden, kann mit relativen anstatt von absoluten Signalintensitäten gerechnet werden. In der Praxis arbeitet man nur mit relativen Intensitäten, da die XPS-Rohdaten bezüglich der apparativen Gegebenheiten des jeweiligen Spektrometers normiert werden, um auch mit Spektren verglichen werden zu können, die an anderen Geräten aufgenommen wurden. Hierzu wird das gemessene Spektrum durch ein Normspektrum geteilt. Unter diesen Voraussetzungen ergibt sich nach der Integration eine einfachere Gleichung für die Signalintensität:

$$I_i = \sigma_i \cdot N_i \cdot \lambda_i \cdot T(E_i) [1 - \exp(-d / \lambda_i \cos \theta)] \quad (71)$$

Der Faktor $[1 - \exp(-d/\lambda_i \cos \theta)]$ folgt aus der Summation über alle Atome der Schicht mit der Dicke d von $d_A = 0$ bis $d_E = d$. Die Werte für den Wirkungsquerschnitt σ_i und die Abschwächungslänge λ_i können der Literatur entnommen werden [197], [198]; die in dieser Arbeit verwendeten Werte sind im Experimentellen Teil (s. Tab. III.3-2) aufgeführt.

Die Detektionswahrscheinlichkeit von Elektronen unterschiedlicher Energie wird durch die Transmissionsfunktion $T(E_i)$ berücksichtigt und muss für jede XPS-Anlage nur einmal ermittelt werden, solange an der apparativen Anordnung nichts verändert wird.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt die Intensitätsabnahme elektromagnetischer Strahlung beim Durchdringen von Materie definierter Zusammensetzung und Dicke:

$$I_x = I_x^0 \cdot e^{-\varepsilon d} \quad (72)$$

I_x	Intensität nach der Transmission
I_x^0	Intensität vor der Transmission
ε	Absorptionskonstante des Mediums

- c Konzentration der detektierten Spezies
- d Schichtdicke der Spezies

Da die Abschwächung der Photoelektronen auf ihrem Weg durch den Festkörper ebenfalls einer exponentiellen Abhängigkeit folgt, kann das Lambert-Beer'sche Gesetz auch auf die Photoelektronen-Abschwächung übertragen werden; aus dieser Kombination erhält man den folgenden Ausdruck:

$$I_i = I_i^0 \cdot e^{-d / \lambda \cdot \cos\theta} \tag{73}$$

wobei gilt: $I_i^0 = \sigma_i \cdot N_i \cdot \lambda_i(E_i)$ (74)

In dieser Gleichung steht I_i^0 für die Signalintensität einer unendlich dicken Referenzprobe der Reinsubstanz, d für die Dicke der abschwächenden Schicht, θ für den Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Analysatorachse und λ für die Abschwächungslänge. Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Messungen betrug θ durchweg 0° , so dass der Ausdruck $\cos\theta$ wegfällt.

1.3.1 Schichtdickenbestimmung

Anhand der Gleichung (72) kann die Schichtdicke der abschwächenden Schicht d berechnet werden, welche die Signalintensität des Substrates i mindert [199]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Trägersystemen handelt es sich um Gold-Substrate, so dass $i = Au$ gesetzt wird:

$$d = \lambda_{Au} \ln \frac{I_{Au}^0}{I_{Au}} \tag{75}$$

- I_{Au}^0 Au-Intensität des unfunktionalisierten Goldträgers
- I_{Au} Au-Intensität des beschichteten Goldträgers
- λ_{Au} Abschwächungslänge von Gold (36.9 Å für aliphatische Adsorbatlagen)

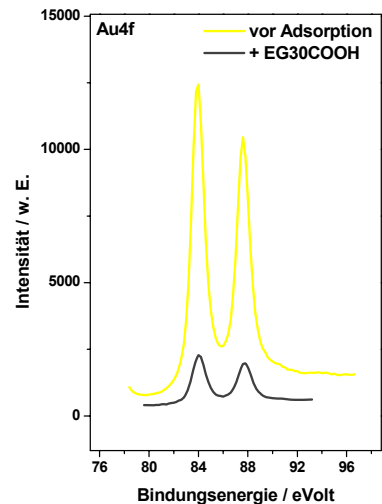


Abb. II.III.1-3: Au4f-Detailspektren eines Au-bedampften Si-wafers. Aufgenommen vor (gelb) und nach Adsorption von EG30COOH (schwarz).

1.3.2 Molekulare Zusammensetzung der Adsorbatschicht

Zur Untersuchung verschiedener Molekülspezies auf Oberflächen existieren zwei Modelle, welche die Grenzfälle der möglichen Molekülanordnungen beschreiben:

Schichtmodell:

Grundlage dieses Modells ist eine streng geordnete, dicht gepackte Schicht aus chemisorbierten Molekülen, welche eine gleiche Ausrichtung und Anordnung haben [200]. Auf diese Methode wird hier nicht näher eingegangen, da sie in der vorliegenden Arbeit keine Verwendung fand.

Statistisches Modell:

Sind zwei Elemente A und B statistisch und homogen auf einem Substrat verteilt, so können die Intensitätsverhältnisse der Signale dieser beiden Elemente über die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{\sigma_B}{\sigma_A} \cdot \frac{\lambda_B}{\lambda_A} \quad (76)$$

Soll beispielsweise die C:O-Stöchiometrie einer Schicht bestimmt werden, so setzt man in diese Gleichung A = C und B = O, sowie die aus der Literatur bekannten Werte für die Abschwächungslänge λ und die Wirkungsquerschnitte σ ein.

2 Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie (IRRAS)

Bei der IRRAS wird Licht im infraroten Spektralbereich von zirka 800 bis 4000 cm^{-1} durch die zu untersuchende Probe gestrahlt. Die Wechselwirkung des Lichts mit den Dipolen der Moleküle führt zu Vibrationsübergängen und somit zur Absorption des IR-Lichts. Die Absorptionsmaxima sind charakteristisch für bestimmte Molekülschwingungsübergänge und erlauben daher eine Zuordnung zu bestimmten funktionellen Gruppen und eine Bestimmung der Orientierung.

Die IRRAS ist eine Variante der Infrarotspektroskopie, bei der die IR-Strahlung an der Oberfläche reflektiert wird und dabei mit den auf der Oberfläche adsorbierten Molekülen in Wechselwirkung tritt. Diese Anwendung erfordert eine hohe Reflektivität, um ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten; daher werden im Allgemeinen nur Metalloberflächen mit dieser Methode untersucht.

2.1 Grundlagen der IR-Spektroskopie

Zur Beschreibung von Molekülschwingungen kann das Modell eines harmonischen Oszillators herangezogen werden. Werden die Atome aus ihrer Ruhelage um den Betrag r ausgelenkt, so resultiert eine zu dieser Auslenkung proportionale Rückstellkraft $F = -kr$, die zu einer Schwingung führt. Die Federkonstante k ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen den Atomen und gibt daher spezifische Informationen über Atomgruppen im Molekül. Das dazugehörige Potential entspricht einer Parabel.

$$V(r) = 1/2 \cdot k \cdot r^2 \quad (77)$$

Durch Lösen der Bewegungsgleichung kann die Schwingungsfrequenz berechnet werden:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}; \quad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \quad (78)$$

μ steht in dieser Gleichung für die reduzierte Masse, welche im einfachen Fall eines zweiatomigen Moleküls mit den Atommassen m_1 und m_2 nach der Gleichung (78) berechnet werden kann.

Die Gesetze der Quantenmechanik erlauben nur diskrete Schwingungsenergien. Im Fall des harmonischen Oszillators sind dies die Energieeigenwerte E_n , die sich aus der Lösung der Schrödinger-Gleichung ergeben:

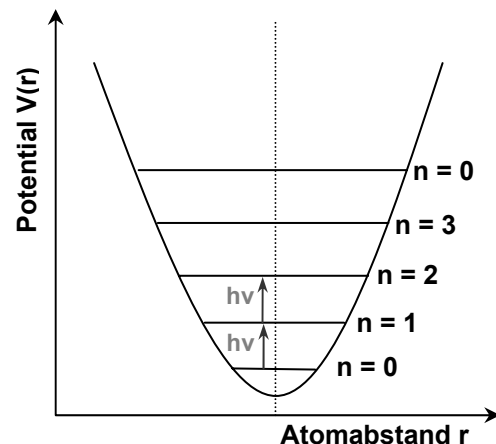


Abb. II.III.2-1 Potentialverlauf in Abhängigkeit vom Atomabstand r nach dem Modell des harmonischen Oszillators.

$$E_n(\nu) = \left(n + \frac{1}{2}\right) \cdot h\nu \quad ; \quad n \in \{0,1,2,\dots\} \quad (79)$$

Aus der Quantentheorie ergibt sich außerdem die Auswahlregel für mögliche Übergänge zwischen den Energieniveaus E_n ; demnach sind nur Übergänge mit $\Delta n = \pm 1$ erlaubt.

Je stärker die chemische Bindung gedehnt und gestaucht wird, desto weniger gilt allerdings noch die Annahme einer harmonischen Rückstellkraft. Das wirkliche Potential ist asymmetrisch: Innen steil, weil sich die Elektronenhüllen gegenseitig abstoßen und außen flach, weil die Bindungskraft mit wachsendem Kernabstand abnimmt. Zur mathematischen Beschreibung der realen, anharmonischen Potentialkurve einer chemischen Bindung kann die von Morse in einem empirischen Ansatz entwickelte Morse-Funktion herangezogen werden.

Die Zahl der möglichen Schwingungsmoden nimmt mit der Zahl der Atome zu. Bei linearen Molekülen mit N Atomen treten $3N-6$ und bei gewinkelten Molekülen $3N-5$ Normalschwingungen auf. Diese können in die zwei Gruppen der Valenz- und der Deformationsschwingungen eingeteilt werden. Bei Valenzschwingungen ändert sich die Länge der Bindungen; Deformationsschwingungen sind hingegen mit einer Änderung des Bindungswinkels verbunden. Die Schwingungen sind in den meisten Fällen miteinander gekoppelt, so dass es zu Verschiebungen der Resonanzfrequenz kommt, die nicht exakt berechnet werden können. Deshalb können für Schwingungen von Atomgruppen lediglich charakteristische Frequenzbereiche angegeben werden.

Zur Änderung eines Schwingungszustandes mit Hilfe von IR-Strahlung kann es jedoch nur kommen, wenn sich bei der Schwingung das Dipolmoment des Moleküls ändert und das IR-Licht eine Schwingungskomponente in Richtung der Dipolmomentänderung besitzt [201]. Ändert sich das Dipolmoment bei der Schwingung nicht, muss die Raman-Spektroskopie verwendet werden.

2.1.1 IR-Spektroskopie an Metalloberflächen

Bei der IRRAS wird das eingestrahlte IR-Licht an der Oberfläche reflektiert und führt zu einer Wechselwirkung mit den auf der Oberfläche adsorbierten Molekülen.

Neben der notwendigen Änderung des Dipolmoments gibt es bei der IR-Spektroskopie an Metalloberflächen noch eine 2. Auswahlregel, die auf dem Spiegelladungsprinzip basiert. Das mit dem einfallenden Licht

verbundene elektrische Feld \vec{E} tritt in Wechselwirkung mit den frei beweglichen Elektronen des Metalls und induziert in

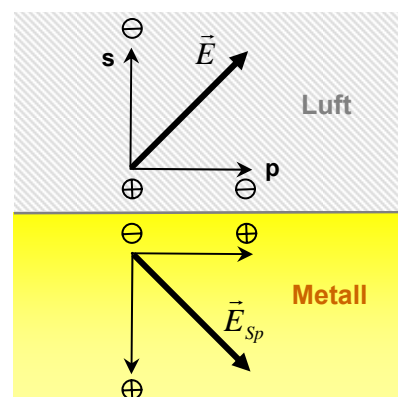


Abb. II.III.2-2 Schematische Darstellung des „Spiegelladungsprinzips“ an einer Metalloberfläche: die s-Komponente wird abgeschwächt, die p-Komponente hingegen erhöht.

diesem ebenfalls ein elektrisches Feld \vec{E}_{sp} . Dieses induzierte Feld führt dazu, dass die s-Komponente des eingestrahlten Feldes auf nahezu Null abgeschwächt wird, die p-Komponente jedoch verstärkt wird [200].

Dies hat zur Folge, dass sich bei IRRAS-Messungen Schwingungen wesentlich einfacher messen lassen, wenn sich das Dipolmoment dabei nicht parallel, sondern senkrecht zur Oberfläche ändert. Die Intensität I_z der Schwingung eines Adsorbatsmoleküls ist daher proportional zum Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments μ und dem Kosinus des Winkels θ zwischen der Richtung des Übergangsdipolmoments und der Oberflächennormalen:

$$I_z \propto |\mu \cdot \cos \theta|^2 \quad (80)$$

Diese Abhängigkeit führt dazu, dass mit Hilfe der IRRAS Informationen über die Ordnung und Orientierung der auf der Metalloberfläche adsorbierten Moleküle gewonnen werden können.

3 Spektrale Ellipsometrie (SE)

Bei der spektralen Ellipsometrie (SE) wird die Änderung des Polarisationszustands von parallel und senkrecht polarisiertem Licht, sowie die Differenz der Phasenverschiebung des parallel und senkrecht polarisierten Lichts bei der Reflexion an einem dünnen Film zur Bestimmung der Schichtdicke und des Brechungsindex dieses Films genutzt [202], [203].

Hierzu wird Licht bekannter Polarisation, üblicherweise linear polarisiertes Licht, auf die Oberfläche gestrahlt und mit einem Detektor die Polarisations- und Intensitätsänderung des reflektierten Strahls gemessen. Der Name der Methode ist darauf zurückzuführen, dass das reflektierte Licht im Allgemeinen elliptisch polarisiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ellipsometrie bei bekannten Brechungsindices des Oberflächensystems zur Bestimmung der Schichtdicke ultradünner Filme angewendet.

In der Abbildung II.III.3-1 ist der schematische Aufbau des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Spektral-Ellipsometers dargestellt.

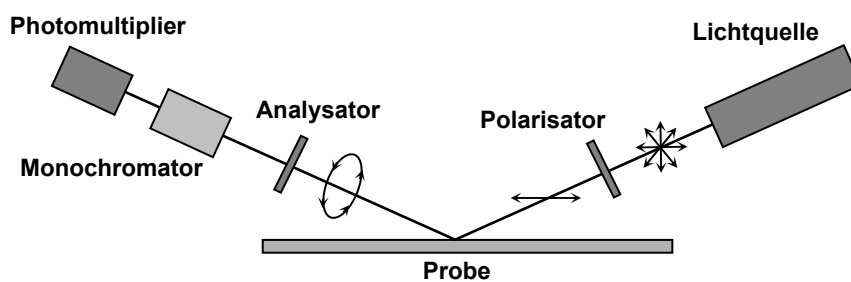


Abb. II.III.3-1: Schematischer Aufbau des verwendeten Spektralen Ellipsometers.

Das von einer Xenon-Hochdrucklampe erzeugte Licht trifft nach Durchlaufen des Polarisators auf die Probe. Es wird von dieser reflektiert und nach Durchlaufen des Analysators auf den Eingangsspalt des Monochromators geleitet, um die Wellenlängenselektion durchzuführen. Die Detektion findet mit einem Sekundärelektronenvervielfacher statt.

An der Grenzfläche werden die einzelnen Photonen entweder reflektiert oder gebrochen. Im Fall der Reflexion entspricht der Einfallswinkel dem Ausfallswinkel; für den Strahlteil, der gebrochen wird, gilt das Snellius'sche Gesetz. Das Verhältnis der Amplituden aus reflektiertem und einfallendem Strahl an einer Grenzfläche r_{12} lässt sich mit Hilfe der Fresnel'schen Reflexionskoeffizienten r_{12} berechnen.

Bei Schichtsystemen (wie in Abb II.III.3-2 dargestellt) müssen zur Berechnung der Reflektivität jedoch noch die Beiträge berücksichtigt werden, die durch Mehrfachreflexion an den einzelnen Grenzflächen zurückreflektiert werden. Die Reflektivität ergibt sich aus der Addition der zurückreflektierten Teilstrahlen, wobei für jeden Strahl die Abnahme des elektrischen Feldes bei jeder Reflexion mit Hilfe des ent-

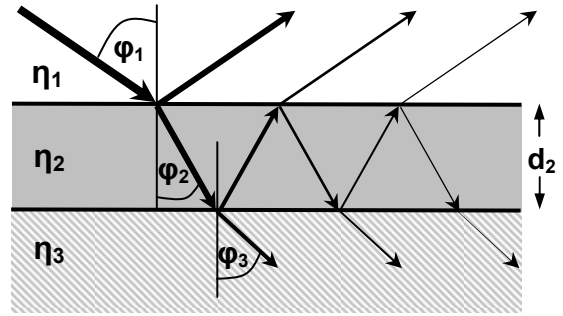


Abb. II.III.3-2: Strahlengang bei Lichteinstrahlung an einem Mehrschicht-System. An jeder Grenzschicht treten Reflexion und Absorption auf; nach [203].

sprechenden Fresnelkoeffizienten berechnet wird. Des Weiteren muss noch der Gangunterschied durch den längeren Weg in der Zwischenschicht (Schichtdicke d_2) als Phasenunterschied zwischen den Teilstrahlen berücksichtigt werden.

Die totalen Reflexionskoeffizienten sind mit dem komplexen Brechungsindex (s. Gleichung (14)) und der Schichtdicke der Zwischenschichten (hier der Zwischenschicht 2 = Adsorbatschicht = d_2) verknüpft und geben das Verhältnis von elektrischer Feldstärke des reflektierten zum ankommenden Strahl an. Für das in Abb II.III.3-2 dargestellte Schichtsystem lauten die totalen Reflexionskoeffizienten r der s- und p-polarisierten Komponente des elektrischen Feldes analog zu Gleichung (14)

$$r^p = \frac{E_r^p}{E_0^p} = \frac{r_{12}^p + r_{23}^p \cdot e^{i \cdot 2k_{z2} \cdot d_2}}{1 + r_{12}^p \cdot r_{23}^p \cdot e^{i \cdot 2k_{z2} \cdot d_2}} \quad r^s = \frac{E_r^s}{E_0^s} = \frac{r_{12}^s + r_{23}^s \cdot e^{i \cdot 2k_{z2} \cdot d_2}}{1 + r_{12}^s \cdot r_{23}^s \cdot e^{i \cdot 2k_{z2} \cdot d_2}} \quad (81)$$

Für k_{z2} gilt nach den Maxwell-Gleichungen (vgl. Gleichung (3)) und der geometrischen Betrachtung:

$$k_z = \frac{\omega}{c} \cdot \tilde{\eta}_2 \cdot \cos \phi_2 = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \tilde{\eta}_2 \cdot \cos \phi_2 \quad (82)$$

Der komplexe Brechungsindex $\tilde{\eta}$ ist nach (41) definiert; d_2 bezeichnet die Schichtdicke der Zwischenschicht 2.

In Ellipsometrie-Messungen wird eine Größe $\tan \psi$ eingeführt, die dem Quotienten der Beträge der Reflexionskoeffizienten für die p- und s-Komponente entspricht [202]:

$$\tan \psi = \frac{|r_p|}{|r_s|} \quad (83)$$

Über die Polarisation des reflektierten Strahls kann auch der vor (δ_1) und nach der Reflexion (δ_2) an einem Mehrschicht-System auftretende Phasenunterschied zwischen der p- und s-

Welle ermittelt werden; dieser wird in Ellipsometrie-Messungen mit dem Winkel Δ bezeichnet [202]:

$$\Delta = \delta_1 - \delta_2 \quad (84)$$

Die Größen ψ und Δ sind die so genannten ellipsometrischen Winkel und werden mit dem beschriebenen Messverfahren ermittelt; um den Winkel ψ wird die Polarisationssebene gedreht. Insgesamt sind diese Größen folgendermaßen mit den Fresnel'schen Reflexionskoeffizienten verknüpft:

$$\tan \psi \cdot e^{i\Delta} = \frac{|r_p|}{|r_s|} \cdot e^{i(\delta_1 - \delta_2)} = \frac{r_p}{r_s} \quad (85)$$

Diese Gleichung wird auch als fundamentale Gleichung der Ellipsometrie bezeichnet.

3.1 Auswertung der Ellipsometrie-Messungen

Verwendet wurde in dieser Arbeit ein spektrales Ellipsometer (SE), bei dem mit einem festen Einfallswinkel in spektraler Auflösung (es werden 44 verschiedene Wellenlängen im sichtbaren Bereich des Lichts vermessen) gemessen wurde. Als Substrat dienten Gold-bedampfte Si-wafer, auf denen die jeweiligen Adsorbatlagen (Zwischenschicht) aufgebracht wurden.

Die Unbekannten in der Fundamentalgleichung der Ellipsometrie sind die Variablen der totalen Reflexionskoeffizienten, d.h. der Einfallswinkel des Lichts, die Brechungsindices η und Extinktionskoeffizienten κ aller optischen Medien und die Dicken der Zwischenschichten.

Zur Bestimmung von Schichtdicken ultradünner Filme wird zunächst der Einstrahlwinkel bestimmt, indem ein Substrat mit bekanntem Brechungsindex bei verschiedenen Wellenlängen vermessen wird und die Daten über nicht-lineare Regression angepasst werden. Die optischen Konstanten des verwendeten Goldsubstrats können vor der Beschichtung bestimmt werden. Da Gold stark absorbiert, können die darunter liegenden Schichten, wie der zur Adhäsionsverbesserung eingesetzte Titanfilm und das Siliziumsubstrat vernachlässigt werden.

Um die Schichtdicken dünner organischer Filme an Luft durch Anpassung an die Messdaten zu erhalten, wird bei bekannten optischen Eigenschaften des Substrats nun nur noch der Brechungsindex des Films benötigt. Bei Messung in spektraler Auflösung kann dieser durch eine Anpassung der Daten nach der Cauchy-Funktion ermittelt werden [204]:

$$\eta(\lambda) = \eta_0 + \frac{A}{\lambda^2} + \frac{B}{\lambda^4} \quad (86)$$

Die Cauchy-Funktion kann den Brechungsindex gut beschreiben, solange es keine störenden elektronischen Resonanzen und folglich vernachlässigbare Absorption der zu untersu-

chenden Verbindung im fraglichen Spektralbereich gibt. η_0 ist der Brechungsindex für den Grenzfall großer Wellenlängen und A und B sind die Cauchy-Koeffizienten.

Da eine analytische Lösung der Fundamentalgleichung nicht möglich ist, erfolgt die Schichtdickenbestimmung über nicht-lineare Regression. Hierzu werden die bei den verschiedenen Wellenlängen ermittelten ψ - und Δ -Werte mit Hilfe der zuvor ermittelten Parameter (Einfallswinkel, optische Eigenschaften des Substrats) an die Fundamentalgleichung angepasst [203].

4 Immunoassays

Unter einem Immunoassay versteht man ein immunanalytisches Nachweis- oder Testverfahren zur Detektion von Biomolekülen. Alle Immunoassays beruhen auf der spezifischen Reaktion eines Antigens (Ligand) mit einem korrespondierenden Antikörper (Rezeptor) [205], [206], [207].

Antikörper und Antigene

Bei den Antigenen kann es sich z.B. um Proteine, Viren, aber auch niedermolekulare Verbindungen, wie Hormone, Toxine und Pestizide in einer Probe (Blutserum, Milch, etc.) handeln. Dringen diese als Fremdsubstanzen in den Körper, so werden vom Immunsystem der Wirbeltiere zur Infektionsabwehr bestimmte Proteine gebildet, die diese Antigene spezifisch binden; diese Proteine werden als Antikörper bezeichnet.

Die Antigen-bindenden Stellen befinden sich in den variablen Domänen eines Antikörpers (s. Abb. IV.II.3-8); in jeder V-Region gibt es drei Bereiche mit hypervariabler Aminosäuresequenz (complementarity determining regions, CDR), die aus ca. 50 Aminosäuren bestehen und die Region des Antikörpers bilden, an welcher das Antigen spezifisch gebunden wird (Paratop). Der entsprechende komplementäre Bereich des Antigens, der vom Paratop erkannt wird, heißt antigene Determinante oder Epitop.

Varianten

Im Prinzip macht man sich in diesen Assays somit die Eigenschaft der Antikörper zu Nutze, einen nachzuweisenden Stoff (Antigen), der auch als Analyt bezeichnet wird, spezifisch zu binden.

Entsprechend ihres Detektionsprinzips können Immunoassays in markierungsfreie und unter Verwendung von bestimmten Markierungen oder Markermolekülen durchgeführte Varianten unterteilt werden. Bei den markierungsfreien Assays wird die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung unmittelbar, z.B. über eine Brechungsindexänderung oder eine Eigenfluoreszenz des Analyten direkt detektiert, bei den nicht-markierungsfreien Assays hingegen durch Einsatz bestimmter Marker. In den ersten Immunoassays wurden radioaktive Markierungen (Radioimmunoassay – RIA) eingeführt; heute werden unter anderem auch Fluorophore, Gold-Nanopartikel und Enzyme (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (EIA); englisch: Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA); s. folgender Abschnitt) zur Markierung verwendet [206], [208]. Die auf einer Radioaktivitätsmessung beruhenden Radioimmunoassays sind dabei etwa 1000fach empfindlicher als die auf einer Enzym-Markierung beruhenden. Letztere basieren auf einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion, die photometrisch verfolgt und quantifiziert werden kann.

Weiterhin kann zwischen direkten und indirekten Verfahren unterschieden werden. In direkten Assays werden nur ein Antikörper und ein Antigen verwendet und diese Umsetzung ohne weitere Bindungsschritte „direkt“ detektiert. Markierungsfreie Immunoassays sind daher auch immer direkte Assays; handelt es sich hingegen um einen nicht-markierungsfreien Assay, so muss im „direkten Fall“ entweder das Antigen oder der Antikörper markiert sein. Die indirekten Verfahren beinhalten dagegen stets eine Markierung. Neben Antigen und Antikörper wird ein zweiter markierter Antikörper oder ein zweites markiertes Antigen eingesetzt, die wiederum an das Antigen bzw. den Antikörper binden. Je nachdem, ob dieser zweite Bindungsschritt eine Konkurrenzreaktion um eine Bindungsstelle darstellt oder verschiedene Epitope gebunden werden, wird zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Assays unterschieden. Werden unterschiedliche Epitope gebunden, so kommt es bei dieser Art der Durchführung zur Ausbildung einer Sandwich-Struktur, die sich aus den einzelnen Bindungspartnern zusammensetzt; der Assay wird dann auch als Sandwich-Assay bezeichnet.

Des Weiteren können Immunoassays in heterogener und homogener Form durchgeführt werden. Bei den heterogenen Immunoassays ist entweder das Antigen oder der Antikörper an eine feste Trägersubstanz immobilisiert (Festphasen-Immunoassays). Homogene Assays werden hingegen in Lösung durchgeführt.

Wie oben bereits erläutert wurde, kann weiterhin zwischen kompetitiven und nicht-kompetitiven Assays unterschieden werden [209]. In der nicht-kompetitiven Durchführung wird die Bindung zwischen Antikörper und Antigen durch einen markierten Zweitantikörper nachgewiesen. Der primäre und der markierte Zweitantikörper binden hierbei an unterschiedliche Epitope des Antigens und treten somit nicht in Konkurrenz; es kommt zur Ausbildung einer Sandwich-Struktur. In der kompetitiven Form hingegen konkurrieren das nachzuweisende Antigen (der Analyt) und ein zusätzlich zugegebenes markiertes Zweitantigen um die Bindungsstelle des Antikörpers (s. Abschnitt 4.1).

Allgemein kann festgestellt werden, dass markierungsfreie Varianten – wie z.B. die in dieser Arbeit auf LSPR-aktiven Trägersubstanzen durchgeführten heterogenen Immunoassays – aus mehreren Gründen zu bevorzugen sind. Zum einen sind diese Verfahren immer direkt; zur Detektion der spezifischen Bindung ist daher kein zusätzlicher Bindungsschritt, der eine Markierung einführt und mit zusätzlichen Waschschritten und somit ggf. auch Probenverlusten verbunden ist, erforderlich. Gegenüber nicht-markierungsfreien direkten und indirekten Assays entfällt daher der Aufwand einer Markierung und somit auch eine mögliche Beeinflussung der Bindungskinetik durch die Einführung des Markers.

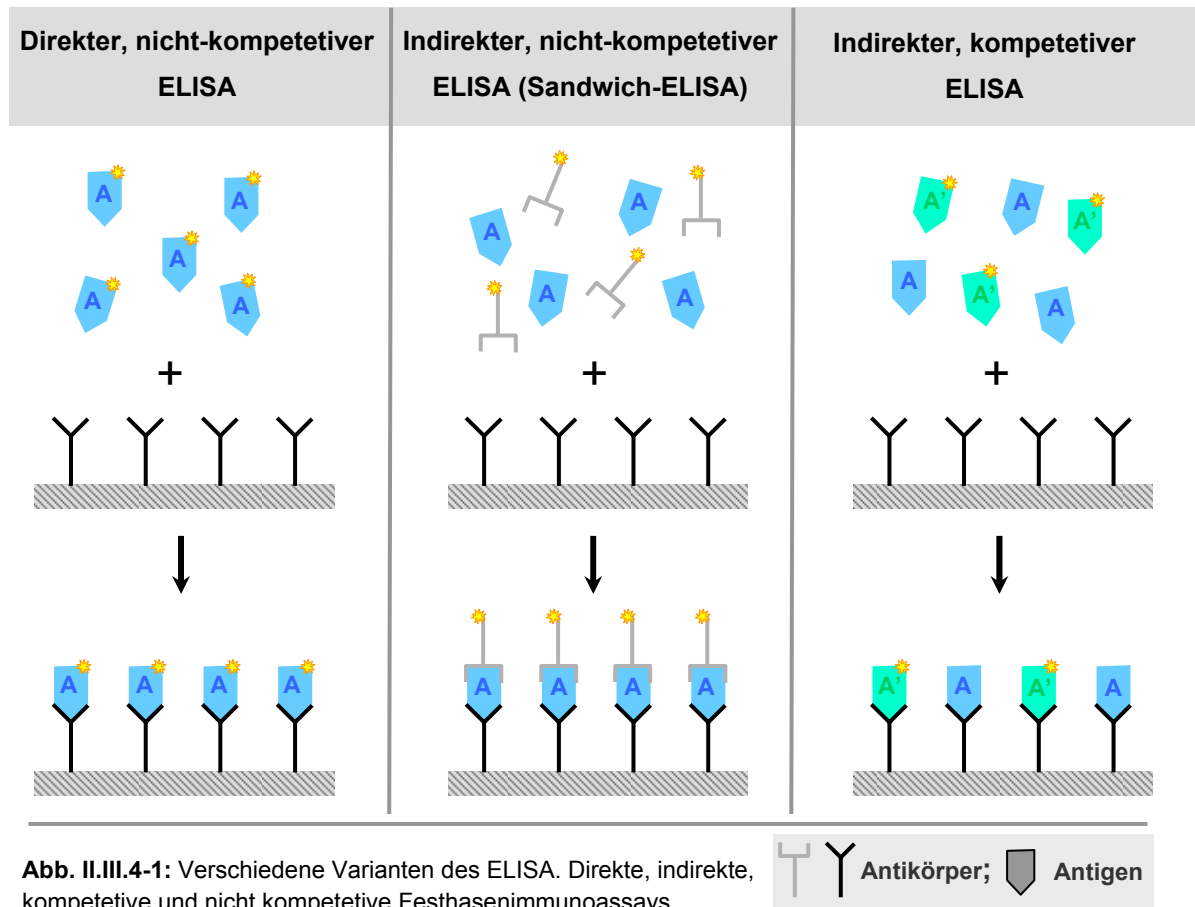
4.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA bezeichnet ein immunologisches Nachweisverfahren, bei der die spezifische Bindung zwischen Antigen und Antikörper mittels einer Enzymmarkierung nachgewiesen wird, die eine photometrisch detektierbare Farbreaktion katalysiert. In vielen Anwendungen werden zur Enzymmarkierung die Meerrettichperoxidase (HRP) und die Alkalische Phosphatase (AP) eingesetzt. Die AP spaltet den Phosphatrest vom farblosen Nitrophenylphosphat ab, so dass das schwach gelb gefärbte p-Nitrophenol entsteht. Die HRP hingegen katalysiert die Oxidation des Substrates 2,2'-Azino-di(ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) zu einem leicht grün gefärbten Radikalkation. Der ELISA fällt somit in die Klasse der nicht-markierungsfreien Immunoassays [209].

Er stellt zudem einen Festphasenimmunoassay dar, bei dem die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten spezifischen Antikörper (bzw. bei einer Antikörperbestimmung das jeweilige Testantigen) an einer Trägersubstanz gebunden vorliegen. Als feste Träger werden unter anderem Nitrocellulose, Polyvinylchlorid und Nylonmembranen verwendet.

Bei diesen Anwendungen ist zu beachten, dass das Enzym als Katalysator wirkt und somit über einen gewissen Zeitraum hinweg das gesamte Substrat zum Farbstoff umsetzen kann. Alle Proben hätten dann die gleiche optische Dichte und eine Quantifizierung wäre nicht mehr möglich. Die Reaktion muß daher nach einer gewissen Zeit, wenn gute Kontraste sichtbar sind, abgebrochen werden. Im Fall der HRP-katalysierten Reaktion wird das Enzym z.B. durch Zugabe einer 2%-igen Oxalsäurelösung zerstört und anschließend die optische Dichte bestimmt. Die Quantifizierung erfolgt anhand einer Eichgerade, die man durch Verdünnung eines Standards bekannter Konzentration erstellen kann.

Entsprechend der obigen Klassifikation ist der ELISA somit ein heterogener, nicht-markierungsfreier Immunoassay. Je nach der Problemstellung wird der ELISA in verschiedenen Varianten durchgeführt, die weiter oben bereits vorgestellt wurden; so gibt es direkte und nicht-direkte sowie kompetitive und nicht-kompetitive ELISA-Anwendungen (s. Abbildung II.III.4-1).



Ein direkter, nicht-kompetitiver ELISA wird u.a. in Labors eingesetzt, die sich mit der Herstellung von monoklonalen Antikörpern beschäftigen. Das Antigen (A) liegt hier in reiner Form vor und lässt sich dadurch leicht mit einem Enzym markieren. In der Durchführung werden die Überstände der Zellkulturen, in denen sich auch der monoklonale Antikörper befinden soll auf den festen Träger aufgetragen. Danach wird das reine, Enzym-markierte Antigen zugegeben und die Farbstoffreaktion durchgeführt.

In klinischen Studien, in denen ein ganz spezielles Protein detektiert werden soll, das in einem umfangreichen Proteingemisch in einer nur geringen Konzentration vorliegt, wird hingegen oft ein indirekter, nicht-kompetitiver ELISA eingesetzt, der auch als Sandwich-ELISA bezeichnet wird. Die direkte Form des ELISAs scheidet hier aus, da infolge der niedrigen Analyt-Konzentration (A liegt oft nur im Promillebereich) sowohl eine Isolierung als auch eine Markierung ineffektiv ist. Würde man darauf jedoch verzichten und stattdessen z.B. das Protein-enhaltenden Patientenserum auf den Träger auftragen, so wären über 99,99% der Platte mit anderen Proteinen als dem zu detektierenden besetzt. Für solche Anwendungen wurde der Sandwich-ELISA entwickelt; in diesem werden 2 Antikörper verwendet, die zwar dasselbe Protein (Antigen) erkennen, aber an zwei unterschiedliche Regionen (Epitope) desselben binden. Zunächst wird der erste, nicht-markierte Antikörper immobilisiert und im

folgenden Schritt die Probe zugegeben. Alle Proteine mit dem passenden Epitop binden an den immobilisierten Erstantikörper, die restlichen werden ausgewaschen. Zur Detektion der Bindung wird anschließend mit dem markiertem Zweitantikörper umgesetzt, der ein anderes Epitop des bereits gebundenen Proteins (Analyt) erkennt und zur Ausbildung einer Sandwich-Struktur führt. Da die Anzahl der markierten Antikörper auf der Oberfläche im Gleichgewichtszustand von der Konzentration des Analyten abhängt, kann dessen Menge über die Quantifizierung der Markierung bestimmt werden.

In einem indirekten, kompetitiven ELISA konkurriert hingegen das nachzuweisende Antigen (A) mit einem markiertem Zweitantigen (A') um ein und dieselbe Bindungsstelle des immobilisierten Antikörpers. Die Bindungsstellen werden teilweise vom Antigen und teilweise von dem markierten Derivat (dem Kompetitor) besetzt. Je höher die Analytkonzentration in der Probe ist, desto weniger markierte Derivate binden im Gleichgewichtszustand an die Oberfläche. Das Sensorsignal ist in kompetitiven Tests dementsprechend umgekehrt proportional zur Analytkonzentration.

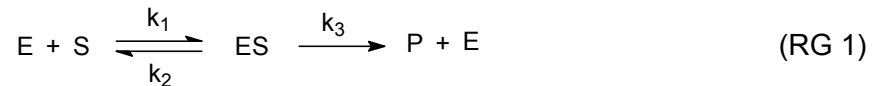
Um die Spezifität der detektierten Wechselwirkungen und somit auch eine Quantifizierung zu garantieren, ist zur Durchführung solcher Festphasenassays jedoch die Unterdrückung unspezifischer Adsorption besonders wichtig. Hierzu bietet es sich an, den verwendeten Träger zunächst mit einer proteinresistenten Matrix zu beschichten, in welche der Assay anschließend integriert wird (z.B. Polyethylenglykolbeschichtungen). Alternativ wird in der Praxis zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der bereits Antikörper- oder Antigen-funktionalisierte Träger auch häufig in einer Lösung von Proteinen, die mit den verwendeten Antikörpern nicht kreuzreagieren, inkubiert und somit abgesättigt. Zu diesem Zweck werden unter anderem BSA und fettarmes Milchpulver verwendet (s. Kap. II.1, Abs. 2).

4.1.1 Quantifizierung der immobilisierten Proteinmenge nach Michaelis-Menten

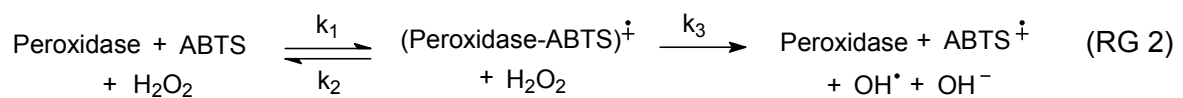
In dieser Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA eingesetzt und die immobilisierte Antikörper-Menge nach dem enzymkinetischen Modell von Michaelis-Menten ermittelt. Bei den verwendeten Antikörpern handelte es sich um Peroxidase(POD)-markierte Konjugate. Als Substrat in der Enzym-katalysierten Farbstoffreaktion wurde ABTS verwendet und die Umsetzung zum Radikalkation (Absorptionsmaximum bei 405 nm) photometrisch verfolgt. Im Folgenden sind kurz die zur Quantifizierung notwendigen enzymkinetischen Grundlagen dargestellt [210].

Der Michaelis-Menten-Mechanismus [193], [29]

Nach dem Michaelis-Menten-Mechanismus ist der Umsetzung des Substrats mit dem Enzym ein Gleichgewicht vorgelagert, in dem aus den Edukten ein Enzym-Substrat-Komplex (aktivierter Komplex) gebildet wird, der in einer irreversiblen Reaktion zu Produkt und Enzym zerfällt.



Für die Peroxidase-katalysierte Umsetzung des Substrates ABTS zum photometrisch detektierbaren Radikalkation lautet die Reaktionsgleichung demnach:



k_1 , k_2 und k_3 bezeichnen die Geschwindigkeitskonstanten der Einzelreaktionen. Für die Geschwindigkeit der Farbstoff-Entstehung folgt somit

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3 \cdot [ES] \quad (87)$$

Das Geschwindigkeitsgesetz für den Enzym-Substrat-Komplex lautet:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 \cdot [E] \cdot [S] - k_2 \cdot [ES] - k_3 \cdot [ES] \quad (88)$$

Für die Konzentration des intermediär gebildeten und schnell-zerfallenden Enzym-Substrat-Komplexes ES kann ein quasi-stationärer Zustand angenommen werden, so dass gilt:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (89)$$

Aus dieser Gleichung folgt unter Berücksichtigung von $[E]_0 = [E] + [ES]$

$$[ES] = \frac{k_1 k_3 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{k_3 + k_2 + k_1 \cdot [S]} = \frac{k_3 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{k_M + [S]} \quad (90)$$

k_M bezeichnet in dieser Gleichung die sogenannte Michaelis-Konstante: $k_M = \frac{k_3 + k_2}{k_1}$.

Ist die Substratkonzentration wesentlich größer als die Michaelis-Konstante, so kann man diese gegenüber der Substratkonzentration vernachlässigt werden und es ergibt sich eine Reaktion erster Ordnung für die Bildung des Produktes P:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3 \cdot [E]_0 \quad (91)$$

Bezogen auf die Reaktionsgleichung (91) folgt somit, dass die Menge des entstehenden Farbstoffs (P) pro Zeiteinheit ein Maß für die Enzym-Konzentration (E_0) ist. Da das farbige Radikalkation ABTS ein Absorptionsmaximum im sichtbaren Bereich besitzt (405 nm), kann der zeitliche Verlauf seines Konzentrationsanstiegs während der Reaktion photometrisch bestimmt werden.

Kombination mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz

Nach dem Lambert Beer'schem Gesetz ist die Extinktion (Ex) proportional zur Konzentration c des vermessenen Stoffes, seinem Extinktionskoeffizienten ε und der Schichtdicke der Küvette d

$$Ex = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (92)$$

Über die Messung der Extinktion des entstehenden Produktes kann daher bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten die Konzentration dieses Radikalkations [P] bestimmt werden. Die nach der Zeit abgeleitete Gleichung (9)

$$\frac{dc}{dt} = \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{d}{dt}(Ex) = \frac{d[P]}{dt} \quad (93)$$

kann daher mit der Gleichung (91) kombiniert werden. Als Ergebnis erhält man:

$$[E]_0 = \frac{1}{\varepsilon \cdot d \cdot k_3} \cdot \frac{d}{dt}(Ex) \quad (94)$$

Die Steigung der Extinktion mit der Zeit ist somit proportional zur eingesetzten Enzymkonzentration $[E_0]$.

Ziel des ELISA ist hier jedoch nicht eine Bestimmung der Enzymkonzentration, sondern der Massenbelegung der immobilisierten und POD-markierten Antikörper. Dies ist mit Hilfe der Gleichung (94) ebenfalls möglich, da davon ausgegangen werden kann, dass die Markierung (mit dem POD-Enzym) mit einer konstanten Umsatzrate α (= mittlere Anzahl der POD-Moleküle pro Antikörper) verbunden ist und somit aus der POD-Konzentration auch direkt auf die

vorliegende Antikörper (AK)-Konzentration geschlossen werden kann. Die Markierungsrate wird hier mit α bezeichnet:

$$[E]_0 = \alpha \cdot [AK] \quad (95)$$

Die Kombination mit der Gleichung (94) ergibt somit

$$[AK] = \left\{ \frac{1}{\alpha \cdot \varepsilon \cdot d \cdot k_3} \right\} \cdot \frac{d}{dt}(Ex) = EF \cdot \frac{d}{dt}(Ex) \quad (96)$$

Bei Kenntnis des Eichfaktors EF kann daher anhand des zeitlichen Anstiegs der Extinktion des entstehenden Radikalkations die vorliegende Antikörper-Menge ermittelt werden.

Da die Eichwertfaktoren von der Markierungs-Rate abhängig sind, die von Charge zu Charge variiert, muß dieser Faktor für jeden der eingesetzten POD-markierten Antikörper gesondert bestimmt werden. In den Eichmessungen werden unterschiedliche Mengen des betreffenden Antikörpers [AK] (bei festem Volumen) eingesetzt und jeweils der zeitliche Extinktionsanstieg dEx/dt ermittelt. Eine lineare Anpassung der auf diese Weise erhaltenen Werte ergibt als Steigung den Eichwertfaktor EF.

Da davon auszugehen ist, dass die Peroxidase-Aktivität mit der Zeit alterungsbedingt nachlässt, sollten die ermittelten Faktoren in bestimmten Zeitabständen (ein paar Monate) durch wiederholte Eichmessungen überprüft werden.

Bestimmung der Antikörper-Massenbelegung

In den in Kapitel IV beschriebenen Experimenten wurden die POD-markierten Antikörper an festen Substraten immobilisiert. Zur Bestimmung ihrer Massenbelegung (Einheit ng/cm^2) wurden die Träger in kleine Stücke geschnitten, in einer mit der ABTS-Pufferlösung gefüllten Rührküvette platziert und der zeitliche Konzentrationsanstieg des sich nach Zugabe von H_2O_2 bildenden Radikalkations ABTS photometrisch bestimmt.

Auf diese Weise konnte bei bekanntem Puffervolumen nach Gleichung (96) zunächst die auf der betreffenden Probe immobilisierte Antikörper-Menge (Einheit ng) ermittelt werden. Zur Bestimmung der Immobilisationsfläche wurde die Massendichte (Einheit g/cm^2) der eingesetzten Träger (Gold-bedampfte Si-Wafer, Gold-bedampfte Objektglasträger) ermittelt, so dass aus dem Gewicht der in dem Assay eingesetzten Proben-Stücken die involvierte Immobilisationsfläche (cm^2) und somit auch die Massenbelegung des Antikörpers (ng/cm^2) berechnet werden konnte.

II.IV Selbstagggregierende Monolagen

Durch Beschichten von Oberflächen können deren Eigenschaften gezielt modifiziert werden (z.B. Erzeugung proteinabweisender Oberflächen) [39], [211], [212], [213]. Eine Möglichkeit zu einer reproduzierbaren und definierten Modifikation von Oberflächen stellt z.B. das Aufbringen organischer Monoschichten dar, wobei Prozesse wie die Selbstaggregation und Selbstorganisation der Moleküle eine wichtige Rolle spielen.

Selbstagggregierende Monolagen (SAM) können auf unterschiedliche Arten hergestellt werden. Zu nennen sind unter diesem Aspekt z.B. die Langmuir-Blodgett-Technik, mit deren Hilfe monomolekulare Filme von der Wasser-Luft-Grenzfläche auf ein festes Substrat aufgezogen werden können.

Eine selbstordnende Adsorption von Molekülen auf Oberflächen kann jedoch auch über reaktive Kopfgruppen der Moleküle erfolgen. Polare oder ionische Wechselwirkungen führen zu einer Physisorption auf der Oberfläche; Beispiele sind etwa die elektrostatisch vermittelte Adsorption von PLL-*g*-PEG Kopolymeren auf negativ geladenen Metalloxidoberflächen (Nb_2O_5), die über das protonierte Polylysin-Rückgrat vermittelt wird [30]. Eine oberflächenreaktive funktionelle Kopfgruppe kann aber auch zur Chemisorption auf dem Substrat führen, wenn eine kovalente Bindung zum Träger ausgebildet wird. Diese Art der Ausbildung selbstaggregierender Monolagen ist erst seit den 80er Jahren bekannt [214], [215]. Beispiele für diese Art der Beschichtung sind etwa die Funktionalisierung von hydroxyterminierten Oberflächen (Glas, Siliziumdioxid) mit Organosilanen sowie die Adsorption von Thiolverbindungen auf Goldoberflächen.

Dicht gepackte und geordnete Monolagen können jedoch nur ausgebildet werden, wenn die mit dem Ordnungsprozess verbundene Entropieabnahme durch einen genügend hohen Energiegewinn überkompensiert wird. Die treibende Kraft der Adsorption kann daher auf die mit der Adsorptions-Reaktion (Physi- oder Chemisorption) verbundene Enthalpieabnahme sowie die mit zunehmender Packungsdichte der Ketten ansteigenden van der Waals-Kräfte zurückgeführt werden [217].

1 Struktureller Aufbau

Die Struktur der SAMs kann insgesamt in vier verschiedene Funktionsbereiche aufgeteilt werden (s. Abb. II.IV.1-1). Die adsorbierenden Moleküle besitzen eine reaktive Kopfgruppe, welche die Adsorption auf dem Träger vermittelt sowie im Allgemeinen eine längere Molekülkette, die auch als Spacer bezeichnet wird und eine funktionelle Endgruppe. Der Spacer

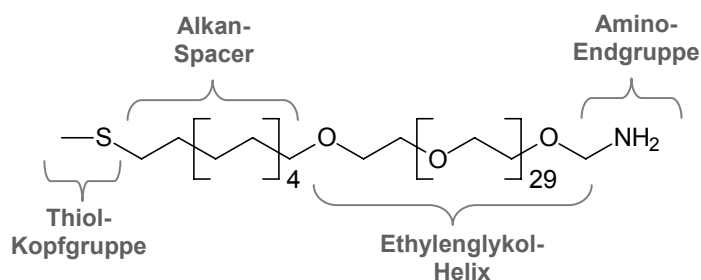


Abb. II.IV.1-1: Struktureller Aufbau von SAM-Molekülen am Beispiel der in dieser Arbeit eingesetzten und aus 4 Funktionsteilen bestehenden endgruppenfunktionalisierten Polyethylenglykol-Thiolen.

ist für die Einstellung einer hohen Packungsdichte zuständig; zwischen diesem und der Endgruppe ist in einigen Fällen noch ein 4. Funktionsteil inkorporiert, der bestimmte Oberflächeneigenschaften, wie z.B. Proteinresistenz bewirken soll [39].

Bei der Kopfgruppe handelt es sich um eine oberflächenreaktive funktionelle Gruppe, welche die Adsorption auf der Oberfläche vermittelt. Carboxylatgruppen können z.B. zur Adsorption auf Aluminiumoxid, Siloxangruppen zur Funktionalisierung von Glas und Siliziumdioxid und Schwefelverbindungen (Sulfide, Thiole) zur Ausbildung von SAMS auf Edelmetalloberflächen, wie z.B. Gold, Silber und Kupfer eingesetzt werden.

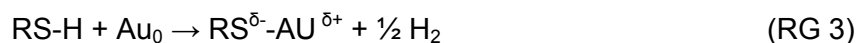
Der Spacer kann z.B. aus einer Alkylkette oder einem aromatischen System (z.B. Biphenyl) bestehen. Bei unpolaren Spacern (Alkylketten, Phenylringe) leisten die mit dem Ordnungsprozess zunehmenden van der Waals-Wechselwirkungen einen wesentlichen Energiebeitrag zur Ausrichtung der Molekülketten [217], [218]. Die exotherme Energie, die mit den van der Waals Wechselwirkungen zwischen den Ketten einhergeht, beträgt im Fall einer Alkylkette etwa 1 kcal/mol pro Methyleneinheit [219]. Daher wird bei Alkylketten mit zunehmender Kettenlänge ein Anstieg der Ordnungsgeschwindigkeit beobachtet [220]. Befinden sich in den Molekülen funktionelle Gruppen (OH, COOH, NH₂), so können auch stärkere elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken am Ordnungsprozess beteiligt sein. Sterisch ungünstig stehende Gruppen können die Packungsdichte jedoch auch verringern.

Der dritte Bestandteil des Moleküls, die Endgruppe (-H, -CH₃, -NO₂, -OH, -COOH, -NH₂) beeinflusst in besonderem Maße die physikalischen und chemischen Eigenschaften der beschichteten Oberflächen, wie z.B. deren Hydrophobizität und elektrochemische Eigenschaften [211], [212], [213].

2 Adsorption von Thiolverbindungen auf Goldoberflächen

Die Filmbildungskinetik der Adsorption von Thiolverbindungen auf Goldoberflächen zeigt einen 2-stufigen Adsorptionsprozess [221], [222]. Nach einem schnellen ersten Adsorptionsschritt ordnet sich die Monoschicht in einem langsameren zweiten Schritt unter einer weiteren Zunahme des Bedeckungsgrades [223]; dieser Prozess erfordert eine gewisse Beweglichkeit der Moleküle auf der Oberfläche (s. unten). Die Geschwindigkeit dieses ordnungsbildenden Schrittes wird durch die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und somit durch die Beschaffenheit des Spacers und die Art der Endgruppe determiniert; je nach Stärke der auftretenden Wechselwirkungskräfte und der Kettenlänge des Spacers dauert er Stunden bis Tage.

Die Triebkraft für die Chemisorption von Thiolverbindungen (RSH) auf Goldoberflächen ist die bei der Ausbildung der Schwefel-Gold-Bindung frei werdende Energie von etwa 165 - 190 kJ/mol (40 - 45 kcal/mol) [224], [225], [226], bei der das Metall formal oxidiert wird. Dem Adsorptionsprozess liegt folgende chemische Reaktion zugrunde:



Der Mechanismus der Adsorption ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [217], [227]. Insbesondere die Frage nach dem Reaktionsweg des aus dem Thiol stammenden Wasserstoffatoms ist noch nicht beantwortet. So besteht z.B.

die These, dass die Anwesenheit von Sauerstoff im Reaktionsmedium zur Wasserbildung führt [228]. Die hohe Reaktionsenthalpie der Adsorptionsreaktion bewirkt eine nahezu vollständige Besetzung aller Adsorptionsplätze. Der Schwefel bindet sich bevorzugt an die dreifach koordinierten Muldenplätze (hollow sites) einer Goldoberfläche [217]. Auf den verwendeten Gold-(111)-Oberflächen bilden langkettige Alkanthiole hexagonale $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ R30°-Überstrukturen aus [229], [230], [231]; der Abstand

zwischen den Schwefelatomen beträgt 4.97 Å, was etwa dem dreifachen van der Waals Radius des Schwefels (1.85 Å) [215] entspricht. Bei einer dichtesten Packung der Alkylketten (mit einer all-trans-Konformation der Methylengruppen) müsste der S-S-Abstand jedoch kleiner sein und nur 4.24 Å betragen. Daher verkippen die Alkylketten auf Gold um etwa 30° bis 35°, den so genannten Tiltwinkel, um die Packungsdichte und somit auch die van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Ketten zu maximieren [232]. Diese gekippte Orientierung

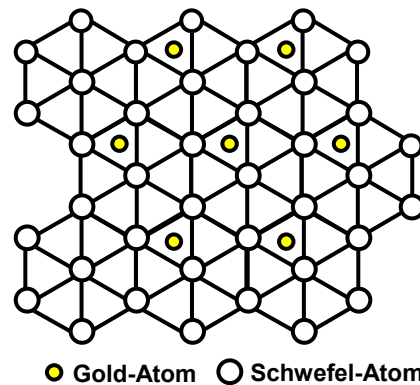


Abb. II.IV.1-2: Hexagonale Überstruktur der S-Atome auf einer Au(111) Oberfläche.

ist energetisch günstig, da sie weiterhin eine sp^3 -Hybridisierung der Schwefel-Kopfgruppe ermöglicht [233]. Die Moleküle sind über ihre Schwefelatome jedoch nicht fest an der Oberfläche verankert, sondern weisen eine gewisse laterale Mobilität auf, was für die ordnungsbildenden Schritte von besonderer Bedeutung ist. Da die Adsorption an vielen Stellen gleichzeitig beginnt, kann auf diese Weise eine Domänenbildung reduziert werden.

Weitere Vorteile der verwendeten Goldsubstrate betreffen vor allem ihre chemische Inertheit und die Vielzahl an Methoden zur Beschichtung von Oberflächen mit diesem Metall. Gold bildet an Luftsauerstoff keine Oxidschicht; ein dünner Goldfilm kann z.B. durch Bedampfung, Sputtern oder elektrochemische Abscheidung aufgebracht werden.

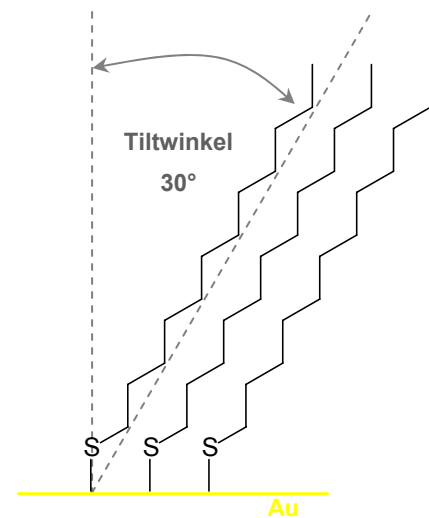


Abb. II.IV.1-3: Verkippung der Alkanthiol-Monofilme auf Gold (111).

Kapitel III

Experimenteller Teil

1 Materialien

1.1 Allgemeine Angaben

Die Reaktionen von oxidations- und feuchtigkeitsempfindlichen Substanzen wurden unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. Hierzu wurde Stickstoff der Firma *Messer Griesheim*, Qualität 4.6 verwendet.

Zur Trocknung der Lösungsmittel wurde Molekularsieb 3 Å oder 4 Å der Firma *Carl Roth & Co.* verwendet.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelfertigfolien Polygram SIL G/UV₂₅₄ der Firma *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG* benutzt. Die Detektion der Substanzspuren erfolgte mit Ioddampf. Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Partikelgröße: 0,04 – 0,063 mm) der Firma *Fluka* verwendet, das zum Schutz von säureempfindlichen Gruppen mit 0,1% Calcium dotiert ist.

Die Nanopartikel-Schichten wurden auf Glasobjektträgern (76 x 26 mm) der Firma *R. Langenbrinck* (Emmendingen/Deutschland) aufgebracht.

1.2 Reagenzien zur Synthese der funktionalisierten Polyethylen-glykol-Thiole

Ethylenoxid, 10-Undecen-1-ol, Chloressigsäure-Na-Salz, Thioessigsäure, 2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril) (AIBN), Azodicarbonsäurediethylester (DEAD; 40%-ige Lösung in Toluol), Phthalimid, Hydrazin-Monohydrat, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dimethylformamid (DMF), Salzsäure p.a. und Kieselgel 60 stammen von der Firma *Fluka*.

Triphenylphosphin, ölfreies NaH-Pulver, DMSO-d₆ und CDCl₃ wurden von der Firma *Aldrich* erworben.

DMF SupraSolv® wurde von der Firma *Merck*, Methanol p.a. und Ethanol p.a. von der Firma *J.T. Baker* bezogen.

Chloroform, Essigester und Wasserstoffperoxid (30%) in technischer Reinheit stammen aus den Theoretikumsbeständen der Universität Heidelberg.

1.3 Reagenzien zur Präparation der Nanopartikeloberflächen

Wasserstoffperoxid (30%) und Schwefelsäure wurden den Theoretikumsbeständen der Universität Heidelberg entnommen.

Die Siliziumdioxid-Nanopartikel (400 ± 40 nm Durchmesser) wurden von der Firma *Polyscience* bestellt.

Tetrachlorgoldsäure-Trihydrat, Polyethylenimin, PBS-Tabletten, Thioglykolat-Natriumsalz, Natrium-Citrat, Natriumborhydrid und Hydroxylamin stammen von der Firma *Aldrich*.

1.4 Zur Oberflächenmodifizierung eingesetzte Chemikalien

Butanthiol, Dekanthiol, 11-Mercapto-1-undecanol, 16-Mercaptohexadecansäure, Glutardialdehyd (25%-ige Lösung in Wasser), N-Methylimidazol, N,N'-Diisopropylcarbodiimid und Piperidin stammen von der Firma *Aldrich*.

Dodekanthiol, Tetradekanthiol, Hexadekanthiol, Oktadekanthiol, Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure (SMCC), 2,2'-Azino-di(ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS), N-Hydroxysuccinimid und N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid wurden von der Firma *Fluka* bezogen.

Fmoc- β -Alanin wurde bei der Firma *Novabiochem* bestellt.

1.5 Biochemikalien

Folgende Antikörper und Proteine wurden von der Firma *Dianova Immundiagnostik, Hamburg* bezogen:

- Hase anti-Schaf IgG (H+L); Peroxidase-konjugiert
- Ziege anti-Hase IgG (H+L); Peroxidase-konjugiert
- Ziege anti-Maus IgG (H+L); Peroxidase-konjugiert
- Normales Humanserum; Protein Konzentration von 60.0 mg/mL

Von der Firma *Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe* wurden bestellt:

- Alexa Fluor® 546 Ziege anti-Maus IgG (H+L)
- Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Hase IgG (H+L)

Von der Firma *Sigma, Saint Louis, Missouri* stammen:

- anti-HA Antikörper; Wirt: Hase
- anti-FLAG® M5 monoklonaler Antikörper; Wirt: Maus
- Fibrinogen, isoliert aus Humanplasma; ~ 65% Protein

Von der Firma *Covance, Berkley, California* wurden bestellt:

- anti-HA.11 monoklonaler Antikörper; Wirt: Maus

1.6 Verwendete Pufferlösungen

PBS-Puffer (pH = 7.4)

Eine PBS-Tablette in 200 mL Millipore-Wasser ergibt eine Lösung, die 100 mM an Phosphatpuffer, 137 mM an NaCl und 2.7 mM an KCl ist; pH = 7,4.

Acetat-Puffer (pH = 5.5)

820 mg (10 mmol) Natrium-Acetat und 107 mg (102 µL, 18 mmol) Essigsäure werden in 1 L Millipore-Wasser gelöst; pH = 5.5.

Phosphatpuffer (pH = 7.0)

3.30 g (27.53 mmol) Natriumdihydrogenphosphat und 6.07 g (39.13 mmol) Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat werden in 1 L Millipore-Wasser gelöst; pH = 7.0.

TBS-Tween-Puffer (pH = 8.0)

2.423 g (20 mmol) Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (TRIS), 8.77 g (150 mmol) NaCl und 1 mL Tween® 20 werden in 1 L Millipore-Wasser gelöst und mit Salzsäure ein pH von 8.0 eingestellt; pH = 8.0.

Substratpufferlösung für ELISA (pH = 4.5)

1.67 g (7.9 mmol) Citronensäuremonohydrat, 2.14 g (12 mmol) Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 190 mg (0.348 mmol) ABTS werden in 200 mL Millipore-Wasser gelöst. Die leicht grün gefärbte Lösung wird bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt; pH = 4.5.

2 Geräte

Stahlautoklav

Zur Synthese der polymeren Ethylenglykole wurde ein mit 2 Zuleitungen ausgestatteter Stahlautoklav mit einem Fassungsvermögen von 200 mL benutzt (angefertigt nach Plänen von Dr. Wolfgang Eck; Leihgabe).

Peptidsynthese

Die an SMCC-terminierten Oberflächen immobilisierten Peptid-Epitope wurden in der Syntheseinheit von Dr. Rüdiger Pipkorn am DKFZ/Heidelberg an fester Phase synthetisiert, gereinigt und mittels MALDI-TOF charakterisiert.

Spotroboter

Zum Spotten der Cystein-terminierten Peptidepitope wurde ein BioChip Arrayer der Firma *PerkinElmer LAS GmbH/Rodgau*, vormals *Packard Biochip Technologies*, verwendet.

Zentrifuge

Die Nanopartikel-Suspensionen wurden in einer Ultrazentrifuge der Firma *Heraeus Sepatech* abzentrifugiert.

UV-Lampe

Zur Reinigung der (un)funktionalisierten Goldwafer und Nanopartikeloberflächen wurden die Substrate einer Ozonolyse unterzogen. Hierfür wurde eine Quecksilberdampfampe der Firma *Heraeus Nobellight TQ 150* in Laboratmosphäre verwendet.

3 Analytik

3.1 NMR-Spektroskopie

^1H -NMR-Spektren wurden mit einem Bruker AC-300-Spektrometer gemessen; Messfrequenz 300 MHz bzw. 75.47 MHz. Die Angabe der Signallagen erfolgt über die chemische Verschiebung δ [ppm]. Die Signalmultiplizitäten der NMR-Spektren werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett; d = Dublett; t = Triplett; q = Quartett; m = Multipllett.

3.2 Massenspektroskopie

Zur Aufnahme der MALDI-Spektren wurde ein Biflex-Gerät der Firma Bruker verwendet.

3.3 Elementaranalyse (EA)

Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Labor des Organisch-Chemischen Instituts der Universität Heidelberg durchgeführt.

3.4 Röntgen-Photoemissions-Spektroskopie (XPS)

Die XP-Spektren wurden an einem MAX-200-Spektrometer der Firma Leybold-Heraeus aufgenommen. Hierbei diente eine Aluminiumanode als Quelle für die Röntgenstrahlung. Die Energie der K_{α} -Linie beträgt 1486.6 eVolt bei einer Halbwertsbreite von ca. 1 eVolt. Als Messparameter wurden folgende Werte eingestellt.

Orbital/ Bereich	Startenergie / eVolt	Endenergie / eVolt	Schrittweite / meV	Verweil- zeit /ms	Passenergie / eVolt	Scans
Übersicht	1000	-4,8	400	10	96	5
Au4f, O1s	560	520	200	40	48	15
C1s	300	275	200	100	48	15
S2p	175	150	200	250	48	20
N1s	414	393	200	250	48	20
Si2s	178	145	200	40	48	20
Si2p	115	85	200	40	48	20
Au4f	95	75	200	40	48	15

Tab. III.3-1: Messparameter für die aufgenommenen XP-Spektren.

Zur Kontrolle von Signalintensität und Probenposition (Verschiebungen durch Aufladungseffekte) wurde zunächst ein Übersichtsspektrum gemessen. Anschließend wurde zur genaueren Quantifizierung von jeder Atomspezies ein Detailspektrum aufgenommen. Start- und Endenergie geben das Energieintervall an, in dem die betreffenden Signale gemessen wurden. Die Schrittweite bestimmt die Energiedifferenz zwischen zwei Messpunkten. Die Verweilzeit wird durch die Detektionswahrscheinlichkeit des betreffenden Elements bestimmt, die von dessen Wirkungsquerschnitt und der Lage im Probenmaterial abhängt. Die element-spezifischen Wirkungsquerschnitte σ und Abschwächungslängen λ können der Literatur entnommen werden und sind in der Tabelle III.3-2 aufgeführt.

Signal	O1s	C1s	S2p	Au4f	N1s	Si2p
σ / w. E.	0.040	0.013	0.022	0.2511	0.025	0.011
λ / Å (Al)	20.3	24.0	29.8	36.9	21.5	35.2

Tab. III.3-2: Elementspezifische Wirkungsquerschnitte σ und Abschwächungslängen λ [234].

Mit der Bestrahlungsdauer der untersuchten Filme steigen allerdings auch die durch die Röntgenstrahlung induzierten Schäden; somit muss ein sinnvoller Kompromiss zwischen Auflösung und Strahlenbelastung getroffen werden.

3.4.1 Analyse der XP-Signale

Zur Durchführung einer quantitativen Analyse müssen die gemessenen Rohdaten normiert und angepasst werden. In der Regel ist auch eine Korrektur des Untergrunds notwendig. Sowohl die Darstellung der Spektren als auch ihre quantitative Auswertung erfolgte mit dem Programmpaket Origin 3.78 der Firma Microcal. Das darin enthaltene Unterprogramm "Peak Fitting Module" ermöglicht die Signalanpassung.

3.4.1.1 Normierung

Um die Vergleichbarkeit von Messungen an unterschiedlichen Spektrometern zu gewährleisten, müssen die XPS-Daten bezüglich der apparativen Bedingungen normiert werden, indem das erhaltene Spektrum durch die für jede Messapparatur spezifische Transmissionsfunktion dividiert wird. Die auf den Goldoberflächen durchgeführten Messungen wurden bezüglich des $\text{Au}4f_{7/2}$ -Signals (84 eV) normiert.

3.4.1.2 Untergrundkorrektur

Da der Untergrund in der Regel auf Grund inelastisch gestreuter Sekundärelektronen zu höheren Bindungsenergien hin ansteigt, kann es bei den Signalen zu beträchtlichen Asymmetrien kommen. Daher ist eine Korrektur des Untergrunds der Messsignale notwendig, um eine quantitative Analyse durchführen zu können. Als Standardverfahren gelten die lineare Untergrundkorrektur sowie die Untergrundkorrekturen nach Shirley und Tougaard.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei allen Messsignalen eine lineare Untergrundkorrektur angewandt.

3.4.1.3 Signalanpassung

Das Flächenintegral des XP-Signals ermöglicht die Bestimmung der jeweiligen Elementkonzentration auf der Oberfläche. Zur Ermittlung des Integrals werden die Spektren je nach Anzahl der vorhandenen Spezies mit einer oder der Summe aus mehreren mathematischen Funktionen angepasst. Aus der Summe der Teilintensitäten ergibt sich die Gesamtintensität. Für die Signalanpassung kommen sowohl die Gauß- als auch die Lorentz-Funktion in Frage. Der Intensitätsverlauf eines Röntgensignals entspricht einer Lorentz-Funktion. Die Lebensdauer des angeregten Elektronenzustandes im Anodenmaterial bestimmt dabei die natürli-

che Halbwertsbreite. Da alle Anodenatome die gleiche Strahlung emittieren, wird dies als homogene Verbreitung bezeichnet.

Die Gestalt des Messsignals weicht aber bedingt durch verschiedene Einflüsse von der Lorentz-Charakteristik ab. Hierfür sind maßgeblich Relaxationseffekte innerhalb des Probenmaterials und die Auflösung des Analysators verantwortlich. Diese Vorgänge besitzen Gauß-Charakter. Lorentz-Kurven haben im Vergleich zu Gauß-Kurven eine geringere Halbwertsbreite und eine breitere Basis bei gleicher Fläche. Im Rahmen dieser Arbeit fanden Voigt-Profile mit einem festen Verhältnis von Gauß- zu Lorentzprofil (4:1) Anwendung.

3.5 Fourier-transformierte Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (FT-IRRAS)

Die IR-Spektren der auf Gold-bedampften Si-Wafern aufgetragenen Adsorbatlagen wurden mit einem Bio-Rad FTS 175c Spektrometer aufgenommen. Das Gerät ist mit einem MCT-Detektor ausgestattet, der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Bei jeder Messung wurden etwa 1000 bis 2000 Scans mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen. Als Referenz diente eine auf dem entsprechenden Substrat aufgetragene Monolage von perdeuteriertem Oktadekanthiol ($\text{C}_{18}\text{D}_{37}\text{SH}$). Die Spektren wurden exportiert und mit dem Programm Origin 3.78 der Firma Microcal sowohl bearbeitet als auch qualitativ und quantitativ ausgewertet.

3.6 Ellipsometrie

Ellipsometrische Messungen wurden an einem spektralen Ellipsometer vom Typ M44 der Firma J. A. Woollam Co., Inc. durchgeführt. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Bogenlampe mit polychromatischem Spektrum. Die Messungen erfolgten unter einem festen Winkel von 75° . Für die Modellierung wurden nicht die Substratwerte der Datenbibliothek übernommen, sondern jedes Mal zuerst eine Goldprobe als Referenz vermessen und die Daten mit einer unendlichen Dicke angepasst. Zur Bestimmung der Dicke der Adsorbatlagen wurde im Modell eine weitere Schicht hinzugefügt. Dabei wurde die Filmdicke unter Verwendung der Software *WVase32TM* nach dem *Cauchy*-Modell angepasst; dies bedeutet, dass die Messkurve Punkt für Punkt mit einer Dispersionsfunktion angepasst wird, da von den Schichten keine optischen Konstanten bekannt waren.

3.7 UV-Spektroskopie

Für die photometrischen Messungen wurde ein UV/Vis-Spektrometer der Firma Varian benutzt (Modell Cary 500 Scan).

Die Messungen fanden im Enzymkinetik-Modus der zugehörigen Programm-Software statt.

3.8 Fluoreszenzscanner

Die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern funktionalisierten Glasobjektträger (Nanopartikeloberflächen) wurden mit einem *GenePix® 400B* Fluoreszenzscanner bei einer Laseranregung mit 632 nm (rot) bzw. 532 nm (grün) ausgelesen – zur Darstellung der Bilder diente die Software *GenePix® Pro* (beides von Axon Instruments bzw. Molecular Devices, Union City, USA).

3.9 Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz LSPR

Die Nanopartikeloberflächen wurden hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften mit einem im Reflexions-Modus arbeitendem Faser-Spektrometer charakterisiert.

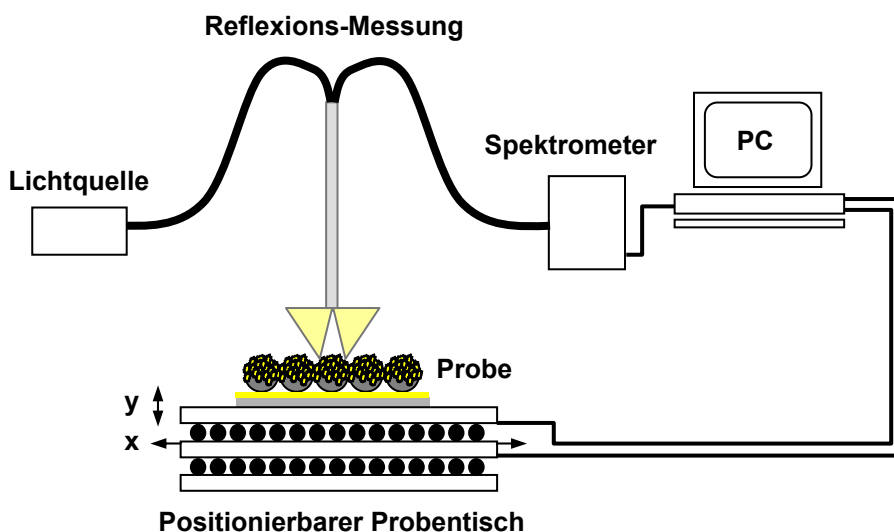


Abb. III.3-1:
Schematische Zeichnung des zur Aufnahme der LSPR-Spektren verwendeten optischen Aufbaus. Laterale Auflösung 3 mm.

Für makroskopische Messungen (Durchmesser des involvierten Probenbereiches ca. 3 mm) diente als Lichtquelle eine Deuterium/Wolfram Halogen-Lichtquelle (DH2000, *Ocean Optics*, Dunedin, FL, USA), mit deren Hilfe die Oberfläche durch eine in einem Abstand von einigen Millimetern über der Oberfläche justierten optischen Faser (R200-7, *Ocean Optics*) ausgeleuchtet wurde. Das von der Oberfläche reflektierte Licht wurde mittels einer zweiten optischen Faser zur Analyse an ein Miniatur-Spektrometer weitergeleitet (HR2000, *Ocean Optics*).

3.10 LSPR-Imaging

Zur Aufnahme der hochauflösten LSPR-Bilder (laterale Auflösung 5 μm) wurde ein selbst-angefertigter optischer Aufbau verwendet [235].

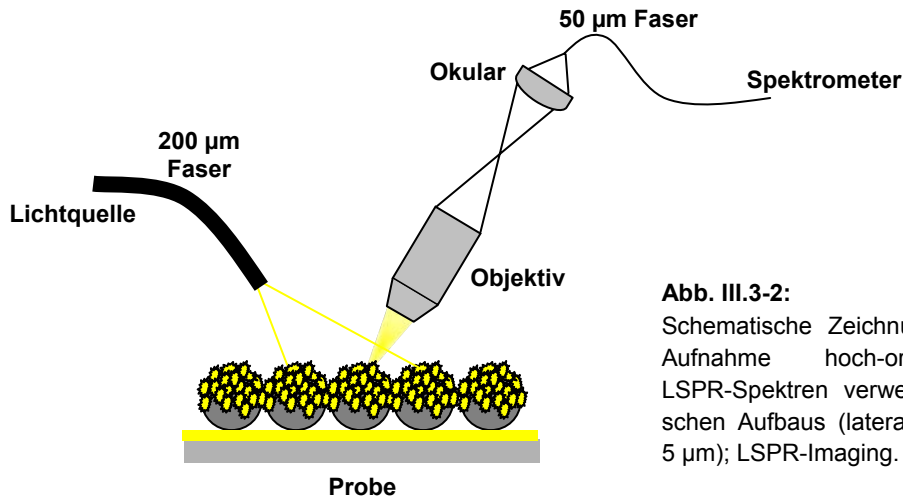


Abb. III.3-2:

Schematische Zeichnung des zur Aufnahme hoch-ortsaufgelöster LSPR-Spektren verwendeten optischen Aufbaus (laterale Auflösung 5 μm); LSPR-Imaging.

In diesem Fall wurde die Deuterium/Wolfram-Lichtquelle durch eine Hochleistungs-Halogen-Lichtquelle ersetzt (Fiber-lite 190, Dolan-Jenner, Boxborough, MA, USA) und mit einem Faser-Bündel (Durchmesser 200 μm) ausgestattet, um einen ausreichenden Photonenfluß und somit auch eine sinnvolle Akquisitionszeit bei der Aufnahme der Raster-Bilder zu gewährleisten. Das von der Oberfläche reflektierte Licht wurde durch eine optische Einheit, bestehend aus einem Mikroskop Objektiv (MSPlan20, *Olympus Deutschland*, Hamburg, Deutschland) und einer 50 mm großen konvexen Linse, die als Okular dient, in eine zweite Multi-mode-Faser (Durchmesser 50 μm) geleitet.

Zur Steuerung der zwei Schrittmotoren (x- und y-Richtung; 0.5 μm Auflösung, *OWIS GmbH*, Staufen, Deutschland) sowie des Spektrometers und für die Datenverarbeitung wurde ein geeignetes Programm mit Hilfe von Visual Basic geschrieben [235].

4 Durchführung

4.1 Synthese der endgruppenfunktionalisierten Polyethylenglykol-Thiole

Es wurden Polyethylenglykol-Thiole mit unterschiedlichen Endgruppenfunktionalitäten (COOH, NH₂, OH) und verschiedenen Kettenlängen synthetisiert. Hierzu wurde Ethylenoxid in einem Autoklaven unter Druck auf anionischem Wege polymerisiert.

In der Tabelle III.4-1 sind die synthetisierten Verbindungen und die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt.

<i>Strukturformel</i>	<i>Abkürzung</i>
HOOC-CH ₂ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₅ -O-(CH ₂) ₁₁ -SH	EG15COOH (16)
HOOC-CH ₂ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₂ -O-(CH ₂) ₁₁ -SH	EG22COOH (12)
HOOC-CH ₂ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₃₀ -O-(CH ₂) ₁₁ -SH	EG30COOH (8)
HOOC-CH ₂ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₃₆ -O-(CH ₂) ₁₁ -SH	EG36COOH (4)
H ₂ N-(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₇ -O-(CH ₂) ₁₁ -SH	EG17NH ₂ (34)
H ₂ N-(O-CH ₂ -CH ₂) ₃₁ -O-(CH ₂) ₁₁ -SH	EG31NH ₂ (30)
H ₂ N-(O-CH ₂ -CH ₂) ₄₀ -O-(CH ₂) ₁₁ -SH	EG40NH ₂ (26)
H-(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₃ -O-(CH ₂) ₁₁ -SH	EG13OH (22)
H-(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₂ -O-(CH ₂) ₁₁ -SH	EG22OH (19)

Tab. III.4-1: Übersicht der synthetisierten Polyethylenglykole.

Die Synthese der OH- und COOH-terminierten PEG-Thiole ist bereits in der Literatur beschrieben; die aminoterminierten Verbindungen sind hingegen neu.

4.1.1 Synthese der COOH-terminierten PEG-Thiole

Die einzelnen Syntheseschritte zur Darstellung der COOH-terminierten PEG-Thiole sind in der Abbildung III.4-1 gezeigt.

Die ersten beiden Reaktionsschritte wurden im Autoklaven durchgeführt; im Gegensatz zu

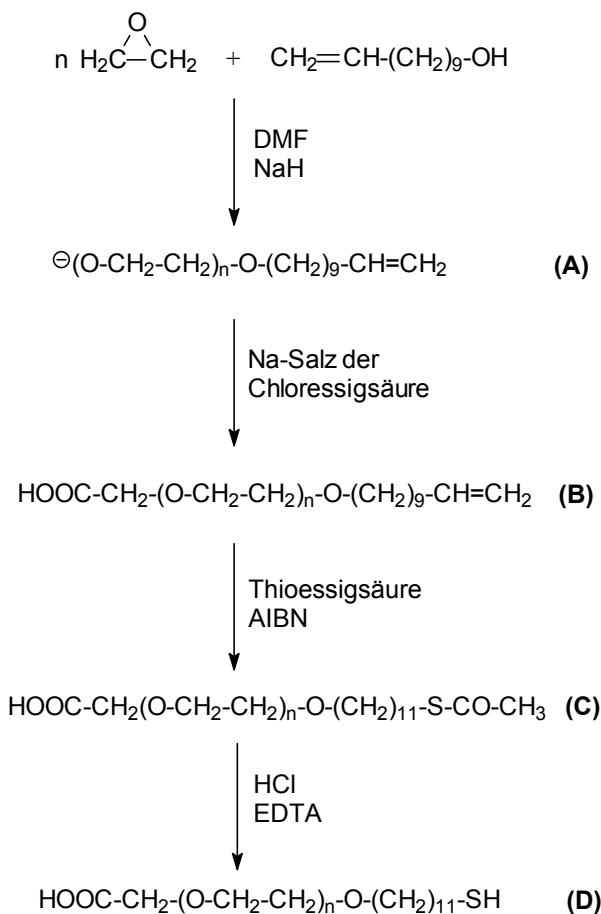


Abb. III.4-1: Reaktionsschritte zur Synthese von α -(Carboxymethyl)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-poly(ethylenglykolen).

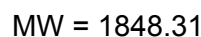
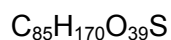
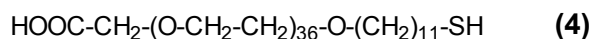
sche dem jeweiligen Produkt angepasst wurden.

der in der Literatur beschriebenen Synthesevorschrift [11] wurde die nach der anionischen Polymerisation in deprotonierter Form vorliegende Verbindung (A) nicht isoliert und wiederum deprotoniert, sondern durch Zugabe von Chloressigsäure sofort in einer nukleophilen Substitution weiter umgesetzt.

Im Folgenden wird die Synthese der Verbindung EG36COOH im Detail beschrieben. Die restlichen kürzerkettigen Verbindungen EG15(22,30)COOH wurden auf analoge Weise synthetisiert, wobei jedoch die zur säulenchromatographischen Aufarbeitung der Rohprodukte erforderlichen Laufmittelgemische dem jeweiligen Produkt angepasst wurden.

4.1.1.1 Synthese von EG36COOH

EG36COOH



Undec-1-enyl-11-polyethylenglykol (1)

Ansatz:

1.439 g (8.45 mmol)	10-Undecen-1-ol 97%-ig
275 mg (10.99 mmol)	NaH-Pulver 95%-ig
12.0 g (272 mmol)	Ethylenoxid
80 mL	DMF

Durchführung:

Unter Schutzgas werden in einem ausgeheizten Schlenkkolben 275 mg NaH-Pulver vorgelegt und 20 mL DMF zugespritzt. Anschließend werden langsam 1.69 mL Undecen-1-ol zugegeben und die Lösung zwei Stunden lang gerührt.

In einem ausgeheizten und mit Argon befüllten Stahlautoklaven werden 60 mL DMF vorgelegt. Dieser wird auf -78°C abgekühlt und über einen weichmacherfreien Teflonschlauch mit 10.0 g Ethylenoxid befüllt. Anschließend werden 15 mL der Lösung des deprotonierten Alkohols zugespritzt und die Lösung 4 Tage lang bei 55°C gerührt.

α -(Carboxymethyl)- ω -(undec-1-en-11-yl)-polyethylenglykol (2)

Ansatz:

Reaktionsansatz von (1)

2.43 g (20.28 mmol)	Cloressigsäure-Na-Salz 97%-ig
20 mL	DMF

Durchführung:

In einem ausgeheizten Schlenkkolben werden 2.43 g Cloressigsäure-Na-Salz vorgelegt und in 20 mL DMF gelöst.

Der auf Raumtemperatur abgekühlte Autoklav wird vorsichtig geöffnet, 15 mL der Cloressigsäure zugespritzt und die Reaktionslösung weitere 3 Tage bei 55°C gerührt.

Anschließend wird auf Raumtemperatur gekühlt und der Autoklav geöffnet. Der Reaktionsansatz wird mit 5 M Salzsäure auf pH 1 angesäuert und filtriert. Das Filtrat wird unter reduziertem Druck eingedampft und das Produkt durch eine säulenchromatographische Aufarbeitung

tion an Kieselgel isoliert, wobei eine Mischung von MeOH/CHCl₃-Mischung (2:1) als Laufmittel verwendet wird ($R_f = 0.6$). Anschließend wird das Lösungsmittel eingeeengt, der Rückstand in 20 mL 1 M HCl gelöst und mehrmals mit CHCl₃ extrahiert; die organischen Phasen werden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23-1.38$ (m, 12H, CH₂), 1.54-1.59 (m, 2H, OCH₂-CH₂), 1.98-2.02 (m, 2H, =CH-CH₂), 3.37 (t, 2H, O-CH₂-CH₂, J = 7 Hz), 3.50-3.80 (m, 144H, -OCH₂), 4.01 (s, 2H, -CH₂-COOH), 4.88-4.94 (m, 2H, =CH₂), 5.57-5.81 (m, 1H, =CH).

Ausbeute:

8.60 g (4.73 mmol, 56%) eines farblosen Feststoffes.

α -(Carboxymethyl)- ω -[11-mercaptoaceto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (3)

Ansatz:

8.3 g (4.57 mmol)	Verbindung (2)
1.39 g (18.26 mmol)	Thioessigsäure
50 mg	2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril) (AIBN)

Durchführung:

8.3 g (4.57 mmol) der Verbindung (2) und 50 mg AIBN werden zusammen unter Schutzgas in 700 mL Methanol gelöst. Anschließend werden 1.39 g (18.26 mmol) Thioessigsäure zugespritzt und die Lösung 8 Stunden mit einer Quecksilberdampfampe (150 W) und unter Verwendung von Duran-Glas bestrahlt.

Das Lösungsmittel wird unter reduziertem Druck eingeeengt und das Rohprodukt einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel unterzogen (verwendete Laufmittel: Methanol/Ethylacetat (1/2); Methanol/Chloroform (2/1), $R_f = 0.6$).

Das Lösungsmittel wird eingeeengt, und das erhaltene Produkt in 40 mL 1 M Salzsäure gelöst. Die wässrige Phase wird anschließend mehrmals mit Chloroform extrahiert und das Lösungsmittel abrotiert.

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23-1.38$ (m, 14H, CH₂), 1.46-1.51 (m, 4H, O-CH₂-CH₂, S-H₂-CH₂), 2.31 (s, 3H, OC-CH₃), 2.81 (t, 2H, S-CH₂, J = 7 Hz), 3.35 (t, 2H, CH₂-CH₂-O, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 144H, OCH₂), 4.01 (s, 2H, CH₂-COOH), 12.57 (br s, 1H COOH).

Ausbeute:

5.18 g (2.74 mmol, 60%) eines farblosen Feststoffes.

 α -(Carboxymethyl)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (4)Ansatz:

5.0 g (2.65 mmol)	Verbindung (3)
100 mg	EDTA
15 mL	Salzsäure 37%-ig

Durchführung:

5.0 g (2.65 mmol) der Verbindung (3) und 100 mg EDTA werden in 200 mL Wasser gelöst. Anschließend werden 15 mL Salzsäure (37%-ig) zugetropft und die Reaktionslösung unter Schutzgas 2 Tage lang bei 70°C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abrotiert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (verwendete Laufmittel: Methanol/Ethylacetat (1/2); Methanol/Chloroform (4/1), $R_f = 0.5$).

Das Lösungsmittel wird abrotiert und das erhaltene Produkt in 40 mL 1M Salzsäure gelöst. Das wässrige Phase wird 4mal mit Chloroform extrahiert und das Lösungsmittel abrotiert.

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 14H, CH_2), 1.46-1.53 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.21 (t, 1H, S-H, $J = 8$ Hz), 2.41-2.46 (m, 2H, S- CH_2), 3.35 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, $J = 7$ Hz), 3.44 – 3.80 (m, 144H, OCH_2), 4.01 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 12.57 (br s, 1H COOH).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 15H, CH_2 , S-H), 1.50-1.55 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.46-2.53 (m, 2H, S- CH_2), 3.42 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, $J = 7$ Hz), 3.55-3.74 (m, 144H, OCH_2), 4.10 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.47 MHz, CDCl_3): $\delta = 24.4$ ($\text{CH}_2\text{-S}$), 25.8-33.8 ($-\text{CH}_2$), 68.4-71.3 ($-\text{CH}_2\text{-O}$), 171.6 ($-\text{COOH}$)

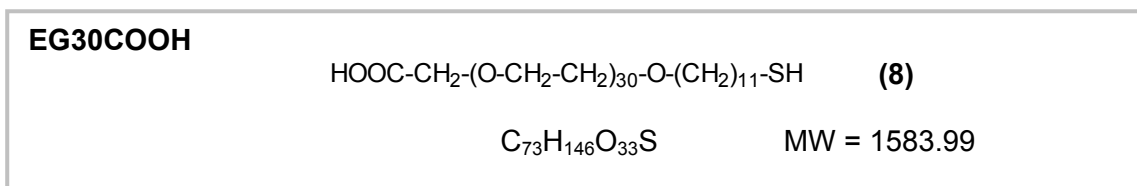
MS MALDI: $M_n = 1837$ ($n = 35.8$); $M_w = 1868$ ($n = 36.5$); $M_w/M_n = 1.02$: ($n =$ mittlere Anzahl der Ethylenglykoleinheiten).

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i} \quad (\text{Zahlenmittel}); \quad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i^2}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i} \quad (\text{Gewichtsmittel})$$

EA:	Ber.:	C: 55.22	H: 9.27	S: 1.69
	Gef.:	C: 55.37	H: 9.28	S: 1.79

Ausbeute:

2.69 g (1.46 mmol, 55 %) eines farblosen Feststoffes.

4.1.1.2 Synthese von EG30COOH**Undec-1-enyl-11-polyethylenglykol (5)**Ansatz:

1.77 g (10.38 mmol)	10-Undecen-1-ol 97%-ig
337 mg (13.49 mmol)	NaH-Pulver 95%-ig
12.0 g (272 mmol)	Ethylenoxid
80 mL	DMF

 α -(Carboxymethyl)- ω -(undec-1-en-11-yl)-polyethylenglykol (6)Ansatz:

Reaktionsansatz von **(5)**

2.99 g (24.91 mmol)	Cloressigsäure-Na-Salz 97%-ig
20 mL	DMF

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Laufmittel MeOH/CHCl₃ (2:1), R_f = 0.7

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 1.23-1.38 (m, 12H, CH₂), 1.54-1.59 (m, OCH₂-CH₂), 1.98-2.02 (m, 2H, =CH-CH₂), 3.37 (t, 2H, O-CH₂-CH₂, J = 7 Hz), 3.50-3.80 (m, 120H, -OCH₂), 4.01 (s, 2H, -CH₂-COOH), 4.88-4.94 (m, 2H, =CH₂), 5.57-5.81 (m, 1H, =CH).

Ausbeute:

8.87 g (5.71 mmol, 55%) eines farblosen Feststoffes.

α -(Carboxymethyl)- ω -[11-mercaptoaceto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (7)Ansatz:

8.5 g (5.47 mmol)	Verbindung (6)
1.66 g (21.88 mmol)	Thioessigsäure
50 mg	2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril)

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Methanol/Ethylacetat (1/2);
Methanol/Chloroform (2/1), $R_f = 0.7$

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23$ -1.38 (m, 14H, CH₂), 1.46-1.51 (m, 4H, O-CH₂-CH₂, S-H₂-CH₂), 2.31 (s, 3H, OC-CH₃), 2.81 (t, 2H, S-CH₂, J = 7 Hz), 3.35 (t, 2H, CH₂-CH₂-O, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 120H, OCH₂), 4.01 (s, 2H, CH₂-COOH), 12.57 (br s, 1H COOH).

Ausbeute:

5.42 g (3.34 mmol, 61%) eines farblosen Feststoffes.

 α -(Carboxymethyl)- ω - [11-mercaptol(undecyloxy)]-polyethylenglykol (8)Ansatz:

5.0 g (3.08 mmol)	Verbindung (7)
100 mg	EDTA
15 mL	Salzsäure 37%-ig

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Laufmittel Methanol/Ethylacetat (1/2);
Methanol/Chloroform (4/1), $R_f = 0.6$

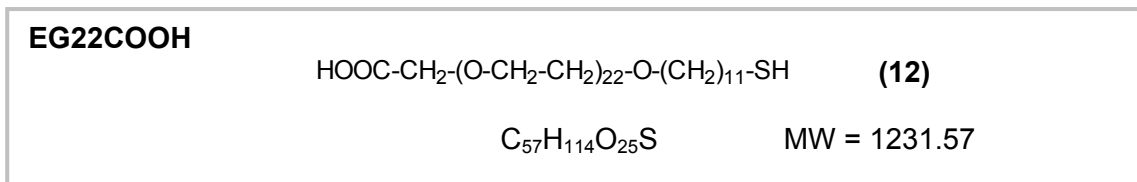
Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23$ -1.38 (m, 14H, CH₂), 1.46-1.53 (m, 4H, O-CH₂-CH₂, S-CH₂-CH₂), 2.21 (t, 1H, S-H, J = 8 Hz), 2.41-2.46 (m, 2H, S-CH₂), 3.35 (t, 2H, CH₂-CH₂-O, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 120H, OCH₂), 4.01 (s, 2H, CH₂-COOH), 12.57 (br s, 1H COOH).

MS MALDI: $M_n = 1564$ (n= 29.6); $M_w = 1591$ (n = 30.2); $M_w/M_n = 1.02$

Ausbeute:

2.83 g (1.78 mmol, 58 %) eines farblosen Feststoffes.

4.1.1.3 Synthese von EG22COOH***Undec-1-enyl-11-polyethylenglykol (9)***Ansatz:

1.84 g (10.81 mmol)	10-Undecen-1-ol 97%-ig
351 mg (14.05 mmol)	NaH-Pulver 95%-ig
10.0 g (227 mmol)	Ethylenoxid
80 mL	DMF

 α -(Carboxymethyl)- ω -(undec-1-en-11-yl)-polyethylenglykol (10)Ansatz:

Reaktionsansatz von (9)

3.11 g (25.95 mmol)	Cloressigsäure-Na-Salz 97%-ig
20 mL	DMF

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Laufmittel Methanol/Chloroform = 1/1, R_f = 0.6

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ = 1.23-1.38 (m, 12H, CH_2), 1.54-1.59 (m, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2$), 1.98-2.02 (m, 2H, $=\text{CH-CH}_2$), 3.37 (t, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, J = 7 Hz), 3.50-3.80 (m, 88H, $-\text{OCH}_2$), 4.01 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COOH}$), 4.88-4.94 (m, 2H, $=\text{CH}_2$), 5.57-5.81 (m, 1H, $=\text{CH}$).

Ausbeute:

6.50 g (5.41 mmol, 50%) eines farblosen Feststoffes.

α -(Carboxymethyl)- ω -[11-mercaptoaceto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (11)Ansatz:

6.3 g (5.24 mmol)	Verbindung (10)
1.59 g (20.97 mmol)	Thioessigsäure
50 mg	2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril)

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Methanol/Ethylacetat (1/3)
Methanol/Chloroform (1/1), $R_f = 0.6$

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 14H, CH_2), $1.46\text{-}1.51$ (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.31 (s, 3H, OC-CH_3), 2.81 (t, 2H, S-CH_2 , $J = 7$ Hz), 3.35 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, $J = 7$ Hz), $3.44 - 3.80$ (m, 88H, OCH_2), 4.01 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 12.57 (br s, 1H COOH).

Ausbeute:

3.47 g (2.73 mmol, 52%) eines farblosen Feststoffes.

 α -(Carboxymethyl)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (12)Ansatz:

3.0 g (2.36 mmol)	Verbindung (11)
100 mg	EDTA
15 mL	Salzsäure 37%-ig

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Methanol/Ethylacetat (1/3)
Methanol/Chloroform (1/1), $R_f = 0.6$

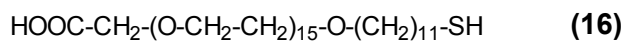
Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 14H, CH_2), $1.46\text{-}1.53$ (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.21 (t, 1H, S-H , $J = 8$ Hz), $2.41\text{-}2.46$ (m, 2H, S-CH_2), 3.35 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, $J = 7$ Hz), $3.44 - 3.80$ (m, 88H, OCH_2), 4.01 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-COOH}$), 12.57 (br s, 1H COOH).

MS MALDI: $M_n = 1217$ ($n = 21.7$); $M_w = 1243$ ($n = 22.3$); $M_w/M_n = 1.02$

Ausbeute:

1.54 g (1.25 mmol, 53 %) eines farblosen Feststoffes.

4.1.1.4 Synthese von EG15COOH**EG15COOH****Undec-1-enyl-11-polyethylenglykol (13)**Ansatz:

2,86 g (16.82 mmol)	10-Undecen-1-ol 97%-ig
547 mg (21.87 mmol)	NaH-Pulver 95%-ig
10.0 g (227 mmol)	Ethylenoxid
80 mL	DMF

 α -(Carboxymethyl)- ω -(undec-1-en-11-yl)-polyethylenglykol (14)Ansatz:

Reaktionsansatz von (13)

4.84 g (40.37 mmol)	Cloressigsäure-Na-Salz 97%-ig
20 mL	DMF

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Laufmittel Methanol/Chloroform = 1/1, $R_f = 0.7$

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 12H, CH_2), $1.54\text{-}1.59$ (m, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2$), $1.98\text{-}2.02$ (m, 2H, $=\text{CH-CH}_2$), 3.37 (t, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 7$ Hz), $3.50\text{-}3.80$ (m, 60H, $-\text{OCH}_2$), 4.01 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-COOH}$), $4.88\text{-}4.94$ (m, 2H, $=\text{CH}_2$), $5.57\text{-}5.81$ (m, 1H, $=\text{CH}$).

Ausbeute:

7.82 g (8.75 mmol, 52%) eines farblosen Feststoffes.

α -(Carboxymethyl)- ω -[11-mercaptoaceto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (15)Ansatz:

7.5 g (8.39 mmol)	Verbindung (14)
2.55 g (33.56 mmol)	Thioessigsäure
50 mg	2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril)

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Methanol/Ethylacetat (1/4)
Methanol/Chloroform (1/1), $R_f = 0.7$

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23-1.38$ (m, 14H, CH₂), 1.46-1.51 (m, 4H, O-CH₂-CH₂, S-CH₂-CH₂), 2.31 (s, 3H, OC-CH₃), 2.81 (t, 2H, S-CH₂, J = 7 Hz), 3.35 (t, 2H, CH₂-CH₂-O, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 60H, OCH₂), 4.01 (s, 2H, CH₂-COOH), 12.57 (br s, 1H COOH).

Ausbeute:

4.04 g (4.20 mmol, 50%) eines farblosen Feststoffes.

 α -(Carboxymethyl)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (16)Ansatz:

3.5 g (3.63 mmol)	Verbindung (15)
100 mg	EDTA
15 mL	Salzsäure 37%-ig

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Methanol/Ethylacetat (1/4)
Methanol/Chloroform (1/1), $R_f = 0.7$

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23-1.38$ (m, 14H, CH₂), 1.46-1.53 (m, 4H, O-CH₂-CH₂, S-CH₂-CH₂), 2.21 (t, 1H, S-H, J = 8 Hz), 2.41-2.46 (m, 2H, S-CH₂), 3.35 (t, 2H, CH₂-CH₂-O, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 60H, OCH₂), 4.01 (s, 2H, CH₂-COOH), 12.57 (br s, 1H COOH).

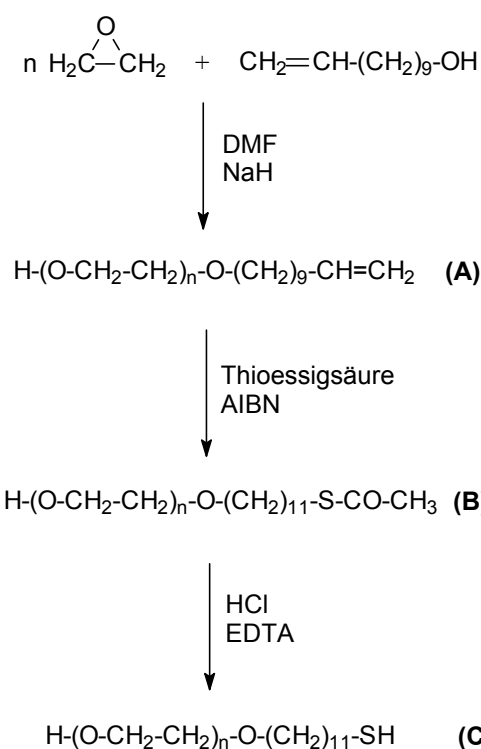
MS MALDI: $M_n = 909$ (n = 14.7); $M_w = 926$ (n = 15.1); $M_w/M_n = 1.02$

Ausbeute:

1.64 g (1.78 mmol, 49 %) eines farblosen Feststoffes.

4.1.2 Synthese der OH-terminierten PEG-Thiole

Die einzelnen Syntheseschritte zur Darstellung der OH-terminierten PEG-Thiole sind in der Abbildung III.4-2 gezeigt.



Im Folgenden wird die Synthese der Verbindung EG22OH im Detail beschrieben. Die kürzerkettige Verbindung EG13OH wurden auf analoge Weise synthetisiert und die zur säulenchromatographischen Aufarbeitung des Rohprodukts verwendeten Laufmittelgemische angepasst.

Abb. III.4-2: Reaktionsschritte zur Synthese von α -(Hydroxy)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-poly-(ethylenglykolen).

4.1.2.1 Synthese von EG22OH

EG22OH	$\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_{22}\text{-O}-(\text{CH}_2)_{11}\text{-SH}$	(19)
	$\text{C}_{55}\text{H}_{112}\text{O}_{23}\text{S}$	MW = 1173,53

Undec-1-enyl-11-polyethylenglykol (17)Ansatz:

2.062 g (12.11 mmol)	10-Undecen-1-ol 97%-ig
394 mg (15.74 mmol)	NaH-Pulver 95%-ig
10.0 g (227 mmol)	Ethylenoxid
80 mL	DMF

Durchführung:

Unter Schutzgas werden in einem ausgeheizten Schlenkkolben 394 mg NaH-Pulver vorgelegt und 20 mL DMF zugespritzt. Anschließend werden langsam 2.43 mL Undecen-1-ol zugegeben und die Lösung zwei Stunden lang gerührt.

In einem ausgeheizten und mit Argon befüllten Autoklaven werden 60 mL DMF vorgelegt. Dieser wird auf -78°C abgekühlt und über einen weichmacherfreien Teflonschlauch mit 10.0 g Ethylenoxid befüllt. Anschließend werden 15 mL der Lösung des deprotonierten Alkohols zugespritzt und die Lösung 4 Tage lang bei 55°C gerührt.

Der Autoklav wird auf Raumtemperatur abgekühlt, die Reaktionslösung mit 5 M Salzsäure auf $\text{pH} = 3$ angesäuert und die Reaktionslösung filtriert. Das Filtrat wird unter reduziertem Druck eingedunstet und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel Methanol/Chloroform = 1/1, $R_f = 0.6$).

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 12H, CH_2), $1.54\text{-}1.59$ (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2$), $1.98\text{-}2.02$ (m, 2H, $=\text{CH-CH}_2$), 2.57 (br s, 1H, -O-H), 3.37 (t, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 7$ Hz), $3.50\text{-}3.80$ (m, 88H, $-\text{OCH}_2$), $4.88\text{-}4.94$ (m, 2H, $=\text{CH}_2$), $5.57\text{-}5.81$ (m, 1H, $=\text{CH}$).

Ausbeute:

10.34 g (9.08 mmol, 75%) eines farblosen Feststoffes.

 α -(Hydroxy)- ω -[11-mercaptoaceto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (18)Ansatz:

10.0 g (8.79 mmol)	Verbindung (17)
2.67 g (35.15 mmol)	Thioessigsäure
50 mg	2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril)

Durchführung:

10.0 g (8.79 mmol) der Verbindung (17) werden zusammen mit 2.67 g (35.15 mmol) Thioessigsäure und 50 mg AIBN unter Schutzgas in 700 mL Methanol gelöst. Diese Lösung wird anschließend 8 Stunden mit einer Quecksilberdampflampe (150 W) und unter Verwendung von Duran-Glas bestrahlt.

Anschließend wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck eingedunstet und das Rohprodukt einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel unterzogen (Laufmittel: Methanol/Ethylacetat = 1/3; Methanol/Chloroform = 1/1, $R_f = 0.6$)

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 1.23-1.38 (m, 14H, CH₂), 1.46-1.51 (m, 4H, O-CH₂-CH₂, S-CH₂-CH₂), 2.31 (s, 3H, OC-CH₃), 2.57 (br s, 1H, -O-H), 2.81 (t, 2H, S-CH₂, J = 7 Hz), 3.35 (t, 2H, CH₂-CH₂-O, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 88H, OCH₂).

Ausbeute:

6.94 g (5.71 mmol, 65%) eines farblosen Feststoffes.

Synthese von α -(Hydroxy)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (19)Ansatz:

6.5 g (5.35 mmol)	Verbindung (18)
100 mg	EDTA
15 mL	Salzsäure 37%-ig

Durchführung:

6.5 g (5.35 mmol) der Verbindung (18) und 100 mg EDTA werden in 200 mL Wasser gelöst. Anschließend werden 15 mL Salzsäure (37%-ig) zugetropft und die Reaktionslösung unter Schutzgas 2 Tage lang bei 70°C gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel abrotiert und das erhaltene Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Methanol/Ethylacetat = 1/3; Methanol/Chlorform = 1/1; R_f = 0.6).

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 1.23-1.38 (m, 14H, CH₂), 1.46-1.53 (m, 4H, O-CH₂-CH₂, S-CH₂-CH₂), 2.21 (t, 1H, S-H, J = 8 Hz), 2.41-2.46 (m, 2H, S-CH₂), 2.57 (br s, 1H, -O-H), 3.35 (t, 2H, CH₂-CH₂-O, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 88H, OCH₂).

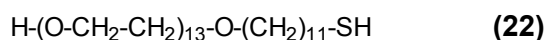
MS MALDI: M_n = 1163 (n = 21.8); M_w = 1185 (n = 22.3); M_w/M_n = 1.02

Ausbeute:

3.76 g (3.21 mmol, 60 %) eines farblosen Feststoffes.

4.1.2.2 Synthese von EG13OH

EG13OH



Undec-1-enyl-11-polyethylenglykol (20)

Ansatz:

3.436 g (20.18 mmol)	10-Undecen-1-ol 97%-ig
655 mg (26.23 mmol)	NaH-Pulver 95%-ig
10.0 g (227 mmol)	Ethylenoxid
80 mL	DMF

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Methanol/Chlorform = 1/1; $R_f = 0.7$

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.23-1.38$ (m, 12H, CH_2), $1.54-1.59$ (m, 2H, OCH_2-CH_2), $1.98-2.02$ (m, 2H, $=\text{CH}-\text{CH}_2$), 2.57 (br s, 1H, -O-H), 3.37 (t, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J = 7$ Hz), $3.50-3.80$ (m, 52H, - OCH_2), $4.88-4.94$ (m, 2H, $=\text{CH}_2$), $5.57-5.81$ (m, 1H, $=\text{CH}$).

Ausbeute:

11.68 g (15.74 mmol, 78%) eines farblosen Feststoffes.

α -(Hydroxy)- ω -[11-mercaptoaceto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (21)

Ansatz:

11.30 g (15.23 mmol)	Verbindung (20)
4.63 g (60.92 mmol)	Thioessigsäure
50 mg	2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril)

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Methanol/Ethylacetat (1/4);
Methanol/Chlorform = 1/1, $R_f = 0.7$

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 1.23-1.38 (m, 14H, CH₂), 1.46-1.51 (m, 4H, O-CH₂-CH₂, S-CH₂-CH₂), 2.31 (s, 3H, OC-CH₃), 2.57 (br s, 1H, -O-H), 2.81 (t, 2H, S-CH₂, J = 7 Hz), 3.35 (t, 2H, CH₂-CH₂-O, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 52H, OCH₂).

Ausbeute:

7.72 g (9.44 mmol, 62%) eines farblosen Feststoffes.

 α -(Hydroxy)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (22)Ansatz:

7 g (8.56 mmol)	Verbindung (21)
100 mg	EDTA
15 mL	Salzsäure 37%-ig

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Methanol/Ethylacetat (1/4);
Methanol/Chloroform = 1/1, R_f = 0.7

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): δ = 1.23-1.38 (m, 14H, CH₂), 1.46-1.53 (m, 4H, O-CH₂-CH₂, S-CH₂-CH₂), 2.21 (t, 1H, S-H, J = 8 Hz), 2.41-2.46 (m, 2H, S-CH₂), 2.57 (br s, 1H, -O-H), 3.35 (t, 2H, CH₂-CH₂-O, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 52 H, OCH₂).

Ausbeute:

3.85 g (4.96 mmol, 58 %) eines farblosen Feststoffes.

MS MALDI: M_n = 772 (12.9); M_w = 785 (13.2); M_w/M_n = 1.02

4.1.3 Synthese der NH₂-terminierten PEG-Thiole

Die einzelnen Syntheseschritte zur Darstellung der aminoterminierten PEG-Thiole sind in der Abbildung III.4-3 gezeigt.

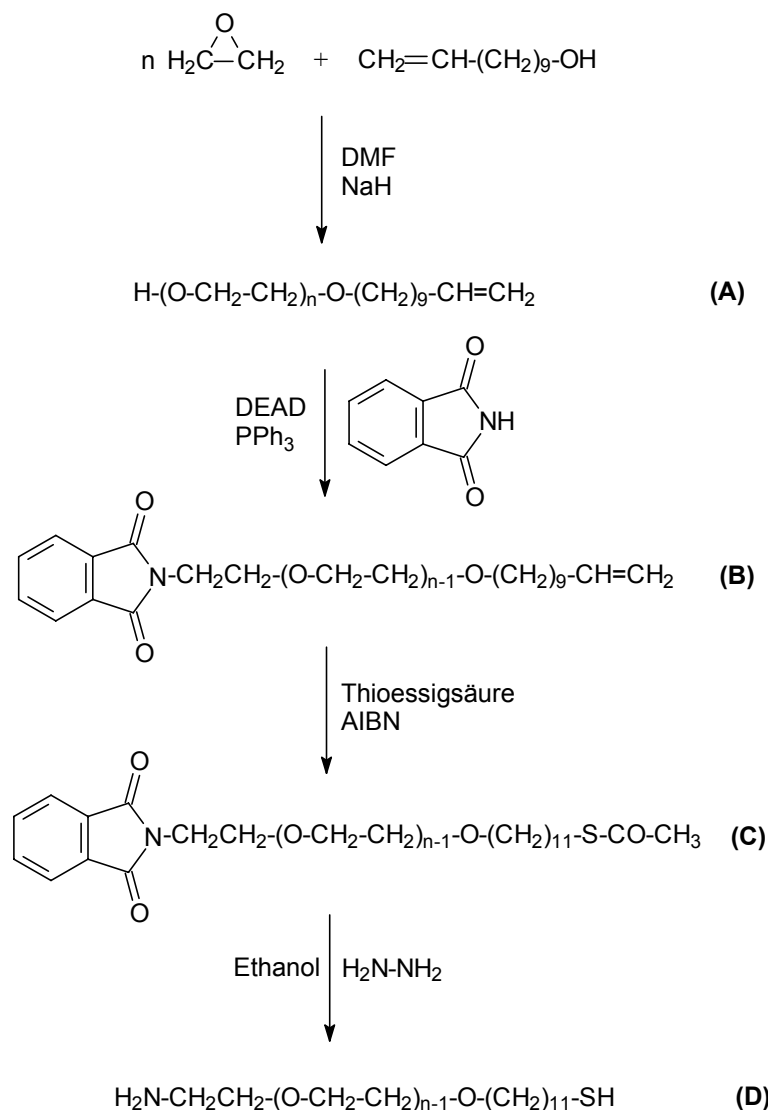
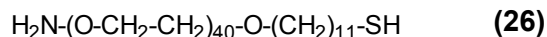


Abb. III.4-3: Reaktionsschritte zur Synthese von α -(Amino)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-poly(ethyleneglykolen).

Die Synthese der aminoterminierten PEG-Thiole erfolgt über die Zwischenstufe des N-alkylphthalimids durch Umsatz mit Triphenylphosphin und Diethylazodicarboxylat (DEAD) über die intermediäre Bildung eines Alkoxyphosphonium-Salzes. Diese transferieren die Alkylgruppe zu anionischen Akzeptoren, wie z.B. Carboxylaten, Phosphaten oder dem hier ausgebildeten Phthalimid-Anion. Im Gegensatz zur Gabriel-Synthese, bei der zunächst ein Halogenalkan gebildet und in einer $\text{S}^{\text{N}}2$ -Reaktion mit dem Ka-Salz der Phthalimids umgesetzt wird, stellt diese Reaktion sowohl eine einfachere auch als mildere Methode zur Synthese primärer Amine dar. Durch die anschließende Hydrazinolyse wird sowohl die primäre Aminogruppe als auch die Thiolgruppe freigesetzt.

Im Folgenden wird die Synthese der Verbindung EG40NH₂ im Detail beschrieben. Die kürzerkettigen Verbindungen EG17NH₂ und EG31NH₂ wurden auf analoge Weise synthetisiert, wobei die zur säulenchromatographischen Aufarbeitung der Rohprodukte erforderlichen Laufmittelgemische dem jeweiligen Produkt angepasst wurden.

4.1.3.1 Synthese von EG40NH2

EG40NH2**Undec-1-enyl-11-polyethylenglykol (23)**Ansatz:

1.375 g (8.07 mmol)	10-Undecen-1-ol 97%-ig
262 mg (10.49 mmol)	NaH-Pulver 95%-ig
12.0 g (272 mmol)	Ethylenoxid
80 mL	DMF

Durchführung:

Unter Schutzgas werden in einem ausgeheizten Schlenkkolben 262 mg NaH-Pulver vorgelegt und 20 mL DMF zugespritzt. Anschließend werden langsam 1.62 mL Undecen-1-ol zugegeben und die Lösung zwei Stunden lang gerührt.

In einen ausgeheizten und mit Argon befüllten Autoklaven werden 60 mL DMF vorgelegt. Dieser wird auf -78°C abgekühlt und über einen weichmacherfreien Teflonschlauch mit 10.0 g Ethylenoxid befüllt. Anschließend werden 15 mL der Lösung des deprotonierten Alkohols zugespritzt und die Lösung 4 Tage lang bei 55°C gerührt.

Der Autoklav wird auf Raumtemperatur abgekühlt, die Reaktionslösung mit 5 M Salzsäure auf $\text{pH} = 3$ angesäuert und die Reaktionslösung filtriert. Das Filtrat wird unter reduziertem Druck eingedunstet und das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (Laufmittel Methanol/Chloroform = 3/1, $R_f = 0.7$).

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 12H, CH_2), $1.54\text{-}1.59$ (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2$), $1.98\text{-}2.02$ (m, 2H, $=\text{CH-CH}_2$), 2.57 (br s, 1H, -O-H), 3.37 (t, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 7$ Hz), 3.50-3.80 (m, 160H, $-\text{OCH}_2$), 4.88-4.94 (m, 2H, $=\text{CH}_2$), 5.57-5.81 (m, 1H, $=\text{CH}$).

Ausbeute:

11.06 g (5.73 mmol, 71%) eines farblosen Feststoffes.

α -(Phthalimido)- ω -(undec-1-en-11-yl)-polyethylenglykol (24)Ansatz:

10.0 g (5.18 mmol)	Verbindung (23)
2.72 g (10.36 mmol)	Triphenylphosphin
1.52 g (10.36 mmol)	Phthalimid
1.80 g (10.36 mmol)	DEAD (40%-ig in Toluol)
250 mL	THF

Durchführung:

In einem ausgeheizten Dreihalskolben werden unter Schutzgas 10.0 g der Verbindung (23) in 250 mL THF gelöst. Anschließend werden 2.72 g Triphenylphosphin und 1.52 g Phthalimid zugegeben und 1 Stunde lang gerührt. Zu der Lösung werden nun unter Rühren langsam 4.75 mL der DEAD-Lösung zugetropft und 2 Tage lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Lösung eingeengt und das Rohprodukt über eine säulenchromatographische Aufarbeitung an Kieselgel gereinigt (Laufmittel: Ethylacetat; Methanol/Chloroform = 2/1; $R_f = 0.6$)

Charakterisierung:

¹H-NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23-1.38$ (m, 12H, CH₂), 1.54-1.59 (m, 2H, OCH₂-CH₂), 1.98-2.02 (m, 2H, =CH-CH₂), 3.37 (t, 2H, O-CH₂-CH₂, J = 7 Hz), 3.50-3.80 (m, 158H, -OCH₂), 3.85 (t, 2H, NCH₂), 4.88-4.94 (m, 2H, =CH₂), 5.57-5.81 (m, 1H, =CH), 7,8-7,9 (m, 4H, arom. H).

Ausbeute:

5.13 g (2.49 mmol, 48%) eines leicht gelblichen Feststoffes.

 α -(Phthalimido)- ω -[11-mercaptoaceto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (25)Ansatz:

5.0 g (2.43 mmol)	Verbindung (24)
738 mg (9.71 mmol)	Thioessigsäure
50 mg	2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril)

Durchführung:

5.0 g (2.43 mmol) der Verbindung (24) werden zusammen mit 738 g (9.71 mmol) Thioessigsäure und 50 mg AIBN unter Schutzgas in 700 mL Methanol gelöst. Diese Lösung wird an-

schließlich 8 Stunden mit einer Quecksilberdamplampe (150 W) und unter Verwendung von Duran-Glas bestrahlt.

Anschließend wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck eingengt und das Rohprodukt einer säulenchromatographischen Reinigung an Kieselgel unterzogen (Laufmittel: Ethylacetat; Methanol/ CHCl_3 = 2/1, R_f = 0.6)

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.23-1.38 (m, 14H, CH_2), 1.46-1.51 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.31 (s, 3H, OC-CH_3), 2.81 (t, 2H, S-CH_2 , J = 7 Hz), 3.35 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, J = 7 Hz), 3.80 (m, 158H, $-\text{OCH}_2$), 3.85 (t, 2H, NCH_2), 7,6-7,9 (m, 4H, arom. H).

Ausbeute:

3.22 g (1.51 mmol, 62%) eines leicht gelblichen Feststoffes.

α -(Amino)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (26)

Ansatz:

3.0 g (1.41 mmol)	Verbindung (25)
4.27 g (84.31 mmol)	Hydrazin-Hydrat
250 mL	Ethanol p.a.

Durchführung:

3.0 g (1.41 mmol) der Verbindung **(25)** werden in 250 mL Ethanol p.a. gelöst und 4.14 mL Hydrazin-Hydrat zugetropft. Die Lösung wird anschließend 2 Tage lang unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird auf Raumtemperatur abgekühlt, die Lösung eingengt und das Produkt mit eiskaltem Diethylether gefällt. Es wird filtriert, der Rückstand in 30 mL Dichlormethan gelöst und von unlöslichen Verunreinigungen abgetrennt. Das Rohprodukt wird einer säulenchromatographischen Aufreinigung an Kieselgel unterzogen (Laufmittel: Ethylacetat; Methanol/Chloroform = 2/1; R_f = 6.0).

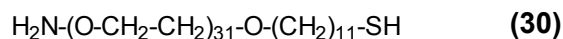
Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ = 1.23-1.38 (m, 14H, CH_2), 1.46-1.53 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.21 (t, 1H, S-H , J = 8 Hz), 2.41-2.46 (m, 2H, S-CH_2), 3.35 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 160 H, OCH_2 , NCH_2).

MS MALDI: M_n = 1970 (n = 39.8); M_w = 2005 (n = 40.6); M_w/M_n = 1.02

Ausbeute:

1.52 g (0.78 mmol, 55%) eines leicht gelblichen Feststoffes.

4.1.3.2 Synthese von EG31NH2**EG31NH2*****Undec-1-enyl-11-polyethylenglykol (27)***Ansatz:

1.767 g (10.38 mmol)	10-Undecen-1-ol 97%-ig
337 mg (13.49 mmol)	NaH-Pulver 95%-ig
12.0 g (272 mmol)	Ethylenoxid
80 mL	DMF

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Methanol/Chloroform = 2/1, $R_f = 0.6$

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.23-1.38$ (m, 12H, CH_2), 1.54-1.59 (m, 2H, OCH_2-CH_2), 1.98-2.02 (m, 2H, $=\text{CH}-\text{CH}_2$), 2.57 (br s, 1H, -O-H), 3.37 (t, 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$, $J = 7$ Hz), 3.50-3.80 (m, 124H, $-\text{OCH}_2$), 4.88-4.94 (m, 2H, $=\text{CH}_2$), 5.57-5.81 (m, 1H, $=\text{CH}$).

Ausbeute:

11.62 g (7.58 mmol, 73%) eines farblosen Feststoffes.

 α -(Phthalimido)- ω -(undec-1-en-11-yl)-polyethylenglykol (28)Ansatz:

10.5 g (6.84 mmol)	Verbindung (27)
3.59 g (13.69 mmol)	Triphenylphosphin
2.01 g (13.69 mmol)	Phthalimid
2.38 g (13.69 mmol)	DEAD 40%-ig in Toluol
250 mL	THF

Aufreinigung: säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Ethylacetat; Methanol/Chloroform = 2/1, $R_f = 0.6$

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 12H, CH_2), 1.54-1.59 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2$), 1.98-2.02 (m, 2H, $=\text{CH-CH}_2$), 3.37 (t, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 7$ Hz), 3.50-3.80 (m, 122H, $-\text{OCH}_2$), 3.85 (t, 2H, NCH_2), 4.88-4.94 (m, 2H, $=\text{CH}_2$), 5.57-5.81 (m, 1H, $=\text{CH}$), 7,8-7,9 (m, 4H, arom. H).

Ausbeute:

6.26 g (3.76 mmol, 55%) eines leicht gelblichen Feststoffes.

α -(Phthalimido)- ω -[11-mercaptoaceto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (29)

Ansatz:

6.0 g (3.61 mmol)	Verbindung (28)
1.10 g (14.43 mmol)	Thioessigsäure
50 mg	2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril)

Aufreinigung: säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Ethylacetat; Methanol/Chloroform = 2/1, $R_f = 0.6$

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 14H, CH_2), 1.46-1.51 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.31 (s, 3H, OC-CH_3), 2.81 (t, 2H, S-CH_2 , $J = 7$ Hz), 3.35 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, $J = 7$ Hz), 3.80 (m, 122H, $-\text{OCH}_2$), 3.85 (t, 2H, NCH_2), 7,6-7,9 (m, 4H, arom. H).

Ausbeute:

3.64 g (2.09 mmol, 58%) eines leicht gelblichen Feststoffes.

α -(Amino)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (30)

Ansatz:

3.3 g (1.901 mmol)	Verbindung (29)
5.70 g (113.86mmol)	Hydrazin-Hydrat
250 mL	Ethanol p. a.

Aufreinigung: säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Ethylacetat; Methanol/Chloroform = 2/1, $R_f = 0.6$

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 14H, CH_2), 1.46-1.53 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.21 (t, 1H, S-H, $J = 8$ Hz), 2.41-2.46 (m, 2H, S- CH_2), 3.35 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, $J = 7$ Hz), 3.44 – 3.80 (m, 124 H, OCH_2 , NCH_2).

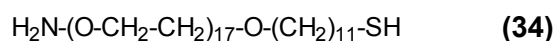
MS MALDI: $M_n = 1561$ ($n = 30.5$); $M_w = 1587$ ($n = 31.1$); $M_w/M_n = 1.02$

Ausbeute:

1.76 g (1.12 mmol, 59%) eines leicht gelblichen Feststoffes.

4.1.3.3 Synthese von EG17NH2

EG17NH2



Undec-1-enyl-11-polyethylenglykol (31)

Ansatz:

2.577 g (15.13 mmol)	10-Undecen-1-ol 97%-ig
492 mg (19.67 mmol)	NaH-Pulver 95%-ig
10.0 g (227 mmol)	Ethylenoxid
80 mL	DMF

Aufreinigung: säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Methanol/Chloroform = 1/1, $R_f = 0.6$

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.23\text{-}1.38$ (m, 12H, CH_2), 1.54-1.59 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2$), 1.98-2.02 (m, 2H, $=\text{CH-CH}_2$), 2.57 (br s, 1H, -O-H), 3.37 (t, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $J = 7$ Hz), 3.50-3.80 (m, 68H, $-\text{OCH}_2$), 4.88-4.94 (m, 2H, $=\text{CH}_2$), 5.57-5.81 (m, 1H, $=\text{CH}$).

Ausbeute:

10.42 g (11.35 mmol, 75%) eines farblosen Feststoffes.

α -(Phthalimido)- ω -(undec-1-en-11-yl)-polyethylenglykol (32)Ansatz:

10.0 g (10.89 mmol)	Verbindung (31)
5.71 g (21.78 mmol)	Triphenylphosphin
3.20 g (21.78 mmol)	Phthalimid
3.79 g (21.78 mmol)	DEAD 40%-ig in Toluol
250 mL	THF

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Ethylacetat; Methanol/Chloroform = 1/1, R_f = 0.6

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ = 1.23-1.38 (m, 12H, CH_2), 1.54-1.59 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{-CH}_2$), 1.98-2.02 (m, 2H, $=\text{CH-CH}_2$), 3.37 (t, 2H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, J = 7 Hz), 3.50-3.80 (m, 66H, $-\text{OCH}_2$), 3.85 (t, 2H, NCH_2), 4.88-4.94 (m, 2H, $=\text{CH}_2$), 5.57-5.81 (m, 1H, $=\text{CH}$), 7,8-7,9 (m, 4H, arom. H).

Ausbeute:

6.84 g (6.53 mmol, 60%) eines leicht gelblichen Feststoffes.

 α -(Phthalimido)- ω -[11-mercaptoaceto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (33)Ansatz:

6.5 g (6.21 mmol)	Verbindung (32)
1.89 g (24.84 mmol)	Thioessigsäure
50 mg	2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril)

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Ethylacetat; Methanol/Chloroform = 1/1, R_f = 0.6

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 1.23-1.38 (m, 14H, CH_2), 1.46-1.51 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.31 (s, 3H, OC-CH_3), 2.81 (t, 2H, S-CH_2 , J = 7 Hz), 3.35 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, J = 7 Hz), 3.80 (m, 66H, $-\text{OCH}_2$), 3.85 (t, 2H, NCH_2), 7,6-7,9 (m, 4H, arom. H).

Ausbeute:

4.32 g (3.85 mmol, 62%) eines leicht gelblichen Feststoffes.

 α -(Amino)- ω -[11-mercapto(undecyloxy)]-polyethylenglykol (34)Ansatz:

4.0 g (3.56 mmol)	Verbindung (33)
10.81 g (213.70 mmol)	Hydrazin-Hydrat
250 mL	Ethanol p.a.

Aufreinigung:

säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel
Ethylacetat; Methanol/Chloroform = 1/1, R_f = 0.6

Charakterisierung:

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO): δ = 1.23-1.38 (m, 14H, CH_2), 1.46-1.53 (m, 4H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$, $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.21 (t, 1H, S-H, J = 8 Hz), 2.41-2.46 (m, 2H, S-CH₂), 3.35 (t, 2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$, J = 7 Hz), 3.44 – 3.80 (m, 68 H, OCH_2 , NCH_2).

MS MALDI: M_n = 963 (n = 16.9); M_w = 980 (n = 17.3); M_w/M_n = 1.02

Ausbeute:

2.10 g (2.21 mmol, 62%) eines leicht gelblichen Feststoffes.

4.2 Präparation der optisch aktiven Nanopartikeloberflächen

4.2.1 Verwendetes Trägersystem

Die Nanopartikel-Schichten wurden auf Gold-bedampften Glasobjektträgern aufgebracht. Hierzu wurde zur Haftvermittlung zunächst eine 5 nm dicke Titanschicht und folgend eine 30 nm dicke Au-Schicht aufgedampft.

Vor dieser Beschichtung wurden die Träger jedoch zunächst zur Beseitigung organischer Verunreinigungen für 30 min in Caro'scher Säure ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4 = 1/3$) eingelegt. Anschließend wurden sie mit Millipore-Wasser abgespült, 15 min in Ethanol p.a. Ultraschall-behandelt und mit Millipore-Wasser abgespült.

4.2.2 Zur Adsorption verwendete Nanopartikel-Lösung

Es werden 200 mg PEI in 100 mL einer 0.5 M NaCl-Lösung gelöst. Zur Umhüllung der Nanopartikel mit dem Polyelektrolyten PEI werden nun 3.75 mL der Partikelsuspension (400 nm SiO_2 -Partikel; Polyscience) zu einer Lösung, bestehend aus 31.25 mL der angesetzten PEI-Lösung und 15.63 mL PBS-Puffer gegeben und aufgeschlämmt (Gesamtvolumen GV = 50 mL). Die Suspension wird über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Um die nicht-adsorbierten PEI-Bestandteile abzutrennen, wird die am Vortag angesetzte Partikel-Lösung 10 min lang bei 6000 U/min zentrifugiert und die überstehende klare Lösung vorsichtig dekantiert. Anschließend werden die abzentrifugierten Nanopartikel in demselben Volumen an Millipore-Wasser aufgeschlämmt und zur vollständigen Auflösung des Rückstandes für 15 min im Ultraschallbad belassen.

Die erhaltene Suspension wird wiederum 10 min bei 6000 U/min zentrifugiert.

Die beschriebenen Waschschriffe (Zentrifugation, Aufschlämmen mit Millipore-Wasser, Ultraschallbad) werden insgesamt noch 3mal wiederholt.

Nach dem letzten Zentrifugationsvorgang werden die abzentrifugierten Partikel jedoch in einem geringeren Volumen ($0.188 \times \text{GV}$) an Millipore Wasser aufgeschlämmt und nochmals mit Ultraschall behandelt (9,4 mL bei einem anfänglichen Gesamtvolumen von 50 mL).

Die erhaltene Nanopartikel-Suspension kann in der vorliegenden Form direkt zur Oberflächen-Adsorption eingesetzt werden.

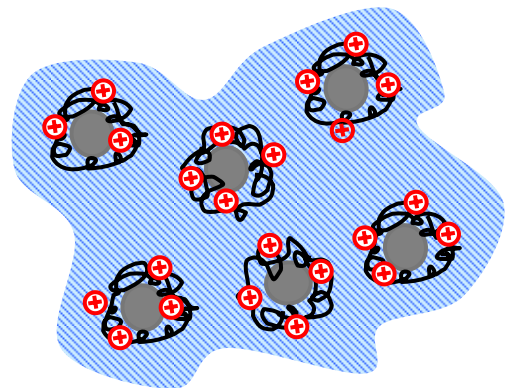


Abb. III.4-4: Schematische Darstellung Polyethylenimin gecoateter Siliziumdioxid-Nanopartikel in Lösung.

4.2.3 Beschichtung der Oberflächen mit Nanopartikeln

Es wird eine 100 mM Thioglykolat-Lösung (1.14 g Thioglykolat in 100 mL Milliporewasser) frisch angesetzt. Diese Lösung wird nun auf die goldbedampften Glaträger in einer Anzahl von insgesamt 6 x 2 Probenspots und einem Probenvolumen von 50 μL pro Spot pipettiert; die hydrophoben Oberflächeneigenschaften verhindern ein Verlaufen der Probenlösung (zum Schutz vor Verdunstung müssen die Träger abgedeckt werden).

Nach einer Adsorptionszeit von 3 Stunden werden die Platten mit Millipore Wasser abgespült und im N_2 -Strom getrocknet. Anschließend können die Nanopartikel adsorbiert werden.

Hierzu werden 50 μL der Partikelsuspension auf die zuvor funktionalisierten Probenspots pipettiert. Nach einer Adsorptionszeit von 3 Stunden werden die

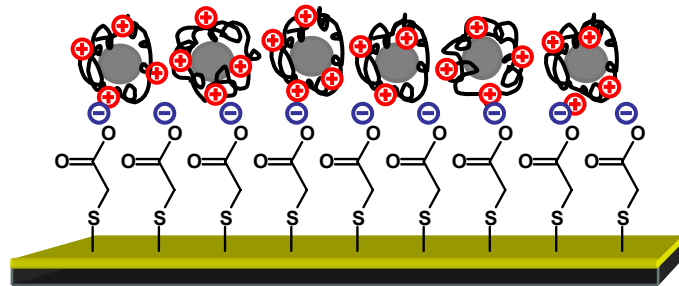


Abb. III.4-5: Schematische Darstellung der elektrostatisch vermittelten Adsorption PEI-gecoateter SiO_2 -Nanopartikel.

Glaträger solange mit Millipore Wasser vorsichtig abgespült, bis die ablaufende Lösung klar ist. Das Restwasser wird abgeschüttelt und die Platten in senkrechter Haltung an der Luft getrocknet.

4.2.4 Stromlose Goldabscheidung

Die Oberflächen-adsorbierten und PEI-umhüllten SiO_2 -Nanopartikel (Durchmesser 400 nm) werden anschließend mit einer Lösung Citrat-stabilsierter Goldkolloide (Durchmesser 4 nm) behandelt (Layer-by-Layer-Adsorption; s. Kap. II.II Abs. 4.1.1); dieser Schritt wird auch als *seeding*-Schritt bezeichnet, da er zwar zu einer Abscheidung der Kolloide auf den Partikeln, jedoch nicht zu ihrer kompletten Umhüllung führt.

Es wird eine 0.1%-ige Lösung von Tetrachlorgold-säure in Millipore-Wasser hergestellt und zu 100 mL dieser Lösung 1 mL einer 0.1%-igen Na-Citrat-Lösung gegeben. Anschließend werden 7.5 mg Natriumborhydrid in 10 mL einer 0.1%-igen Na-Citrat

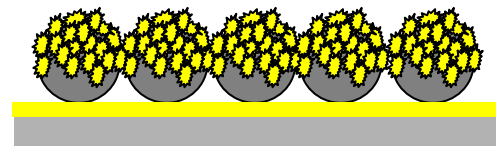


Abb. III.4-6: Schematische Darstellung der LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen.

Lösung gelöst (Konzentration 19.83 mM); diese Reduktionslösung ist kurz vor der Umsetzung frisch anzusetzen. Zur Herstellung der Goldkolloide wird nun 1 mL dieser Reduktionslösung zu jeweils 100 mL der 0.1%-igen Goldsäure-Lösung gegeben und 3 Stunden lang gerührt. Die Nanopartikel-Platten werden nun für 12 h in diese Lösung unter N_2 -Atmosphäre bei 4°C eingelegt. Anschließend wird die alte Goldkolloid-Lösung verworfen und die Platten nochmals für 12 h in eine frische Goldkolloid-Lösung eingelegt.

Die nach diesem *seeding*-Schritt auf den Nanopartikeln adsorbierten Goldcluster werden im folgenden *plating*-Schritt als Nukleationskeime für eine stromlose Goldabscheidung genutzt. Hierzu wird eine 0.1%-ige Tetrachlorgoldsäure-Lösung mit einer 0.04 M Hydroxylaminhydrochlorid-Lösung in einem Verhältnis von 2.33:1.00 gemischt und anschließend sofort auf die Nanopartikeloberflächen gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 10 min wird die Reduktionslösung mit Millipore-Wasser abgewaschen und die Platten im N₂-Strom getrocknet.

4.3 Allgemeine Vorschriften zur Oberflächenmodifikation

4.3.1 Präparation von Thiolmonolagen auf Gold-beschichteten Substraten (Gold-bedampfte Si-Wafer, Nanopartikeloberflächen)

Als Substrat zur Präparation der Thiol-Monolagen dienten neben den Gold-beschichteten Nanopartikel-Oberflächen polykristalline Goldsubstrate, die durch thermisches Aufdampfen des jeweiligen Metalls auf einen einseitig polierten Silizium(100)-wafer mit einer Schichtdicke von 0.5 mm hergestellt wurden. Bei einem Basisdruck von 5×10^{-8} mbar wurde zuerst eine 5 nm dicke Titanschicht als Haftvermittler und darauf eine 100 nm dicke Goldschicht aufgedampft. Die Gold beschichteten Siliziumwafer und Nanopartikeloberflächen wurden unter Schutzgas aufbewahrt.

Vor der Funktionalisierung mit dem jeweiligen Thiol wurden die geschnittenen Goldwafer und Nanopartikeloberflächen mit Stickstoff abgeblasen und für zwei Stunden einer Ozonolyse durch UV-Bestrahlung an Luft unterzogen. Hierzu wurde eine Quecksilberdampflampe der Firma Heraeus Noblelight TQ 150 in Laboratmosphäre verwendet. Anschließend wurden die Substrate mit Ethanol p.a. abgespült und in die entsprechende Thiollösung eingelegt.

Zur Adsorption der PEG-Thiole wurden 500 µM Lösungen in DMF hergestellt; die Adsorption der Alkanthiole erfolgte aus ethanolischen Lösungen mit einer Konzentration von 1 mM. Nach einer Adsorptionszeit von etwa 12 h wurden die Substrate aus der Lösung entnommen und zunächst mit dem zur Adsorption verwendeten Lösungsmittel abgespült. Anschließend wurden die Oberflächen mit Ethanol gewaschen und die Proben im N₂-Strom getrocknet.

Bis zur jeweiligen Messung wurden die funktionalisierten Substrate bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

4.3.2 Funktionalisierung OH-terminierter Oberflächen mit β -Alanin

Man mischt unter Rühren 1.56 g Fmoc- β -Alanin (0.1 M) und 929 μ L DIC (0.12 M) in 50 mL trockenem DMF und lässt die Lösung 5 Minuten stehen. Zur angesetzten Lösung werden nun 793 μ L NMI (0.24 M) zugetropft und die OH-terminierten Substrate in dieser Lösung 12 h lang eingelegt. Nach der Entnahme werden die Oberflächen mit DMF und Ethanol gewaschen und im N_2 -Strom getrocknet. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe werden die Proben 20 min in einer 20%-igen Lösung von Piperidin in DMF inkubiert; anschließend werden die Substrate mit DMF und Ethanol gewaschen und im N_2 -Strom getrocknet.

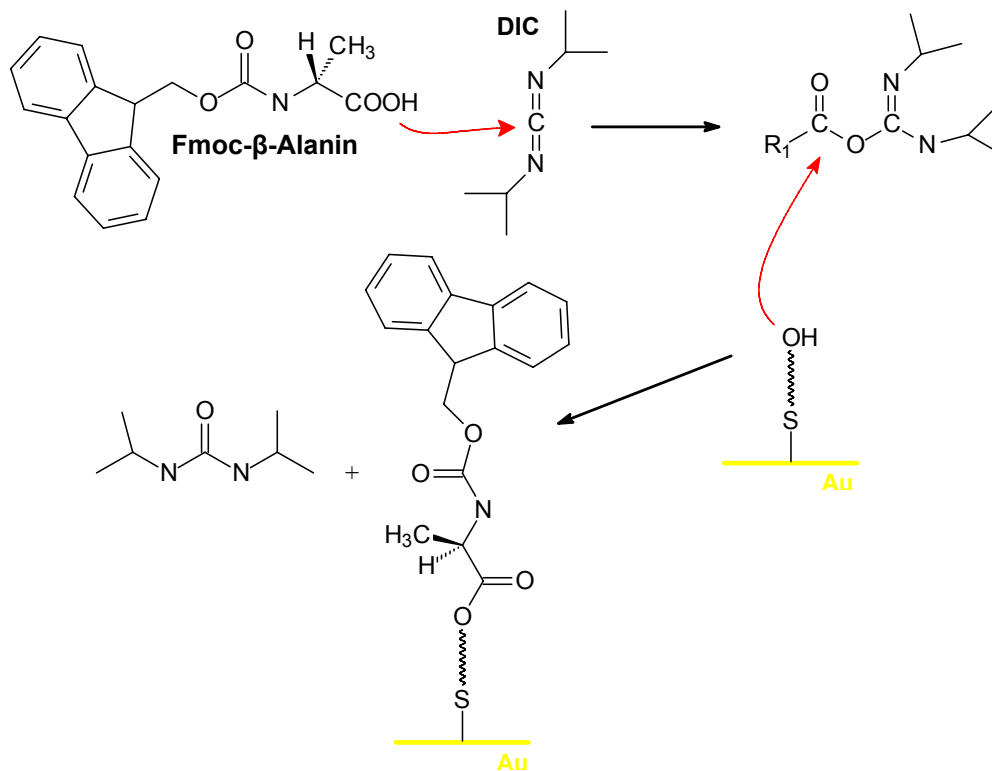


Abb. III.4-7: Aktivierung der Fmoc-geschützten Aminosäure β -Alanin mit DIC (N,N'-Diisopropylcarbodiimid) und kovalente Anbindung an eine Hydroxy-terminierte Oberfläche durch Ausbildung einer Ester-Bindung.

4.3.3 Kopplung von Antikörpern an funktionalisierte Oberflächen

4.3.3.1 COOH-terminierte Oberflächen

Der zu koppelnde Antikörper wird in einer Konzentration von 48 µg/mL in Acetat-Puffer gelöst (pH = 5.5).

Es werden 116 mg N-Hydroxysuccinimid (0.05 M) und 621 mg N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid (0.2 M) in 20 mL Millipore-Wasser gelöst und die COOH-terminierten Substrate in diese Lösung 7 min lang eingelegt. Anschließend werden die Oberflächen aus der Lösung entnommen, mit Millipore-Wasser abgewaschen, im N₂-Strom getrocknet und im Anschluss sofort mit der Lösung des zu koppelnden Antikörpers behandelt. Dieser wird in einer Konzentration von 48 µg/mL in Acetatpuffer (pH = 5.5) eingesetzt und mit einer Pipette auf den Oberflächen verteilt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h werden die Oberflächen zunächst mit Acetat-Puffer und dann mit Millipore-Wasser abgewaschen und im N₂-Strom getrocknet.

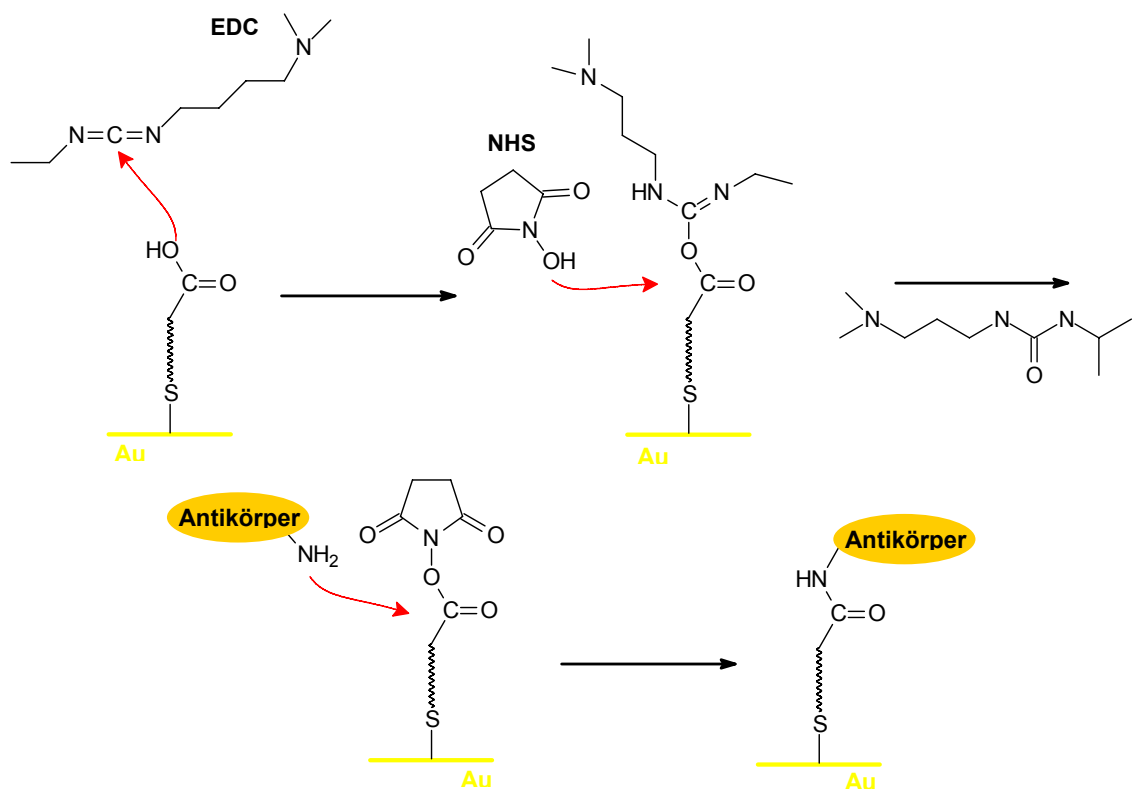


Abb. III.4-8: Aktivierung Carboxy-terminierter Oberflächenbeschichtungen durch Umsatz mit NHS und EDC (Ausbildung eines NHS-Aktivesters) und anschließende Immobilisierung durch Ausbildung einer Amid-Bindung.

4.3.3.2 *NH₂-terminierte Oberflächen*

Es wird eine 2.5%-ige Lösung von Glutardialdehyd in PBS-Puffer hergestellt und die aminotermi- nierten Oberflächen in diese Lösung 1 h lang eingelegt. Anschließend werden die Sub- strate aus der Lösung entnommen, mit PBS-Puffer und anschließend mit Millipore-Wasser abgewaschen und im N₂-Strom getrocknet. Die Oberflächen können nun bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt oder sofort mit dem zu koppelnden Antikörper umgesetzt werden. Dieser wird in einer Konzentration von 48 µg/mL in PBS-Puffer eingesetzt und mit einer Pipette auf der Aldehyd-terminierten Oberfläche verteilt. Nach einer Reaktionszeit von 3 h werden die Subs- trate mit PBS-Puffer und anschließend mit Millipore-Wasser gewaschen und im N₂-Strom getrocknet.

4.3.4 Integration von Peptiden in aminotermi- nierte Oberflächen und deren biomolekulare Erkennung

4.3.4.1 *Einführung des bifunktionellen Linkers Succinimidyl-4-(N- maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure (SMCC)*

Es wird eine Lösung von SMCC in DMF mit einer Konzentration von 3.4 mg/mL hergestellt und mit einer Pipette auf den aminotermi- nierten Oberflächen verteilt. Die Substrate werden in dieser Lösung über Nacht inkubiert (12 h), anschließend in DMF gewaschen und im N₂- Strom getrocknet.

4.3.4.2 *Kopplung Cystein-terminierter Peptide an Maleimido- funktionalisierte Oberflächen*

Zur Kopplung werden die Peptide in einer Konzentration von 1 mM in Natriumphosphatpuffer (pH = 7.0) gelöst (1.28 mg HA-Epitop/mL; 1.11 mg Flag-Epitop/mL) und die Peptidlösung mit einer Pipette auf den SMCC-terminierten Oberflächen verteilt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h werden die Oberflächen mit Natriumphosphat-Puffer und Millipore-Wasser abgewaschen und im N₂-Strom getrocknet. Zur Blockierung nicht-umgesetzter Maleimido-Funktionalitäten werden die Substrate anschließend für 1 h in einer 0.048 M Lösung von 2-Mercaptoethanol in Natriumphosphat-Puffer inkubiert. Die Oberflächen werden anschließend mit Phosphat- Puffer und Millipore-Wasser gewaschen und im N₂-Strom getrocknet.

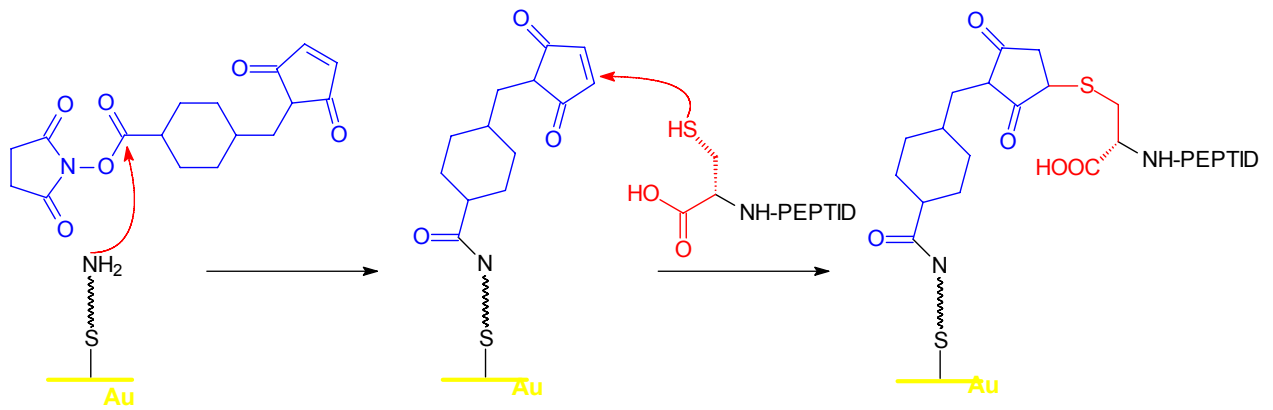


Abb. III.4-9: Umsetzung amino-terminierter Oberflächenbeschichtungen mit dem Linker SMCC und anschließende Immobilisierung von Peptiden mit carboxyterminalem Cysteinrest durch Addition der Thiolgruppe an die Maleimidofunktionalitäten der Oberfläche.

4.3.4.3 **Umsatz mit dem spezifischen und POD-markierten Sekundär-Antikörper**

Die spezifischen Antikörper (Maus-anti-Flag Antikörper für Epitop5; Maus-anti-HA Antikörper im Fall von Epitop2) werden in einer Konzentration von 1:500 in TBS/Tween-Puffer verdünnt und mit einer Pipette auf den Epitop-funktionalisierten Oberflächen verteilt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei Raumtemperatur werden die Oberflächen mit TBS/Tween-Puffer und anschließend mit Millipore-Wasser gewaschen. Anschließend wird sofort mit dem Peroxidase-markierten Zweitantikörper (POD-markierter Ziege-anti-Maus Antikörper) umgesetzt, der in einer Konzentration von 1:4000 in TBS/Tween-Puffer eingesetzt wird. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei Raumtemperatur werden die Oberflächen mit TBS/Tween-Puffer und anschließend mit Millipore-Wasser gewaschen und bis zur Verwendung in dem ELISA-Assay in PBS-Puffer eingelegt.

4.3.4.4 **Umsatz mit dem spezifischen und fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper**

Die spezifischen Antikörper (Maus-anti-Flag Antikörper für Epitop5; Kaninchen-anti-HA Antikörper im Fall von Epitop2) werden in einer Konzentration von 1:500 in TBS/Tween-Puffer verdünnt und mit einer Pipette auf den Epitop-funktionalisierten Oberflächen verteilt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h bei Raumtemperatur werden die Oberflächen mit TBS/Tween-Puffer und anschließend mit Millipore-Wasser gewaschen. Anschließend wird sofort mit dem Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern (anti-Maus-AlexaFluor®546 bzw. anti-Kaninchen-AlexaFluor®647) umgesetzt, die in einer Konzentration von 1:1000 in TBS/Tween-Puffer eingesetzt werden. Nach einer Reaktionszeit von 2 h im Dunkeln werden die Oberflächen mit

TBS/Tween-Puffer und Millipore-Wasser gewaschen, im N₂-Strom getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt. Die Fluoreszenz-Aufnahmen sollten möglichst am Tag der Präparation aufgenommen werden.

4.3.5 ELISA-Assay

4.3.5.1 Substratpufferlösung für ELISA (pH = 4.5)

1.67 g (7.9 mmol) Citronensäuremonohydrat, 2.14 g (12 mmol) Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat und 190 mg (0.348 mmol) ABTS werden in 200 mL Millipore-Wasser gelöst. Die leicht grün gefärbte Lösung wird bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

4.3.5.2 Bestimmung des Eichwertfaktors EF der POD-markierten Antikörper

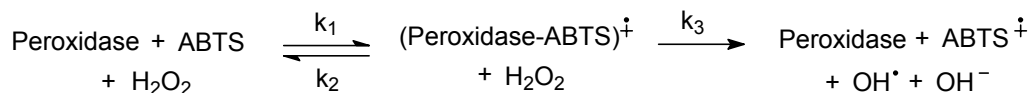
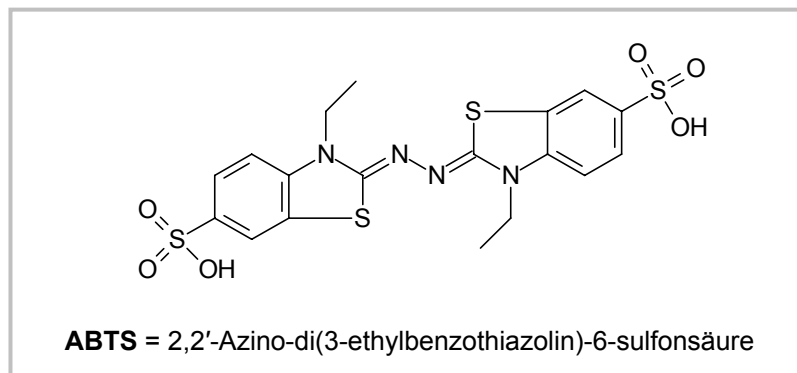


Abb. III.4-10: Peroxidase-katalysierte Umsetzung des Substrates ABTS (2,2'-Azino-di(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonsäure) zum Radikalkation nach dem enzymkinetischen Modell von Michaelis-Menten.

Zu je 2.5 mL der Substratpufferlösung werden verschiedene Volumina der POD-Konjugate pipettiert (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 µL der 0.8 mg/mL Antikörper-Stammlösung). Von der niedrigsten Konzentration an werden diese Antikörper-Lösungen nach der Reihe zur Bestimmung des Eichwerts in den ELISA-Anwendungen UV-spektrometrisch vermessen. Hierzu wird die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1 µL Wasserstoffperoxid (30%) gestartet und die Extinktion des entstehenden Farbstoffs bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen, wobei für eine gute Durchmischung der Reaktionslösung zu sorgen ist. Die Messungen wurden im Enzymkinetik-Modus der zugehörigen Programmsoftware aufgenommen, der eine zeitabhängige Extinktionsmessung bei einer festen Wellenlänge erlaubt.

Die für eine bestimmte POD-Menge gemessenen Extinktionswerte werden anschließend als Funktion der Zeit aufgetragen und die Steigungen der Geraden durch lineare Regression ermittelt (enzymkinetische Interpretation nach dem Modell von Michaelis-Menten). Zur Bestimmung des Eichwertfaktors EF der jeweiligen POD-Konjugate werden anschließend die ermittelten Steigungen (Einheit sec^{-1}) gegen die eingesetzte POD-Menge aufgetragen. Die Steigung dieser Geraden ergibt den Eichwertfaktor EF in der Einheit $(\text{ng} \cdot \text{sec})^{-1}$.

4.3.5.3 ELISA an beschichteten Substraten

In einer 1 cm x 1 cm Quarzglasküvette werden 2.5 mL der ELISA-Substratpufferlösung vorgelegt. Die mit einem POD-Konjugat funktionalisierten Oberflächen werden in Stücke geschnitten, so dass sie auf den Boden der Quarzglasküvette platziert werden können; hierbei ist darauf zu achten, dass die Probenstücke einen ungehinderten Strahlengang zulassen. Durch Zugabe von 1 μL Wasserstoffperoxid (30%) wird die enzymatisch-katalysierte Reaktion gestartet und die Bildung des Radikalkations $\text{ABTS}^{\cdot+}$ absorptionsspektrometrisch bei 405 nm detektiert, wobei für eine gute Durchmischung der Reaktionslösung zu sorgen ist. Die Messungen erfolgen auch hier im Enzymkinetik-Modus, der eine zeitabhängige Extinktionsmessung bei einer festen Wellenlänge erlaubt.

Mit Hilfe der Eichwertfaktoren EF kann die auf dem jeweiligen Probenstück immobilisierte Menge an POD-Konjugat (Einheit ng) bestimmt werden³; die Angabe der Massenbelegung des gebundenen POD-Konjugates ist darüber hinaus ebenfalls möglich. Hierzu werden die verwendeten Trägersysteme (Gold-bedampfte Glasobjektträger bzw. Si-Wafer) gewogen und die erhaltene Masse auf die jeweilige Fläche des verwendeten Trägers bezogen (Masse/Fläche; Einheit g/cm^2). Mit Hilfe dieses Wertes kann anschließend die jeweilige Immobilisationsfläche der in den ELISA-Anwendungen verwendeten Probenstückchen ermittelt werden, indem diese nach den Messungen gewogen werden. Die Division der ermittelten Menge des POD-Konjugates durch die Fläche der gemessenen Probe ergibt die Massenbelegung.

³ Diese Quantifizierung setzt voraus, dass sich die Enzymaktivität der Peroxidase im immobilisierten Zustand gegenüber derer in gelöster Form nicht wesentlich unterscheidet.

4.4 Verwendung Gold-bedampfter Si-Wafer als Trägersystem

4.4.1 Antikörper-Bindungsstudien / Antikörper-Antigen-Assays

Für eine Probenserie wurden im Durchschnitt 12 Waferstückchen einer Größe von etwa 0.5 cm x 1 cm verwendet. Diese werden mit dem jeweiligen Thiol nach der in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Vorschrift funktionalisiert. Die Carboxy- und Amino-Endgruppen der erzeugten Beschichtungen werden anschließend aktiviert oder mit einem geeigneten Linkermolekül funktionalisiert und nach der in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Prozedur mit einem POD-markierten Ziege-anti-Hase Erstantikörper umgesetzt. Ein Teil der Proben wird anschließend zur Charakterisierung zurückgelegt (FT-IR-, XPS-, Ellipsometrie- und ELISA-Messungen); die für den ELISA-Assay vorgesehenen Proben werden unter Millipore-Wasser aufbewahrt.

Die restlichen Proben werden zur Bestimmung der unspezifischen Adsorptionsrate im Anschluss sofort mit der Lösung eines falschen Antigens behandelt. Hierzu wurde ein POD-markierter Ziege-anti-Maus Antikörper in einer Konzentration von 48 µg/mL in PBS-Puffer verdünnt und auf die Oberflächen pipettiert. Nach einer Einwirkzeit von 1 h werden die Substrate mit PBS-Puffer und Millipore-Wasser gewaschen. Auch von diesen Proben wird ein Teil zur spektroskopischen Quantifizierung und für den ELISA-Assay zurückgelegt.

Die verbleibenden Proben werden unmittelbar nach diesem Schritt in der Lösung eines spezifischen Antigens inkubiert. Verwendet wurde in diesem Fall ein POD-markierter Hase-anti-Schaf Antikörper in einer Konzentration von 96 µg/mL in PBS-Puffer. Nach einer Inkubationszeit von 2 h werden die Substrate mit PBS-Puffer und Millipore-Wasser gewaschen; die gebundene Menge des Zweitantikörpers wird mit Hilfe des ELISA-Assays ermittelt.

Um eine Abnahme der Peroxidase-Aktivität zu vermeiden, ist es wichtig, dass die Oberflächen nicht über längere Zeit im trockenen Zustand gehalten werden. Daher sollte nach den jeweiligen Waschsritten möglichst sofort mit dem nächsten Antikörper umgesetzt werden. Die für den ELISA-Assay vorgesehenen Proben werden bis zur Verwendung in PBS-Puffer aufbewahrt und sollten ebenfalls möglichst sofort in dem Assay eingesetzt werden.

Die zur spektroskopischen Charakterisierung zurückgelegten Proben werden unter Schutzgas bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

4.4.2 Proteinresistenz-Studien

4.4.2.1 *Behandlung mit einer Fibrinogen-Lösung*

Humanes Fibrinogen wird in einer Konzentration von 1 mg/mL in PBS-Puffer gelöst, 15 min gerührt und anschließend zur Abtrennung nicht-gelöster faseriger Bestandteile durch einen Spritzenvorsatzfilter (Satorius Minisart, Porengröße 0.45 µm) gedrückt. Die zu untersuchen-

den Proben werden auf den Boden eines 50 mL Schraubdeckelgläschens platziert, mit 5 mL Millipore-Wasser überschichtet und 10 min in dieser Lösung vorgequollen. Anschließend werden 10 mL der hergestellten Fibrinogenlösung zugegeben und das Probengläschen zur Vermischung vorsichtig geschwenkt. Nach einer Adsorptionszeit von 1 h wird die Fibrinogenlösung vor der Entnahme der Substrate zur Vermeidung einer Ausbildung von Langmuir-Blodgett-Filmen zunächst stark verdünnt (mit etwa 500 mL Millipore-Wasser). Die Oberflächen werden anschließend mit Millipore-Wasser gewaschen und im N₂-Strom getrocknet.

4.4.2.2 *Behandlung mit Blutplasma*

Die zu untersuchenden Proben werden auf den Boden eines 50 mL Schraubdeckelgläschens platziert, mit 5 mL Millipore-Wasser überschichtet und 10 min in dieser Lösung vorgequollen. Anschließend werden 5 mL der Blutplasma-Lösung zugegeben und das Probengläschen zur Vermischung vorsichtig geschwenkt. Nach einer Adsorptionszeit von 1 h wird die Plasma-Lösung vor der Entnahme der Substrate zur Vermeidung einer Ausbildung von Langmuir-Blodgett-Filmen zunächst stark verdünnt (mit etwa 500 mL Millipore-Wasser). Die Oberflächen werden anschließend mit Millipore-Wasser gewaschen und im N₂-Strom getrocknet.

4.4.3 Integration von Peptiden und deren biomolekulare Erkennung

Für eine Probenserie wurden im Durchschnitt etwa 12 Wafer-Stückchen einer Größe von ca. 0.5 cm x 1 cm verwendet. Nach jedem Funktionalisierungsschritt werden einige Proben zur Charakterisierung (FT-IR-, XP-Spektroskopie, Ellipsometrie- und ELISA-Messungen) zurückgelegt. Die für den ELISA-Assay vorgesehenen Proben werden unter Millipore-Wasser aufbewahrt und möglichst sofort vermessen; die restlichen Proben werden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Umsetzung mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper konnte auf diesen Substraten fluoreszenzspektroskopisch nicht nachgewiesen werden, da die Fluoreszenz durch die Goldschicht des Trägers gequenchet wird. Die Bindung des epitop-spezifischen Erstantikörpers wurde daher durch Verwendung Peroxidase-markierter Zweitantikörper mit Hilfe des ELISA-Assays nachgewiesen.

Die Funktionalisierung der Oberflächen mit den Peptiden und die Umsetzung mit dem Erst- und fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper erfolgte nach dem in Abschnitt 4.3.4 beschriebenen Protokoll.

4.4.4 Filmbildungskinetik in Abhängigkeit vom Gasgehalt

50 mL der jeweiligen Thiol-Lösung werden in einen 100 mL Schlenkkolben gefüllt. Zur Herstellung einer N₂- oder O₂-gesättigten Lösung wird diese zunächst im leichten Vakuum (10⁻² mbar) unter Rühren vom gelösten Restgas befreit. Nach einer Zeit von etwa 10 min, wenn keine Gasblasen mehr aus der Lösung treten, wird das jeweilige Gas zur Sättigung für etwa 10 Minuten in die Lösung geleitet. Anschließend werden Gold-bedampfte Si-Wafer einer Größe von etwa 0.5 cm x 1 cm für unterschiedliche Zeiten (1, 3, 6, 30, 60, 180, 300, 1000 min) in diese Lösung eingelegt. Die Öffnung der Gefäße erfolgte stets im Gegenstrom des jeweiligen Gases.

Für eine Probenserie (bzw. eine Filmbildungskinetik) wurde ein und dieselbe Thiollösung verwendet. Zur Präparation jeder einzelnen Probe wurde die Lösung zunächst entgast und anschließend wieder mit dem jeweiligen Gas gesättigt.

Die aus der Thiollösung entnommenen Substrate werden mit DMF und anschließend mit Ethanol gewaschen und anschließend im N₂-Strom getrocknet.

4.5 Verwendung LSPR-aktiver Nanopartikeloberflächen als Trägersystem

4.5.1 Eichwertbestimmung durch Adsorption von Alkanthiolen verschiedener Kettenlänge

Vor der Adsorption der Thiole werden die Nanopartikeloberflächen 2 Stunden lang einer Ozonolyse unterzogen, um die im Verlauf der Präparation in die Oberflächen eingebauten organischen Bestandteile (hauptsächlich PEI) oxidativ zu entfernen.

Es werden 1 mM Lösungen der Alkanthiole Butanthiol, Dekanthiol, Dodekanthiol, Tetradekanthiol, Hexadekanthiol und Oktadekanthiol in Ethanol hergestellt.

Für jede Thiollösung wurde eine Nanopartikelplatte verwendet (Gold-bedampfter Glasobjektträger mit insge-

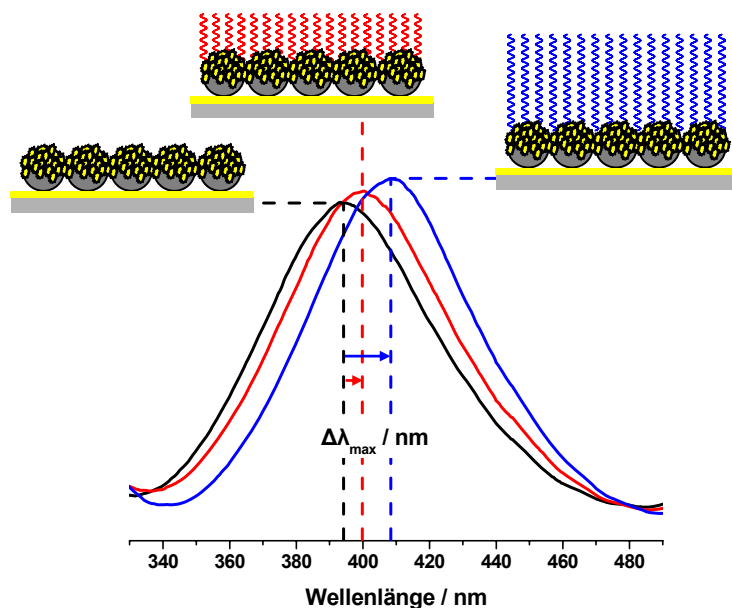


Abb. III.4-11: Bestimmung des Eichwertfaktors der LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen bezüglich Massenbelegung und Schichtdicke auf diesen ausgebildeter Adsorbatlagen.

samt 12 Nanopartikel-Probenspots). Diese wurden zuvor (nach der Ozonolyse) LSPR-spektroskopisch vermessen.

Die Platten werden nun in eine Petrischale gelegt und mit 20 mL der jeweiligen Thiollösung überschichtet. Nach einer Adsorptionszeit von etwa 12 h werden die Platten aus der Lösung entnommen, mit Ethanol abgespült und im N₂-Strom getrocknet. Von den einzelnen Probenspots werden nach der Thiol-Adsorption nochmals LSPR-Spektren aufgenommen.

Die Schichtdicke der Monolagen wurde XP-spektroskopisch über die Abschwächung der Au4f-Intensität bestimmt.

Der gewöhnlich in XPS-Anwendungen zum Abtrag organischer Monolagen eingesetzte Beschuss der Oberfläche mit Argon-Atomen (Sputtern) führte hier ebenfalls zu einer Ablösung der Goldbeschichtung, die in den XP-Spektren am Auftreten eines Titan-Signals (Haftvermittler zu erkennen war. Als mildere Methode zum Abbau der Thiol-Monolagen wurde daher eine Ozonolyse eingesetzt, durch welche die Monolagen oxidativ entfernt werden. Hierzu wurden die Oberflächen über einen Zeitraum von etwa 2-3 Stunden mit UV-Licht bestrahlt. Die Effektivität dieser Variante ist am Verschwinden des C1s-Signals sowie am deutlichen Anstieg der Au4f-Intensität erkennbar.

Zur Bestimmung des Bedeckungsgrades wurden die von einem bestimmten Probenspot vor und nach der Thiol-Adsorption aufgenommenen XP-Spektren miteinander verrechnet.

4.5.2 Eichwertbestimmung durch Adsorption von PEG-Thiolen verschiedener Kettenlänge

Die Durchführung erfolgte analog zu der in Abschnitt 4.5.1 für die Adsorption der Alkanthiole beschriebenen. Zur Adsorption wurden hier jedoch 500 µM Lösungen der Verbindungen EG3OH, EG6OH, EG13OH, EG22OH, EG17NH₂, EG31NH₂, EG30COOH und EG36COOH in DMF verwendet.

4.5.3 Flächige Biofunktionalisierungen

4.5.3.1 Durchführung von Antikörper-Antigen-Assays

Für eine Probenserie wurde eine Probenplatte mit insgesamt 12 Probenspots verwendet. Diese wird zum Abbau der in der Präparation eingesetzten organischen Bestandteile einer Ozonolyse unterzogen (2h) und anschließend LSPR-spektroskopisch vermessen.

Anschließend wird die Platte mit dem jeweiligen Thiol funktionalisiert (Vorschrift s. Abs. 4.3.1) und wiederum LSPR-Spektren von jedem Probenspot aufgenommen; für XPS-Aufnahmen werden Proben zurückgelegt.

Die Carboxy- und Amino-Endgruppen der erzeugten Beschichtungen werden anschließend aktiviert oder mit einem geeigneten Linkermolekül funktionalisiert (Protokoll s. Abs. 4.3.3) und nach der in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Prozedur mit einem POD-markierten Ziege-anti-Hase Erstantikörper umgesetzt. Die Probenspots werden LSPR-spektroskopisch vermessen und einige Proben für XPS- und ELISA-Messungen verwendet.

Die restlichen Proben werden nach den LSPR-Messungen sofort mit dem spezifischen Antigen umgesetzt; verwendet wurde ein POD-markierter Hase-anti-Schaf Antikörper in einer Konzentration von 96 µg/mL in PBS-Puffer. Nach einer Inkubationszeit von 2 h werden die Substrate mit PBS-Puffer und Millipore-Wasser gewaschen, im N₂-Strom getrocknet und LSPR-spektroskopisch vermessen. Von einigen Proben werden XP-Spektren aufgenommen; weitere Proben werden in ELISA-Anwendungen eingesetzt.

Die für den ELISA vorgesehenen Proben werden direkt nach der Funktionalisierung mit dem Antikörper bis zur Verwendung in dem Assay in Millipore-Wasser eingelegt; die restlichen Proben werden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Die Bestimmung der Schichtdicke erfolgte XP-spektroskopisch über die Abschwächung des Au4f-Signals. Die Au4f-Intensität der unfunktionalisierten Probenspots wurde entweder direkt nach der Ozonolyse oder nach der oxidativen Desorption der adsorbierten Thiolmonolagen ermittelt (2 - 3-stündige UV-Bestrahlung an Luft).

Die auf diese Weise erhaltenen Au4f-Basisintensitäten wurden auch zur Bestimmung der Schichtdicke der restlichen auf der Platte durchgeführten Funktionalisierungsschritte verwendet. Zur Bestimmung der Schichtdicke ist es erforderlich von jeder der eingesetzten Nanopartikel-Platten die individuelle Au4f-Basisintensität zu bestimmen, da diese von Platte zu Platte gegebenenfalls größere Abweichungen zeigt.

4.5.3.2 Durchführung von Peptid-Assays

Die Integration der Peptidassays erfolgte wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben; es wurden aus der Maus isolierte Erstantikörper verwendet, die anschließend mit einem POD-markierten Ziege-anti-Maus Antikörper umgesetzt wurden. Für eine Probenserie (Verwendung von Epi-top2 bzw. von Epi-top5) wurde je eine Nanopartikelplatte mit insgesamt 12 Probenspots verwendet.

Nach jedem Funktionalisierungsschritt wurden LSPR-Spektren aufgenommen und einige Proben für XPS-Messungen zurückgelegt.

Die Bestimmung der Schichtdicke erfolgte XP-spektroskopisch über die Abschwächung des Au4f-Signals. Die Au4f-Intensität der unfunktionalisierten Probenspots wurde entweder direkt nach der Ozonolyse oder nach der oxidativen Desorption der adsorbierten Thiolmonolagen ermittelt (2 - 3-stündige UV-Bestrahlung an Luft).

4.5.3.3 Refunktionalisierung nach oxidativem Abbau organischer Monolagen

Für jede Probenserie wurden parallel zwei Nanopartikelplatten mit je 12 Probenspots bearbeitet. Die Spots der einen Platte wurden nach den verschiedenen Funktionalisierungsschritten und Aufnahme der LSPR-Spektren von der Platte abgetrennt und für XPS-Messungen zurückgelegt. Die andere Platte war ausschließlich für LSPR- und nach der Bindung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers durchzuführende Fluoreszenzaufnahmen vorgesehen (in dem verwendeten Fluoreszenzscanner können nur Proben von Objektglaträger-Größe eingelegt werden).

Vor der Adsorption der Thiole wurden zunächst LSPR-Spektren aufgenommen und die Platte anschließend mit dem Thiol EG6OH oder EG13OH funktionalisiert. Im nächsten Schritt wurden diese Monolagen durch eine 3-stündige Ozonolyse (UV-Bestrahlung in Umgebungsluft) oxidativ entfernt und die Oberflächen erneut mit dem aminotermiierten PEG-Thiol EG17NH₂ umgesetzt. Nach Einführung des Linkers Glutardialdehyd konnten anschließend (nach der in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Vorschrift) die fluoreszenzmarkierten Antikörper anti-Maus-AlexaFluor®546 und anti-Kaninchen-AlexaFluor®647 kovalent an die Probenspots der Platte gebunden werden; diese wurden in einer Konzentration von 1:1000 in TBS/Tween-Puffer eingesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 2 h werden die Oberflächen mit TBS/Tween-Puffer und Millipore-Wasser gewaschen und im N₂-Strom getrocknet.

Nach jedem der beschriebenen Funktionalisierungsschritte wurden LSPR-Spektren aufgenommen und einige Proben für XPS-Messungen zurückgelegt. Zur Bestimmung der Schichtdicke wurde die Au4f-Basisintensität vor der Thioladsorption XP-spektroskopisch ermittelt.

4.5.4 Strukturierte Biofunktionalisierungen

4.5.4.1 Einbau von Peptid-Arrays

Für jede Probenserie wird eine Nanopartikelplatte mit insgesamt 12 Probenspots verwendet. Nach der Funktionalisierung der Platten mit dem Thiol EG17NH₂ oder EG31NH₂ wird nach der in Abschnitt 4.3.4 beschriebenen Vorschrift der Linker SMCC eingeführt und anschließend das Peptidpitop 2 mit Hilfe eines Spotroboters in einem Volumen von 1 nL und einer Anzahl von 10 x 10 Spots (Spotabstand 0.5 cm) bzw. 5 x 4 Spots (Spotabstand 1.0 cm) auf die Proben gespottet.

Um ein Eintrocknen der Peptidlösung auf dem Träger während des Spotprozesses zu vermeiden, wird dieser in einer mit einem feuchten Filterpapier ausgelegten Petrischale gelagert. Die folgenden Umsetzungen mit dem Erst- und fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper erfolgen analog zu der bereits in Abschnitt 4.3.4 beschriebenen Prozedur.

Die auf diese Weise bio-strukturierten Nanopartikeloberflächen (strukturierter Bereich von etwa 1 cm x 1 cm) wurden anschließend in Abständen von 50 µm abgerastert und LSPR-Spektren aufgenommen, so dass ein LSPR-Bild von der Oberfläche erzeugt werden konnte. Außerdem wurden Fluoreszenzaufnahmen von den Oberflächen aufgenommen.

4.5.5 Photochemische Strukturierung

4.5.5.1 Kopplung von Antikörpern an eine photochemisch strukturierte EG31NH₂-Monolage und Blockieren mit BSA

Nach der Funktionalisierung der Nanopartikeloberflächen mit dem Thiol EG31NH₂ (Vorschrift s. Abs. 4.3.1) werden die jeweiligen Photomasken aufgelegt und die Platten zur oxidativen Strukturierung 10 Minuten lang mit UV-Licht in Sauerstoffatmosphäre bestrahlt. Die Oberflächen werden anschließend mit Ethanol abgespült und im N₂-Strom getrocknet. Anschließend wird eine 1%-ige BSA-Lösung in PBS-Puffer angesetzt, filtriert und die Substrate 1 h lang in dieser Lösung inkubiert. Vor der Entnahme der Proben aus der Proteinlösung wird diese zunächst stark verdünnt; die Proben werden mit Millipore-Wasser gewaschen und im N₂-Strom getrocknet. Nach der in Abschnitt 4.3.3.2 beschriebenen Vorschrift wird anschließend der Linker Glutardialdehyd eingeführt und der fluoreszenzmarkierte anti-Kaninchen-AlexaFluor®647-Antikörper kovalent gebunden, der in einer Konzentration von 1:1000 in TBS/Tween-Puffer eingesetzt wird. Nach einer Reaktionszeit von 2 h werden die Oberflächen mit TBS/Tween-Puffer und Millipore-Wasser gewaschen und im N₂-Strom getrocknet.

Die photochemisch strukturierten Bereiche (strukturierter Bereich von etwa 1 cm x 1 cm) wurden anschließend in Abständen von 50 µm abgerastert und LSPR-Spektren aufgenommen, so dass ein LSPR-Bild erzeugt werden konnte; außerdem wurden Fluoreszenzbilder von den Oberflächen aufgenommen.

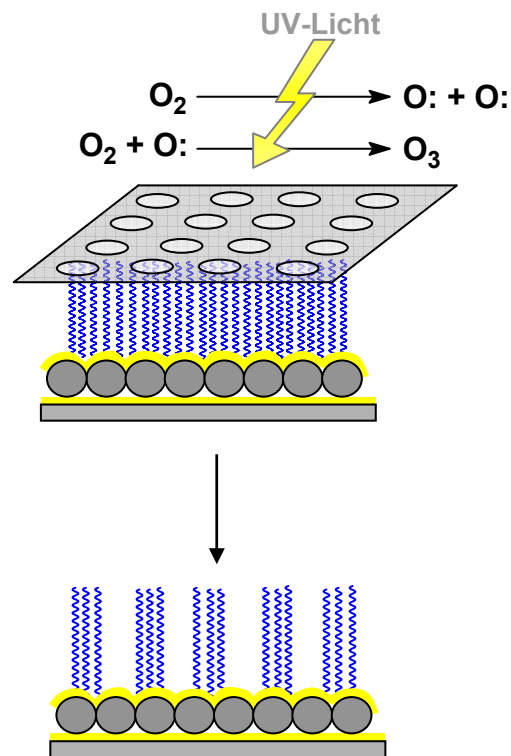


Abb. III.4-12: Oxidative Strukturierung auf Nanopartikeloberflächen aufgebracht organischer Monolagen durch UV-Bestrahlung (Ozonolyse).

4.5.5.2 *Kopplung von Antikörpern an eine photochemisch strukturierte EG31NH₂-Monolage und Füllen der Photo-Löcher mit EG22OH*

Nach der Funktionalisierung der Oberflächen mit dem Thiol EG31NH₂ (Vorschrift s. Abs. 4.3.1) erfolgte die oxidative Strukturierung der Oberflächen (UV-Bestrahlung der Oberflächen über Photomasken) analog zu der in Abschnitt 4.5.5.1 beschriebenen Vorschrift. Die Oberflächen wurden mit Ethanol p.a. abgespült und 5 Stunden in eine 500 µM Lösung des PEG-Thiols EG22OH in DMF eingelegt, anschließend mit DMF und Ethanol abgespült und im N₂-Strom getrocknet. Nach der in Abschnitt 4.3.3.2 beschriebenen Vorschrift wurde nun der fluoreszenzmarkierte anit-Kaninchen-AlexaFluor®647-Antikörper kovalent gebunden. Die photochemisch strukturierten und biofunktionalisierten Bereiche (Größe ca. 1 cm x 1 cm) wurden in Abständen von 50 µm abgerastert und LSPR-Spektren aufgenommen, so dass ein LSPR-Bild erzeugt werden konnte; außerdem wurden Fluoreszenzbilder von den Oberflächen aufgenommen.

4.5.5.3 *Kopplung von Peptidepitopen an eine photochemisch strukturierte EG31NH₂-Monolage und Blockieren mit BSA*

Die Funktionalisierung (Adsorption von EG31NH₂) und photochemische Strukturierung der Oberflächen erfolgte analog zu dem in Abschnitt 4.5.5.1 beschriebenen Protokoll. Anschließend wurden die aminoterminierten Strukturen mit dem Linker SMCC umgesetzt, das Peptidepitop₂ und folgend der epitop-spezifische Erst- und der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper gebunden (Vorschrift s. Abs. 4.3.4).

Die photochemisch strukturierten Bereiche (Größe von ca. 1 cm x 1 cm) werden in Abständen von 50 µm abgerastert und LSPR-Spektren aufgenommen, so dass ein LSPR-Bild erzeugt werden konnte; außerdem wurden Fluoreszenzbilder von den Oberflächen aufgenommen.

Kapitel IV

Ergebnisse und

Diskussion

IV.I Endgruppenfunktionalisierte Polyethylenglykol-Beschichtungen

1 Poteinbindungskapazität und Resistenz gegenüber unspezifischer Protein-Adsorption

Innerhalb dieser Arbeit zeigte sich, dass die Antikörper-Bindungskapazität auf Au-Oberflächen chemisorbierter Polyethylenglykol-Monolagen mit zunehmender Kettenlänge abnimmt. Trotz vergleichbaren Bedeckungsgrades konnten im Fall des EG36COOH mit einer mittleren EG-Anzahl von 36 Einheiten im Vergleich zu dem bereits in der Literatur beschriebenen EG33COOH nur sehr geringe Bindungsraten erzielt werden. Es bestand daher die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen der Kettenlänge dieser Verbindungsklasse und ihrer Proteinresistenz, da bei vergleichbarem Bedeckungsgrad von einer ähnlichen Konformation und Zugänglichkeit der zur Proteinbindung genutzten Endgruppen-Funktionalitäten ausgegangen werden kann. Steigt die Proteinresistenz dieser PEG-Beschichtungen jedoch mit zunehmender Anzahl der EG-Einheiten an, so gibt es eventuell eine Schwelle, ab der die Repulsionskräfte einer solchen Oberfläche eine Proteinannäherung und somit auch eine kovalente Bindung an die PEG-Matrix unterbinden.

Um diese Fragestellung zu klären, wurden polymere Ethylenglykole mit unterschiedlicher Anzahl mittlerer EG-Einheiten und verschiedener Endgruppenfunktionalitäten synthetisiert (s. Kap. III, Abs. 4.1) und hinsichtlich ihrer Antikörper-Bindungskapazitäten sowie ihrer Resistenz gegenüber einer unspezifischen Proteinadsorption untersucht.

Die Verbindungen wurden unter Ausbildung selbst-aggregierender Monolagen auf Au-be-dampften Si-Wafern adsorbiert und Antikörper an die aktivierten Endgruppenfunktionalitäten kovalent gebunden. Anhand des mit der Protein-Bindung verbundenen Intensitätsanstiegs der Amid-I-Bande in den FT-IR-Spektren sowie des ellipsometrisch bestimmten Schichtdickenanstiegs konnte die Kopplungsrate quantifiziert werden.

In den Röntgenphotoelektronenspektren führt die Bindung der Proteine zu zusätzlichen C1s- und O1s-Signalen sowie zum Auftreten eines Stickstoff-Signals, so dass der Bindungsprozess auch durch eine Aufnahme von XP-Spektren qualitativ nachvollzogen werden kann.

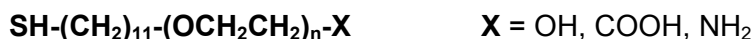
Über die Verwendung Peroxidase-markierter Erst- und Zweitantikörper konnte ihre Bindungsrate zusätzlich mittels des in Kap. III, Abs. 4.3.5 beschriebenen Oberflächen-modifizierten ELISA-Assays ermittelt werden.

Zur Bestimmung ihrer Resistenz gegenüber unspezifischer Protein-Adsorption wurden die erzeugten PEG-Beschichtungen mit einer Fibrinogen- und Blutplasma-Lösung behandelt; die

unspezifische Adsorptionsrate konnte auch hier durch Aufnahme von FT-IR- und Röntgenphotoelektronenspektren sowie anhand des mit der Protein-Adsorption verbundenen Schichtdickenanstiegs ermittelt werden.

1.1 Zielsetzung und Methoden

Zur Analyse einer eventuellen Abhängigkeit der Proteinresistenz endgruppen-funktionalisierter PEG-Beschichtungen von ihrer mittleren Kettenlänge und funktionellen Terminierung, wurden polymere Ethylenglykol-Thiole des Typs



synthetisiert.

Der Index n steht hierbei für die mittlere Anzahl der EG-Einheiten, die einen Bereich von 15 bis maximal 40 mittleren EG-Einheiten abdecken und X für die Art der Endgruppe. Bei Letzterer handelt es sich entweder um eine Hydroxy- (OH), Amino- (NH₂) oder eine Carboxy- (COOH) Terminierung. Diese Funktionalitäten bieten eine Vielzahl an Möglichkeiten zur kovalenten Bindung von Biomolekülen, wie z.B. von Proteinen.

Der aus 11 C-Einheiten bestehende Alkanspacer wurde eingeführt, um den Selbstordnungsprozess der PEG-Ketten zu fördern. Die starken van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten bewirken die Ausbildung einer geordneten Alkanthiol-Basissschicht mit einer all-trans-Konformation der CH₂-Einheiten und einem Tiltwinkel von 30° zur Oberflächennormalen; hierdurch wird folglich auch eine gestreckte Ausrichtung der PEG-Ketten und ein Konformationsübergang in eine quasi-kristalline Modifikation unterstützt.

In der Tabelle IV.1.1-1 sind die synthetisierten Verbindungen und die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt.

<i>Abkürzung</i>	<i>Strukturformel</i>	<i>n</i>	<i>X</i>
EG15COOH	SH-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₁₅ -OCH ₂ -COOH	15	COOH
EG22COOH	SH-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₂₂ -OCH ₂ -COOH	22	COOH
EG30COOH	SH-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₃₀ -OCH ₂ -COOH	30	COOH
EG36COOH	SH-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₃₆ -OCH ₂ -COOH	36	COOH
EG17NH ₂	SH-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₁₇ -NH ₂	17	NH ₂
EG31NH ₂	SH-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₃₁ -NH ₂	31	NH ₂
EG40NH ₂	SH-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₄₀ -NH ₂	40	NH ₂
EG13OH	SH-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₁₃ -OH	13	OH
EG22OH	SH-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₂₂ -OH	22	OH

Tab. IV.1.1-1: Übersicht der in den Protein-Bindungs- und adsorptionsstudien eingesetzten endgruppenfunktionalisierten Polyethylenglykolverbindungen.

Zu beachten ist hierbei, dass die aufgeführten Verbindungen eine Kettenlängen-Verteilung aufweisen, die anhand ihrer MALDI⁴-Spektren analysiert werden kann. Die in der Tabelle IV.1.1-1 angegebene Kettenlänge entspricht daher einer mittleren EG-Anzahl; die Kettenlängenverteilung der Verbindungen erstreckt sich über einen Bereich von etwa $n \pm 11$ Einheiten. Für die ausgebildeten Monolagen hat diese Verteilung zur Folge, dass längere PEG-Ketten aus der helikal geordneten Matrix herausragen und zur Ausbildung einer amorphen Oberflächenstruktur führen.

Nach ihrer Adsorption auf Gold-bedampften Si-Wafern wurden die erzeugten PEG-Beschichtungen zur Bestimmung ihrer Proteinbindungskapazität in Antikörper-Bindungsstudien eingesetzt (s. Abschnitt 1.2). Hierzu wurde nach einer entsprechenden Aktivierung der funktionellen Endgruppe oder der Einführung von Linker-Molekülen zunächst ein Erstantikörper kovalent gebunden. Die Rezeptor-funktionalisierten Oberflächen wurden anschließend mit der Lösung eines falschen Antigens behandelt und die unspezifische Adsorptionsrate bestimmt; folgend wurde das spezifische Antigen zugesetzt und auch diese Bindungsrate quantifiziert.

In weitergehenden Proteinresistenz-Studien wurden die nach der Thiol-Adsorption erhaltenen PEG-Beschichtungen einer konzentrierten Fibrinogen- und einer Blutplasma-Lösung ausgesetzt und die mit dieser Behandlung verbundene unspezifische Adsorptionsrate ermittelt (s. Abschnitt 1.3).

⁴ MALDI = matrix assisted laser desorption ionisation

1.1.1 Antikörper-Bindungsstudien

Die Amino- und Carboxy-Endgruppen der erzeugten PEG-Beschichtungen wurden zunächst aktiviert oder mit einem geeigneten Linkermolekül umgesetzt, so dass als Rezeptormolekül zunächst ein Erstantikörper kovalent an die PEG-Matrix gebunden werden konnte. Die in den folgenden Umsetzungsschritten (unspezifische Antikörper-Adsorption auf den Rezeptorfunktionalisierten Oberflächen; biomolekulare Erkennung des Antikörpers durch das spezifische Antigen) erzielten Bindungsraten sind dagegen nicht-kovalenter Art und beruhen unter anderem auf van-der-Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungskräften sowie der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen.

1.1.1.1 COOH-terminierte PEG-Beschichtungen

Nach der Adsorption der in der Tabelle IV.I.1-1 aufgeführten COOH-terminierten PEG-Thiole wurden die Carboxy-Endgruppen der erhaltenen Monolagen zunächst durch Behandlung mit NHS/EDC zu einem N-Hydroxysuccinimid-Aktivester umgesetzt, der mit den Aminogruppen der Antikörper unter Ausbildung einer Amid-Bindung reagiert. Die einzelnen Umsetzungsschritte sind in der Abbildung IV.I.1-1 dargestellt.

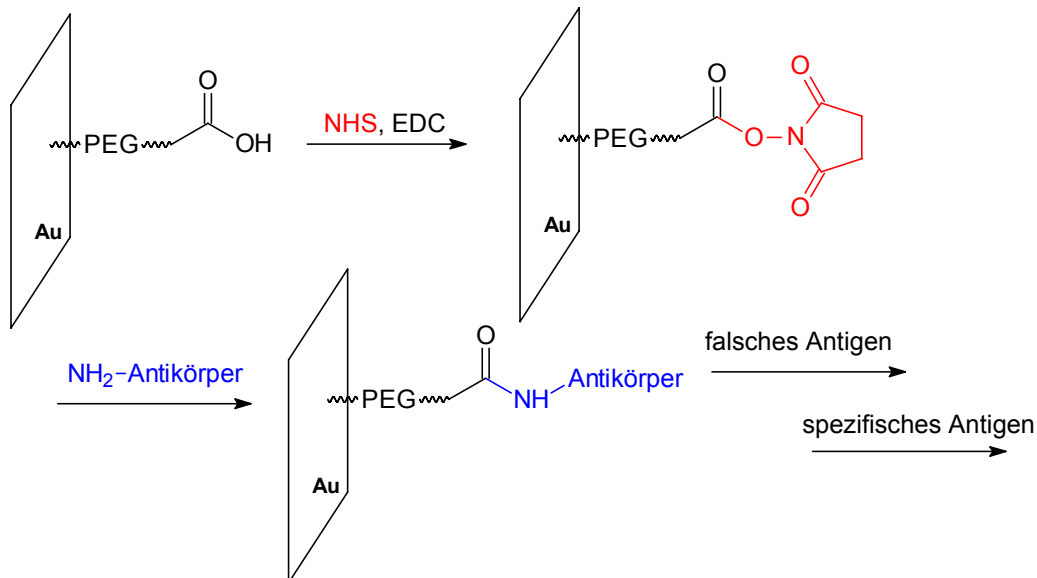


Abb. IV.I.1-1: Schematische Darstellung der kovalenten Bindung von Antikörpern an COOH-terminierte Oberflächenbeschichtungen.

1.1.1.2 NH_2 -terminierte PEG-Beschichtungen

Zur Integration von IgG-Molekülen in die aminoterminierten Beschichtungen wurde das Linkermolekül Glutardialdehyd verwendet. Dieses reagiert mit Aminogruppen unter Ausbildung von Iminbindungen und ermöglicht so eine kovalente Fixierung von Antikörpern über deren freie NH_2 -Gruppen. Die einzelnen Umsetzungsschritte sind in der Abbildung IV.I.1-2 schematisch dargestellt.

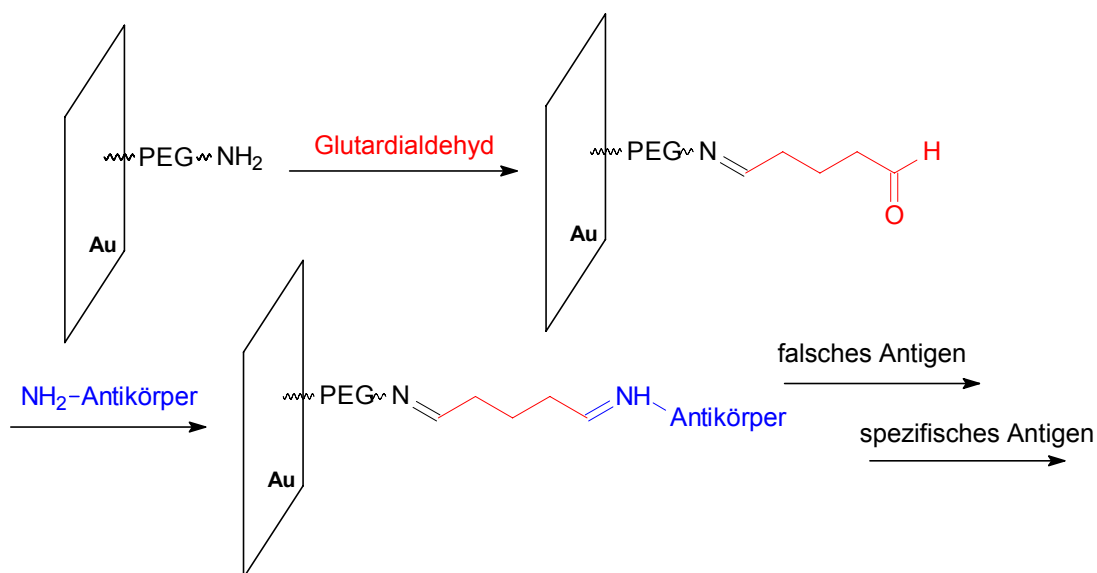


Abb. IV.I.1-2: Schematische Darstellung der kovalenten Anbindung von Antikörpern an NH_2 -terminierte Oberflächenbeschichtungen über den Linker Glutardialdehyd.

1.1.2 Resistenz gegenüber unspezifischer Protein-Adsorption

Zur Bestimmung ihrer Resistenz gegenüber unspezifischer Protein-Adsorption wurden die nach der Thiol-Adsorption erhaltenen PEG-Monolagen mit einer konzentrierten Fibrinogen- und Blutplasma-Lösung behandelt und die Adsorptionsrate mittels der in Abschnitt 1.1.3 beschriebenen Methoden bestimmt.

1.1.2.1 *Behandlung mit einer konzentrierten Fibrinogenlösung*

Zur *in-vitro*-Bestimmung ihrer Proteinresistenz wurden die Carboxy-, Amino- und Hydroxy-terminierten PEG-Beschichtungen nach dem in Kapitel III beschriebenen Protokoll durch Behandlung mit einer konzentrierten Fibrinogen-Lösung hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber unspezifischer Proteinadsorption untersucht.

Als Testprotein wurde hierbei Fibrinogen gewählt, da dieses ein hohes Haftvermögen aufweist und eine Oberfläche, welche sich gegenüber einer Fibrinogen-Exposition als resistent erweist, im allgemeinen auch eine Abscheidung anderer Proteine verhindert.

Da laut Literatur zum einen der Hydrathülle als auch dem sich in der PEG-Matrix ausgebildeten Protolyse-Gleichgewicht eine entscheidende Bedeutung hinsichtlich der Proteinresistenz zugesprochen wird, wurden die PEG-funktionalisierten Oberflächen zunächst mit der verwendeten Pufferlösung überschichtet und vor Zusatz der Fibrinogen-Lösung 10 Minuten in diesem wässrigen Medium vorgequollen, um eine effektive Hydratatisierung der PEG-Ketten zu gewährleisten.

Im Fall der hier betrachteten carboxy- und aminoterminierten PEG-Beschichtungen ist ebenfalls mit einer Beeinflussung des Protolyse-Gleichgewichtes durch diese funktionellen Endgruppen zu rechnen, welche zu einer Ausbildung von effektiven Oberflächenladungen führt. Eine besondere Strukturierung des Hydratwassers wäre infolge dipolarer Wechselwirkungen mit den funktionellen Endgruppen ebenfalls denkbar.

1.1.2.2 *Behandlung mit Blut-Plasma*

Zur Bestimmung ihrer Resistenz gegenüber einer unspezifischen Adsorption bei Behandlung mit komplexeren und real-biologischen Medien wurden die Oberflächen mit einer Blutplasma-Lösung behandelt. Diese enthält eine Vielzahl verschiedener Plasmaproteine, Lipide und weitere organische Bestandteile, die ebenfalls auf den Oberflächen adhären können. Auch in diesen Studien wurden die Oberflächen zunächst 10 Minuten in wässriger Lösung vorgequollen, bevor die Blutplasma-Lösung zugegeben wurde; vor Entnahme der Substrate wurde die Inkubationslösung zur Vermeidung einer Langmuir-Blodgett-Adsorption zunächst stark verdünnt.

1.1.3 Quantifizierung der Proteinbindungs- und der unspezifischen Adsorptionsrate

Zur Quantifizierung der Proteinbindungs- und Adsorptionsrate wurden nach den beschriebenen Umsetzungsschritten FT-IR- und XP-Spektren von den Oberflächen aufgenommen und die Schichtdicken ellipsometrisch bestimmt. Durch Verwendung Peroxidase-markierter Antikörper konnte ihre Massenbelegung zusätzlich mittels des in Kapitel III, Abschnitt 4.3.5 beschriebenen Festphasen ELISAs ermittelt werden.

1.1.3.1 *FT-IR-Spektroskopie*

In den FT-IR-Spektren zeigt sich eine Protein-Adsorption anhand der bei etwa 1660 und 1540 cm^{-1} auftretenden Amid-I- und Amid-II-Schwingungsbanden (s. Abb. IV.I.1-3) (C=O-Streckschwingung der Amid-Bindung).

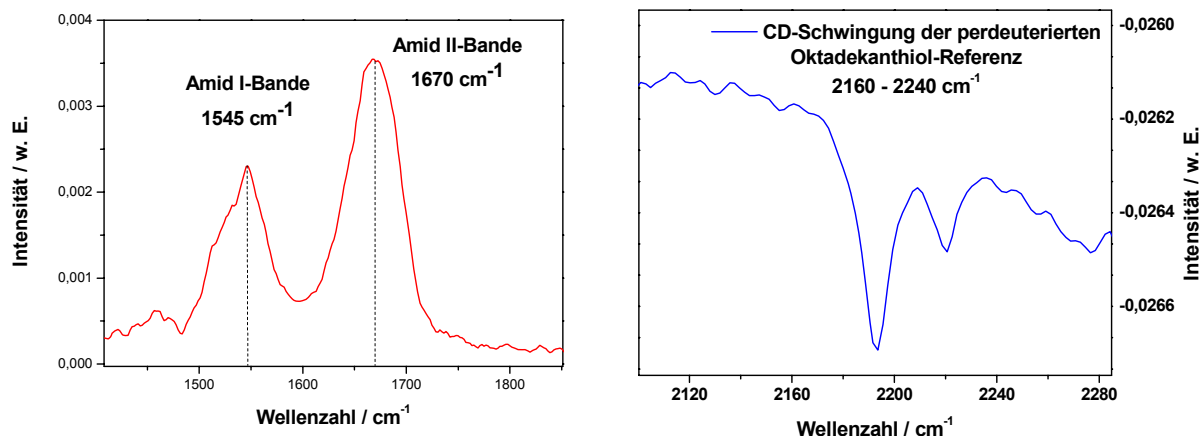


Abb. IV.1.1-3: Links: die nach einer Protein-Immobilisierung in den FT-IR-Spektren auftretende Amid-I- und -II-Schwingung; rechts: CD-Schwingung der verwendeten perdeuterierten Oktadekanthiol-Referenz.

Zur Quantifizierung der Protein-Bindung wurde die Amid-I-Bande bei 1660 cm^{-1} unter Anwendung eines linearen Untergrundabzugs integriert. Die angegebenen prozentualen Werte beziehen sich hierbei auf die unspezifische Fibrinogen-Adsorption, welche bei einem Monofilm von Hexadecanethiol auf Gold ermittelt wurde. Diese Behandlung führte zu einem Flächeninhalt der Amid-I-Bande von etwa 0,320 Einheiten; diesem Betrag wird durch die Referenzierung somit eine Adsorptionsrate von 100% zugewiesen.

Die Spektren der betrachteten Probe und der zur Referenzierung genutzten Hexadecanethiolmolage wurden außerdem auf die gleiche Grundintensität normiert; hierzu wurden die bei zwischen 2160 und 2240 cm^{-1} auftretenden negativen Signale der C-D-Schwingungen herangezogen, die auf die verwendete perdeuterierte Oktadecanethiol-Referenz zurückzuführen sind. Diese wurden ebenfalls integriert und der jeweilige Korrekturfaktor als Quotient aus den C-D-Flächen der zu vergleichenden Spektren ermittelt.

1.1.3.2 Ellipsometrie

Der durch die Immobilisierung der Proteine hervorgerufene Schichtdickenanstieg wurde ellipsometrisch bestimmt. Die angegebenen prozentualen Werte beziehen sich auch hier auf die unspezifische Fibrinogen-Adsorption, welche bei einem Monofilm von Hexadecanethiol auf Gold ermittelt wurde und zu einem Schichtdickenanstieg von $47,9\text{ \AA}$ führte; diesem Betrag wird durch die Referenzierung eine Adsorptionsrate von 100% zugewiesen.

1.1.3.3 XP-Spektroskopie

Die Bindung der Proteine kann ebenfalls qualitativ anhand der aufgenommenen XP-Spektren analysiert werden. In den C1s- und O1s-Detailspektren führt dieser Prozess bedingt durch die proteineigenen Kohlenstoff- und Sauerstoffspezies zum Auftreten zusätzlicher Signalle. Laut Literatur [236] treten z.B. bei einer Adsorption von Bakterien im C1s-Bereich der von den Oberflächen aufgenommenen XP-Spektren zusätzliche Signale bei 284,3 (C1s-Alkyl; C-H, C-C), sowie bei 285,1 (C-N) und 288,3 (C=O) eV auf; im Fall des O1s-Signals wurden neue Signale bei etwa 532,7 (C-O) und 531,7 eV (C=O) detektiert. Mit der Bio-Funktionalisierung verbunden ist außerdem ein N1s-Signal bei etwa 400,3 eV, das Amin- und Amid-gebundenem Stickstoff zugeordnet werden kann.

In der Abbildung IV.I.1-4 sind die vor und nach einer kovalenten Bindung von Antikörpern an eine PEG-Matrix (30 EG-Einheiten; COOH-Terminierung) aufgenommenen C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren dargestellt.

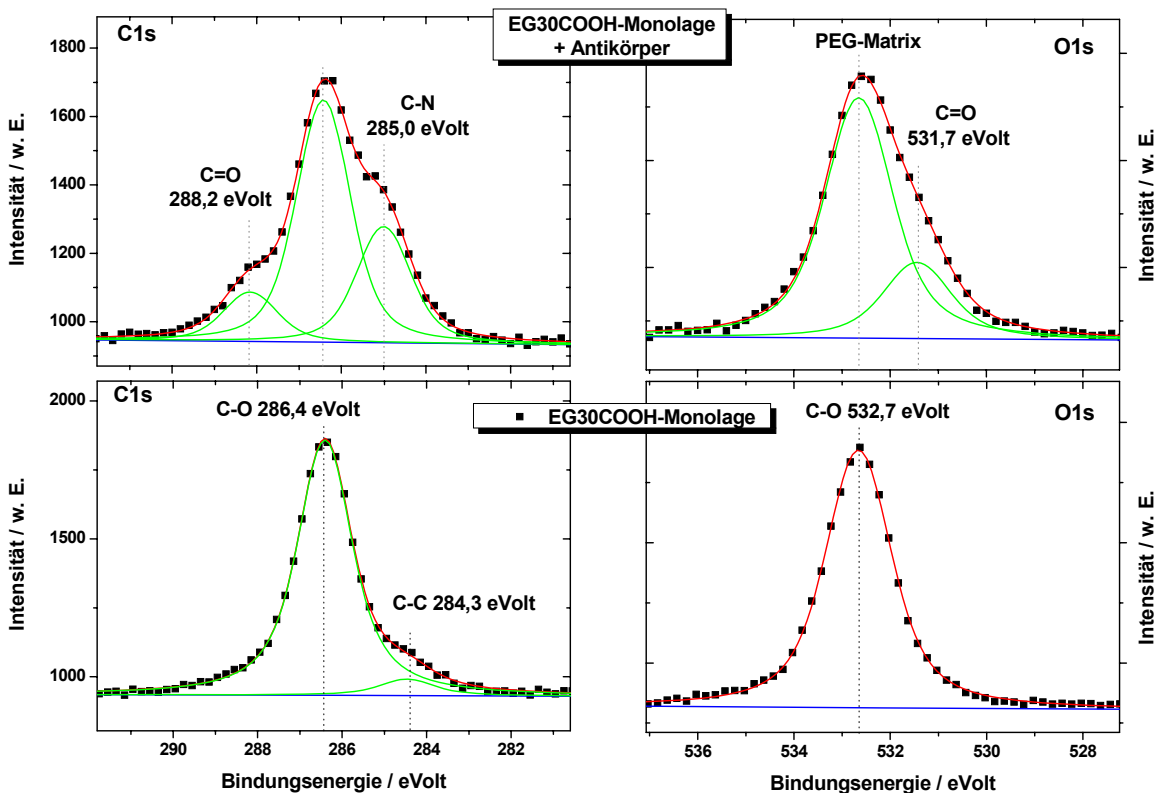


Abb. IV.I.1-4: Nach Adsorption des EG30COOH (unten) sowie nach einer kovalenten Antikörper-Bindung (oben) von dieser PEG-Matrix aufgenommene C1s- (links) und O1s-Detailspektren (rechts).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Proteinbindungs- und -adsorptionsstudien führte die Immobilisierung der Proteine im C1s-Bereich zu zusätzlichen Signalen bei etwa 288,2 (C=O) und 285,0 (C-N) eV; im O1s-Bereich trat ein weiteres Signal bei 531,7 eV (C=O) auf.

Zur Analyse der Proteinbindung müssen diese Signalbeiträge von denen des verwendeten Basisfilms durch eine Spektrenanpassung isoliert werden, was infolge der schlechten Auflösung der Teilsignale jedoch mit höheren Ungenauigkeiten verbunden ist.

Im Fall des nach der Proteinbindung in den Spektren neu auftretenden N1s-Signals ist dies jedoch nicht erforderlich, so dass die Proteinbindung auch ohne eine Spektrenanpassung anhand dieses Signals auf einfache Weise nachgewiesen werden kann.

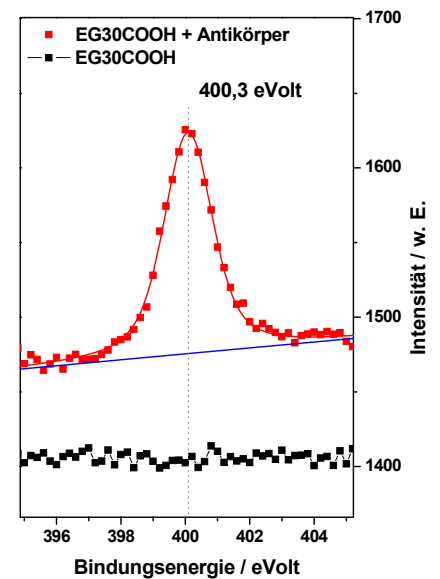


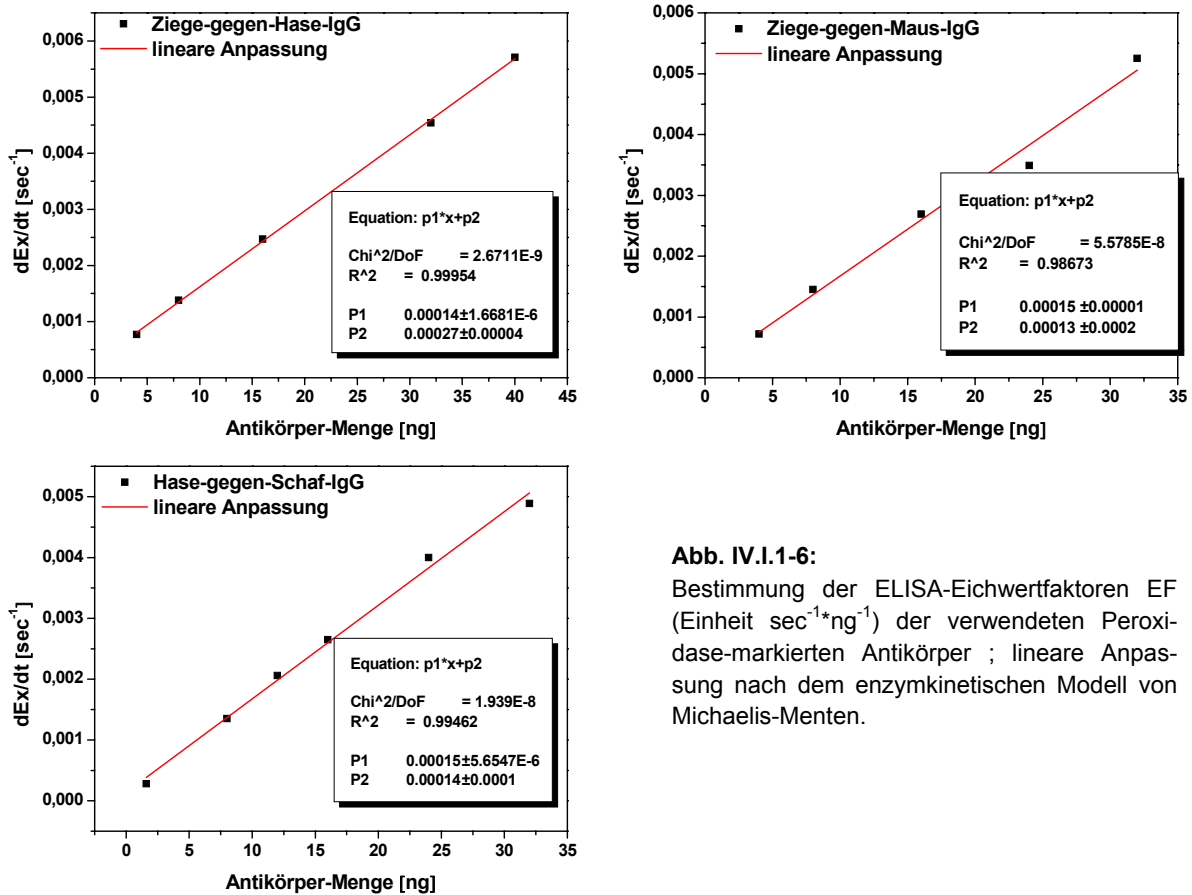
Abb. IV.I.1-5: N1s-Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von EG30COOH und einer kovalenten Antikörper-Bindung.

1.1.3.4 Enzymkinetische ELISA-Messungen

Im Fall einer Immobilisierung Peroxidase-markierter Antikörper kann die Massenbelegung der Antikörper außerdem, wie in Kap. III, Abs. 4.3.5 beschrieben, anhand eines Oberflächenmodifizierten ELISA-Assays ermittelt werden.

Hierzu wurden zunächst die Eichwertfaktoren EF (Einheit $\text{sec} \cdot \text{ng}$) der verwendeten Antikörper bestimmt; diese hängen von der Labelig-Rate und der (alterungsbedingt abnehmenden) Peroxidase-Aktivität ab und müssen somit für jeden der eingesetzten Antikörper separat ermittelt werden.

In der Abbildung IV.I.1-6 sind die Eichwert-Geraden der in den Antikörper-Bindungsstudien eingesetzten Antikörper gezeigt.

**Abb. IV.1.1-6:**

Bestimmung der ELISA-Eichwertfaktoren EF (Einheit $\text{sec}^{-1} \cdot \text{ng}^{-1}$) der verwendeten Peroxidase-markierten Antikörper ; lineare Anpassung nach dem enzymkinetischen Modell von Michaelis-Menten.

Die Eichwertfaktoren wurden kurz nach dem Erhalt der Antikörper bestimmt; das Maximalalter der in den folgend beschriebenen Experimenten eingesetzten Antikörper lag bei etwa 4 Monaten.

Die ermittelten Eichwertfaktoren EF sind für die verschiedenen Antikörper sehr einheitlich; ihre POD-Labeling-Rate α ist demnach sehr ähnlich.

Nach jeder der in Abschnitt 1.1.1 beschriebenen Antikörper-Umsetzungen wurde ihre Massenbelegung mittels des ELISA-Assays quantifiziert. Hierbei ist zu beachten, dass bei einer Verwendung Peroxidase-markierter Erst- und Zweitantikörper mit dieser Methode nur die gesamte immobilisierte Menge bestimmt werden kann. Die Massenbelegung des Zweitantikörpers kann daher nur durch eine vorhergehende Bestimmung der Erstantikörper-Aktivität und einer anschließenden Differenzbildung ermittelt werden.

1.2 Antikörper-Bindungsstudien

1.2.1 Carboxy-terminierte PEG-Beschichtungen

1.2.1.1 FT-IR-Messungen

Die FT-IR-Spektren geben Aufschluss über die Morphologie der ausgebildeten PEG-Monolagen. Eine ausführliche Beschreibung der im Fall einer amorphen und kristallinen PEG-Konformation auftretenden Schwingungsmoden kann der Literatur entnommen werden. Eine Zusammenfassung dieser charakteristischen Schwingungsmoden ist in der Tabelle IV.I.1-2 gegeben.

Zuordnung	Polarisation	PEG, kristallin	PEG, amorph
(EG-) CH₂-Rocking		963 s	945 m
C-O-, C-C-Streckschwingung	⊥	1062 m	1038 m
		1102 vs	1107 s
	⊥	1119 s	
	⊥	1236 w	
(EG-) CH₂-Twisting		1244 m	1249 m
	⊥	1283 m	1296 m
		1345 s	1325 w
(EG-) CH₂-Wagging			1352 m
	⊥	1364 m	
	⊥	1415 w	
	⊥	1453 w	
(EG-) CH₂-Biegeschwingung		1457 m	
		1463 m	~1460 m
	⊥	1470 m	
Kombinationsbanden von (EG-)CH₂-Biegeschwingungen, CH₂-Wagging und CH₂-Twisting	⊥	2695	
		2740	2740 sh
	⊥	2805 sh	
	⊥	2825 sh	
symm. (EG-) CH₂-Streckschwingung		2865 sh	
	⊥	2885 s	
		2890 s	2865 b
asymm. (EG-) CH₂-Streckschw.	⊥	2950 m	2930 sh

Tab. IV.I.1-2: Zuordnung der im Fall einer kristallinen und amorphen PEG-Konformation in den FT-IR-Spektren auftretenden Schwingungsmoden (w, weak; m, medium; s, strong; vs, very strong; b, broad; sh, shoulder).

Das in der Tabelle IV.I.1-2 angegebene Übergangsdipolmoment bezieht sich auf die Helixachse einer kristallinen PEG-Konformation; hierbei ist zu beachten, dass aufgrund der an Metalloberflächen geltenden Auswahlregeln die Resonanzen mit einem zur Oberfläche parallelen Übergangsdipolmoment nicht detektiert werden können (s. Kap. II.III Abs. 2).

Auskunft über die Konformation der PEG-Ketten geben vor allem der *Fingerprint*-Bereich ($900 - 1500 \text{ cm}^{-1}$) und der CH-Streckschwingungsbereich ($2700 - 2950 \text{ cm}^{-1}$).

Der kristalline Zustand mit einer helikalen Konformation der PEG-Ketten ist vor allem durch die starke und schmale Resonanz der COC-Streckschwingung bei 1118 cm^{-1} und die CH_2 -Kippschwingung bei 1345 cm^{-1} gekennzeichnet.

Im CH-Streckschwingungs-Bereich tritt in diesem Fall eine starke Bande bei 2890 cm^{-1} auf, die der symmetrischen Streckschwingung der CH_2 -Einheiten zugeordnet werden kann.

Ein zunehmender amorpher Anteil zeigt sich an einer bei 1140 cm^{-1} auftretenden Schulter der COC-Streckschwingung. Die Intensität der genannten typisch helikalen Schwingungsmoden nimmt ab; die Resonanzen im CH-Streckschwingungsbereich verbreitern sich ebenfalls und es treten Schultern bei etwa 2930 cm^{-1} (asym. CH_2 -Streckschwingung) und 2865 cm^{-1} (sym. CH_2 -Streckschwingung) auf.

Die für den Adsorptions- und anschließenden Ordnungsprozess der PEG-Thiole ellipsoidisch ermittelten Filmbindungskinetiken (s. Kap. IV.I, Abs. 2) zeigen, dass diese Prozesse nach einer Zeit von etwa 5 Stunden weitgehend abgeschlossen sind und die Schichtdicke der Monolagen nicht mehr wesentlich ansteigt. Zu ihrer Präparation wurde daher eine Adsorptionszeit von über 12 Stunden eingehalten. Anhand ihrer FT-IR-Spektren (s. Abb. IV.I.1-7) ist zu erkennen, dass nach diesem Zeitraum eine weitgehend helikale Konformation der PEG-Einheiten vorliegt. Die Polymerverteilung führt jedoch dazu, dass die Monolagen eine amorphe Oberflächenstruktur besitzen, was anhand einer kleinen, bei etwa 1140 cm^{-1} auftretenden Schulter der COC-Streckschwingung zu erkennen ist.

Bedingt durch die Kettenlängenverteilung nimmt der helikale Filmanteil und somit auch der Bedeckungsgrad mit einer Abnahme der mittleren EG-Anzahl ebenfalls ab.

In der Abbildung IV.I.1-7 sind die FT-IR-Spektren der Verbindungen EG15COOH und EG36COOH dargestellt.

Die höhere Schichtdicke der EG36COOH-Monolage verursacht eine wesentlich stärkere Absorption. Im COC-Streckschwingbereich zeigt die Verbindung EG15COOH eine breitere

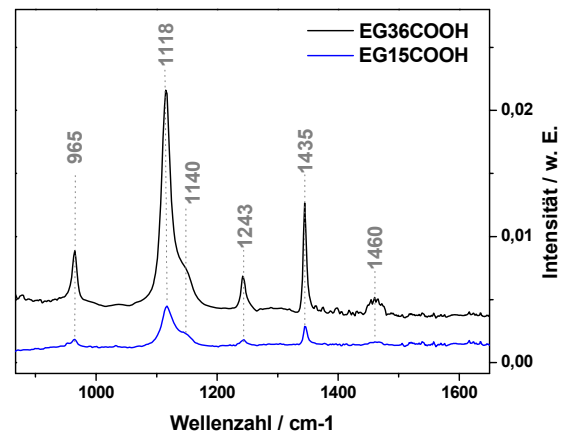


Abb. IV.I.1-7:

FT-IR-Spektren einer auf Au-bedampften Si-wafern ausgebildeten EG15COOH- (blau) und EG36COOH-Monolagen (schwarz).

Schulter bei 1140 cm^{-1} , was auf einen höheren amorphen Filmbestandteil als im Fall der EG36COOH-Monolage hindeutet. Ein solcher, mit abnehmender Kettenlänge verbundener Trend zu höheren amorphen Filmanteilen zeigte teilweise auch bei den anderen PEG-Verbindungen.

Die Abbildungen IV.I.1-8 zeigen den Fingerprint- (links) und den CH-Streckschwingbereich (rechts) der EG36COOH- und EG15COOH-funktionalisierten Oberflächen.

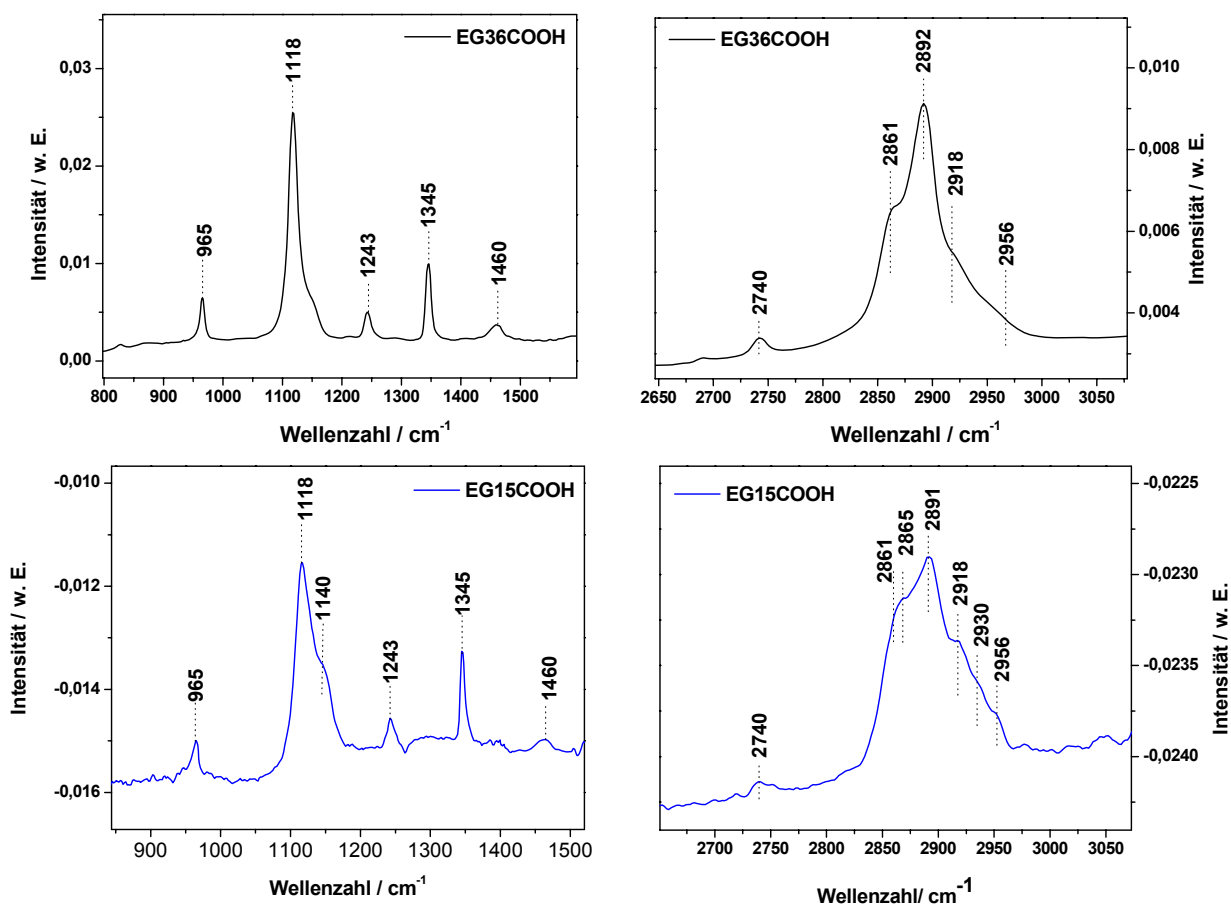


Abb. IV.I.1-8: Nach Adsorption der Verbindungen EG15COOH (unten) und EG22COOH (oben) aufgenommene FT-IR-Spektren; Ausschnitt des CH-Streckschwing- (links) und des Fingerprint-Bereichs (rechts).

Der COC-Streckschwingbereich sieht für beide Verbindungen sehr ähnlich aus; es treten dieselben Schwingungsmoden auf, welche auf eine vorwiegend helikale Anordnung der PEG-Ketten und somit eine kristalline PEG-Modifikation hindeuten. Unterschiede betreffen zum einen die Intensität der Absorptionsbanden, welche bei der kürzerkettigen Verbindung EG15COOH aufgrund ihrer geringeren Massenbelegung im Vergleich zur EG36-Monolage wesentlich niedriger ausfällt. Die bei etwa 1140 cm^{-1} auftretende Schulter ist bei der EG15COOH-Monolage ebenfalls deutlicher ausgeprägt, was auf einen höheren amorphen Anteil in dieser PEG-Matrix deutet.

Größere Unterschiede zwischen beiden Spektren sind jedoch im CH-Streckschwingbereich zu erkennen. Bedingt durch den höheren amorphen Filmbestandteil des EG15COOH treten hier auch die für eine amorphe Konformation typischen Schwingungsmoden auf und führen zu einer breiteren Struktur als im Fall des EG36COOH. Zusätzliche Signale sind z.B. bei 2930 cm^{-1} (asym. CH_2 -Streckschwingung) und 2865 cm^{-1} (sym. CH_2 -Streckschwingung) erkennbar und können PEG in einer amorphen Konformation zugeordnet werden.

In den Abbildungen IV.I.1-9 sind die FT-IR-Spektren gezeigt, welche von den Carboxy-terminierten PEG-Beschichtungen vor und nach der kovalenten Bindung des Erstantikörpers sowie nach Behandlung mit einem falschen Antigen und der anschließenden Umsetzung mit dem spezifischen Antigen aufgenommen wurden.

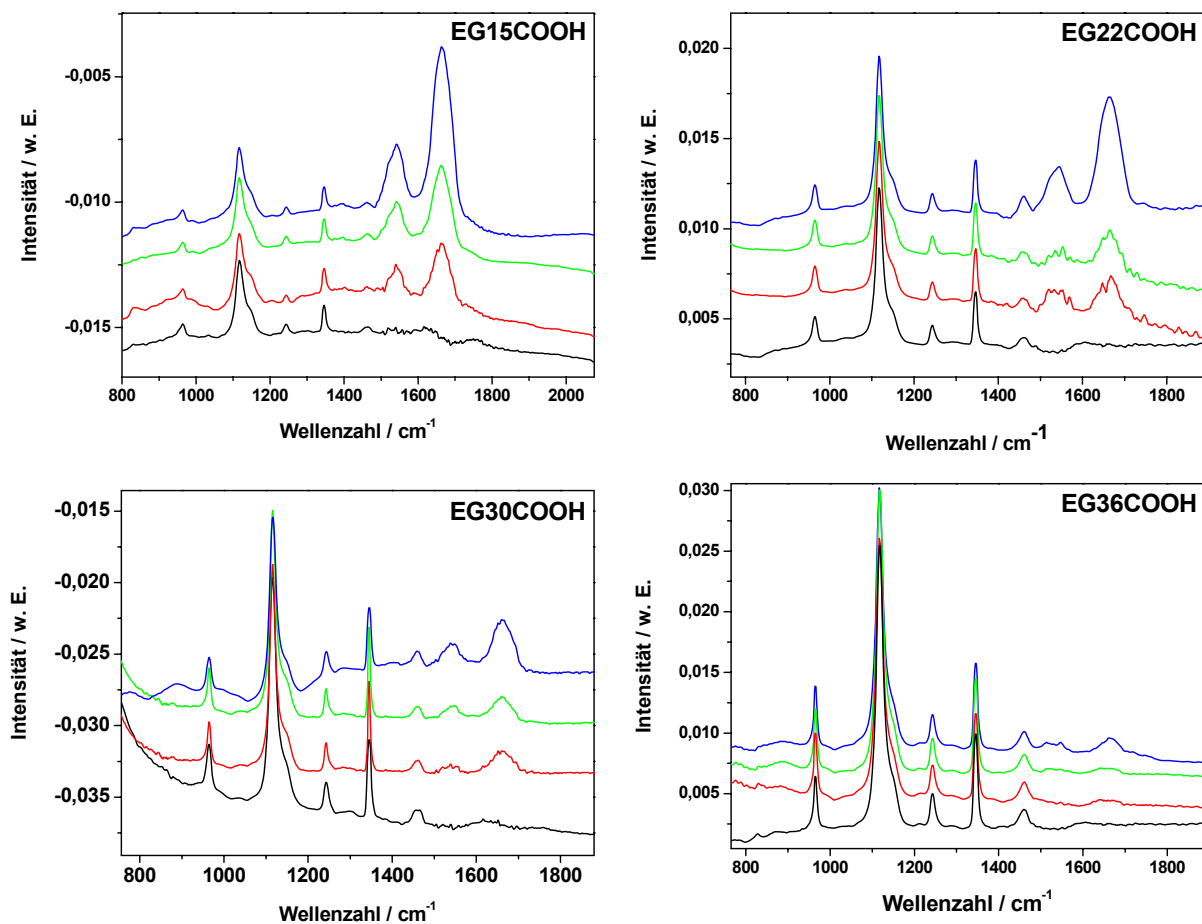


Abb. IV.I.1-9: FT-IR-Spektren der an den verschiedenen COOH-terminierten PEG-Beschichtungen (Kettenlänge von 15, 22, 30 und 36 EG-Einheiten) durchgeführten Antikörper-Antigen-Umsetzungen.

— spezifisches Antigen
— falsches Antigen
— 1. Antikörper
— Basisfilm

Im Fingerprint-Bereich zeigen die adsorbierten Verbindungen die für eine kristalline Modifikation typischen Schwingungsmoden (COC-Streckschwingung bei 1118 cm^{-1} und CH_2 -Kipp-schwingung bei 1345 cm^{-1}). Es kann daher von einem hohen und relativ ähnlichen Bedeckungsgrad sowie einer vorwiegend quasi-kristallinen Modifikation der PEG-Ketten ausge-

gangen werden. Dies wird durch die ellipsometrisch ermittelten Schichtdicken (s. Abschnitt 1.2.1.2) zusätzlich bestätigt.

Anhand des Intensitätsverlaufs der Amidbanden (Amid I bei 1540 cm^{-1} und Amid II bei 1660 cm^{-1}) ist erkennbar, dass die Bindungsrate der Antikörper mit zunehmender Kettenlänge der Carboxy-terminierten PEG-Thiole abnimmt. Die Amid-I-Bande wurde unter Anwendung eines linearen Untergrundabzugs integriert (Integrationsbereich von 1590 bis 1780 cm^{-1}); in der Abbildung IV.I.1-10 ist der für die carboxyterminierten PEG-Thiole erhaltene Verlauf des Flächeninhalts der Amid-I-Bande graphisch dargestellt.

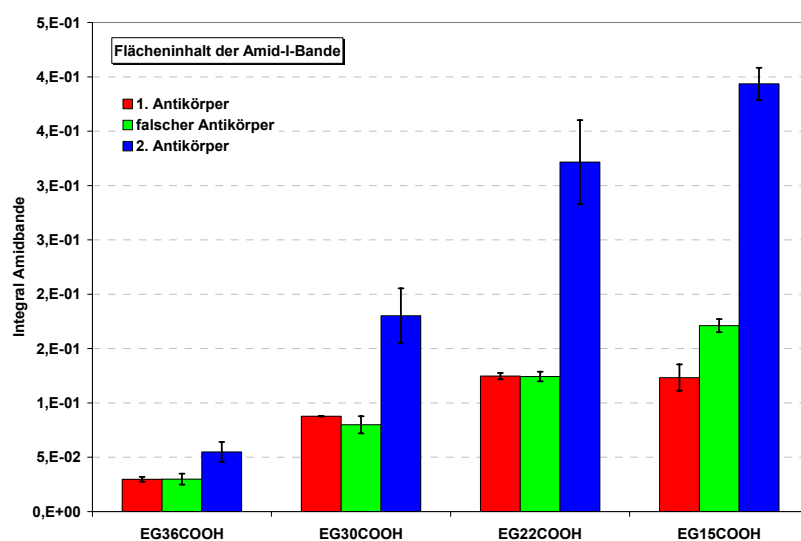


Abb. IV.I.1-10:

Intensitätsverlauf der in den FT-IR-Spektren nach der Umsetzung mit den Antikörpern bei $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ auftretenden Amid-I-Bande für die an den COOH-terminierten PEG-Beschichtungen unterschiedlicher Kettenlänge durchgeführten Antikörper-Antigen-Kopplungen.

Die Abbildung IV.I.1-10 zeigt eine deutliche Abhängigkeit der Proteinbindungsrate von der Kettenlänge der Carboxy-terminierten PEG-Thiole. Eine Abnahme der Anzahl an mittleren EG-Einheiten ist mit einer zunehmenden Bindungsrate des Erstantikörpers verbunden. Die kürzerkettigen Verbindungen EG15COOH und EG22COOH zeigen jedoch eine vergleichbare Erstantikörper-Kopplungsrate, wobei im Fall des EG15COOH im Gegensatz zu dem längerkettigen EG22COOH bei Behandlung der Oberflächen mit einem falschen Antigen allerdings auch unspezifische Protein-Adsorption auftritt und zu einem weiteren Intensitätsanstieg der Amid-I-Bande um etwa 39% führt.

Die Bindungsrate des Erstantikörpers nimmt bei einer Verdopplung des EG-Gehaltes von EG15COOH zu EG30COOH um etwa 29% ab.

Ein deutlicher Sprung in der Bindungsrate besteht jedoch zwischen den Verbindungen EG30- und EG36COOH; obwohl der EG-Gehalt hier nur um etwa 20% zunimmt, wird die Bindungsrate um weitere 66% reduziert.

In der Abbildung IV.I.1-11 ist die auf die unspezifische Fibrinogen-Adsorption eines Hexadecanthaliofilms bezogene immobilisierte Menge des Erstantikörpers und die durch Behandlung mit dem falschen Antigen hervorgerufene unspezifische Adsorption gegen die Anzahl der

EG-Einheiten der adsorbierten PEG-Thiole aufgetragen. Die Tabelle IV.I.1-3 enthält die für die verschiedenen Basisfilme berechneten Bindungsraten des Erstantikörpers.

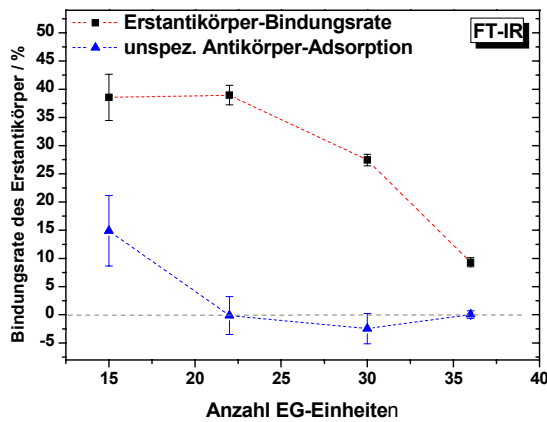


Abb. IV.I.1-11: Abhängigkeit der FT-IR-spektroskopisch ermittelten Erstantikörper-Bindungsrate von der mittleren EG-Anzahl der verwendeten COOH-terminierten PEG-Beschichtungen.

<i>PEG-Matrix</i>	<i>Erstantikörper-Bindungsrate / %</i>
EG15COOH	38
EG22COOH	39
EG30COOH	27
EG36COOH	9

Tab. IV.I.1-3: FT-IR-spektroskopisch ermittelte Bindungsrate des Erstantikörpers für die COOH-terminierten PEG-Beschichtungen.

Sowohl die Bindungs- als auch die unspezifische Adsorptionsrate zeigen einen mit abnehmender Kettenlänge verbundenen Anstieg. Bei einer Reduktion der Kettenlänge steigt die Bindungskapazität bis zu einer Kettenlänge von 22 EG-Einheiten kontinuierlich an und geht schließlich in die Sättigung; die Verbindungen EG22COOH und EG15COOH zeigen eine vergleichbare Bindungsrate. Eine unspezifische Adsorption des falschen Antigens wird hingegen erst ab einer Kettenlänge von 15 EG-Einheiten beobachtet.

Da anhand der ellipsometrischen Schichtdickenbestimmungen jedoch gezeigt werden konnte (s. Abs. 1.2.1.2), dass die Beschichtungen der verschiedenen PEG-Verbindungen einen sehr ähnlichen Bedeckungsgrad aufweisen, können Unterschiede in den Bindungs- und Adsorptionsraten nicht auf einen variierenden Bedeckungsgrad zurückgeführt werden, welcher unter anderem die Zugänglichkeit der zur Bindung genutzten Funktionalitäten bestimmt.

Insgesamt kann daher festgestellt werden, dass die Proteinbindungskapazität einer vorwiegend helikal geordneten und COOH-terminierten PEG-Matrix von ihrer mittleren Kettenlänge abhängt, wobei eine Zunahme der mittleren Kettenlänge ab einer Anzahl von etwa 22 Einheiten mit einer kontinuierlichen Abnahme der Bindungsrate verbunden ist.

Der Verlauf der unspezifischen Adsorptionsrate deutet darauf hin, dass die mit der mittleren Kettenlänge verbundene Abnahme der Bindungsrate wahrscheinlich in einer ansteigenden Proteinresistenz der zur Kopplung verwendeten PEG-Matrix begründet ist, welche eine Annäherung der Proteine an die Oberfläche zunehmend erschwert.

1.2.1.2 Ellipsometrie-Messungen

Die nach den in Abschnitt 1.1.1.1 beschriebenen Umsetzungsschritten erhaltenen Schichtdicken wurden ellipsometrisch bestimmt. In der Abbildung IV.I.1-12 sind diese für die verschiedenen Basisfilme graphisch dargestellt.

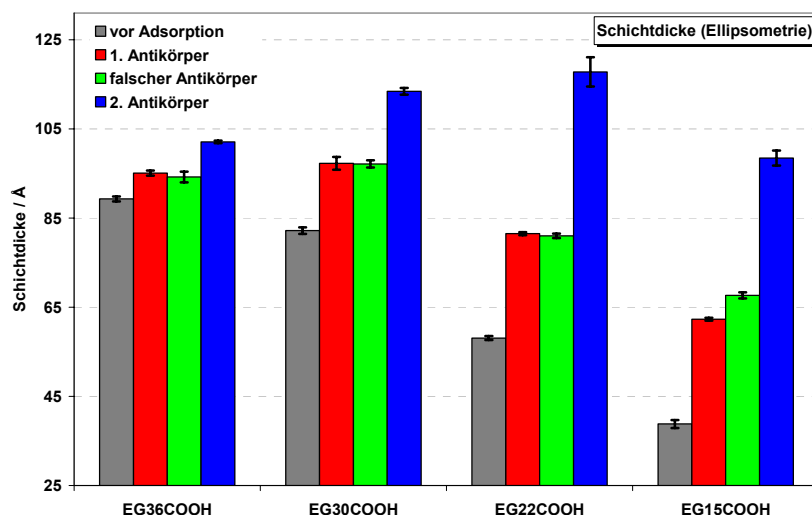


Abb. IV.I.1-12:

Verlauf der ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken für die an den COOH-terminierten PEG-Beschichtungen (EG15COOH, EG22COOH, EG30COOH, EG36COOH) durchgeführten Antikörper-Antigen-Kopplungen.

Mit zunehmender Kettenlänge ist ein erheblicher Schichtdickenanstieg der präparierten Monolagen verbunden, der auf eine gestreckte und helikale Konformation der PEG-Ketten hindeutet.

Der Bedeckungsgrad der Oberflächen kann durch Vergleich mit der für einen vollständig helikal geordneten PEG-Film zu erwartenden Schichtdicke berechnet werden, dessen Bedeckung zu 100% gesetzt wird. Der Alkanspacer befindet sich in diesem Fall in einer all-trans-Konformation mit einem Tiltwinkel von 30° zur Oberflächennormalen, so dass für diesen Bestandteil ein Schichtdickenbeitrag von 13,26 Å anzusetzen ist; für eine EG-Einheit ist im Fall der helikalen Konformation ein Inkrement von 2,78 Å (Ausrichtung senkrecht zur Oberfläche) zu veranschlagen [11]. Die bei vollständiger Bedeckung für die EGNCOOH-Verbindungen theoretisch zu erwartenden Schichtdicken d können daher näherungsweise nach der Gleichung

$$d = 13,26 + n \cdot 2,78 \text{ [Å]} \quad (97)$$

berechnet werden.

In der Tabelle IV.I.1-4 sind die Schichtdicken der Basisfilme, ihr Bedeckungsgrad und die prozentuale Bindungsrate des Erstantikörpers angegeben; zum Vergleich ist außerdem die anhand der FT-IR-Spektren ermittelte prozentuale Bindungsrate angegeben.

<i>PEG-Matrix</i>	<i>Schichtdicke</i> / Å	<i>Bedeckungsgrad</i> / %	<i>Erstantikörper-</i> <i>Bindungsrate</i> (Ellips.) / %	<i>Erstantikörper-</i> <i>Bindungsrate</i> (FT-IR) / %
EG15COOH	38,8	70	49	38
EG22COOH	58,1	78	49	39
EG30COOH	82,2	85	31	27
EG36COOH	89,3	79	12	9

Tab. IV.I.1-4: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken, Bedeckungsgrad und normierte Bindungsrate des Erstantikörpers für die COOH-terminierten PEG-Beschichtungen; rechte Spalte: FT-IR-spektroskopisch ermittelte Bindungsrate des Erstantikörpers.

Analog zur Analyse der FT-IR-Spektren ergibt sich auch anhand des ellipsometrisch ermittelten Schichtdickenanstiegs eine mit zunehmender Kettenlänge verbundene Abnahme der Proteinbindungsrate.

Der Bedeckungsgrad der zur kovalenten Bindung der Antikörper eingesetzten Basisfilme ist jedoch recht ähnlich und liegt bei durchschnittlich 78 % (s. Abb. IV.I.1-13). Es kann daher von einer vorwiegend helikalen Ordnung der PEG-Ketten ausgegangen werden; dies konnte bereits anhand der FT-IR-Spektren gezeigt werden, welche die für eine kristalline PEG-Modifikation charakteristischen Schwingungsmoden zeigen. Die unterschiedliche Bindungsrate des Erstantikörpers kann daher nicht auf einen abweichenden Bedeckungsgrad der Monolagen zurückgeführt werden.

Des Weiteren ergibt sich eine gute Übereinstimmung der mittels der verschiedenen Methoden (FT-IR-Spektroskopie und Ellipsometrie) erhaltenen Bindungsraten; die maximale Abweichung der ermittelten Werte liegt bei etwa 10%.

Zur Verdeutlichung ihrer unterschiedlichen Proteinbindungskapazitäten ist der für die verschiedenen Basisfilme nach den einzelnen Umsetzungsschritten ermittelte Schichtdickenanstieg in der Abbildung IV.I.1-14 graphisch dargestellt.

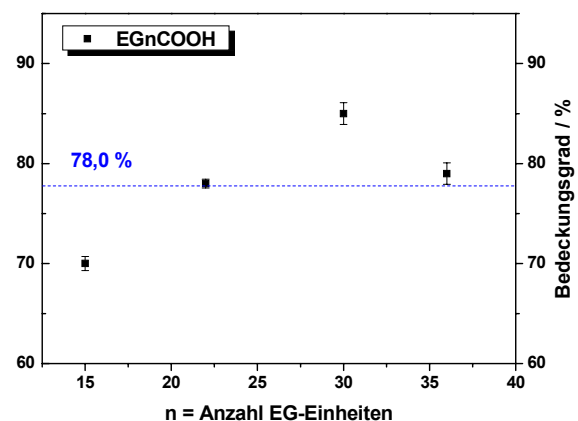
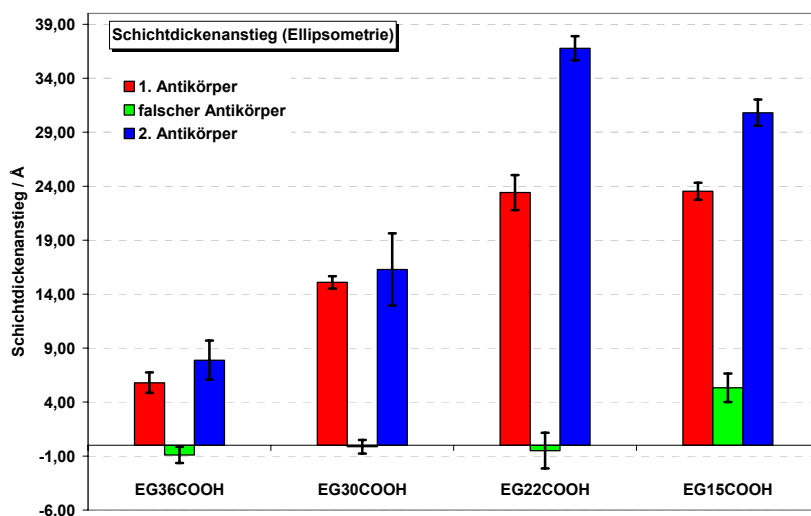


Abb. IV.I.1-13: Ellipsometrisch ermittelter Bedeckungsgrad der COOH-terminierten PEG-Beschichtungen (15, 22, 30, 36 EG-Einheiten).

**Abb. IV.I.1-14:**

Verlauf des mit den Antikörper-Antigen-Umsetzungen an den COOH-terminierten PEG-Beschichtungen (mittlere Kettenlänge von 15, 22, 30 und 36 EG-Einheiten) verbundenen Schichtdickenanstiegs.

<i>Stufe</i>	<i>EG15COOH</i>	<i>EG22COOH</i>	<i>EG30COOH</i>	<i>EG36COOH</i>
1. Antikörper	25,53	23,41	15,09	5,80
Falscher Antikörper	5,33	-0,49	-0,13	-0,89
Spez. Antigen	30,81	36,77	16,29	7,89

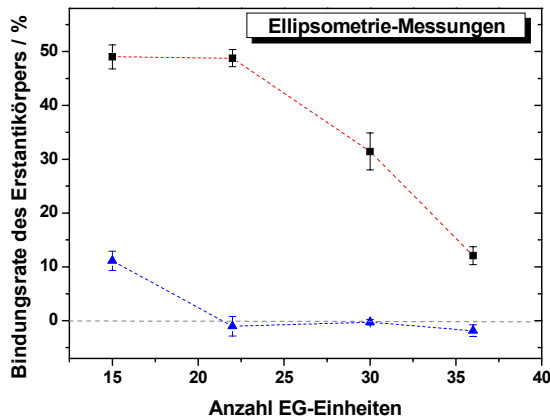
Tab. IV.I.1-5: Nach den Biofunktionalisierungen an den verschiedenen COOH-terminierten PEG-Matrizen ellipsometrisch ermittelter Schichtdickenanstieg.

Auch anhand der Abbildung IV.I.1-14 ist eine mit abnehmender Kettenlänge ansteigende Bindungsrate erkennbar, so dass die auf Basis der FT-IR-Messungen in Abschnitt 1.2.1.1 gezogenen Schlussfolgerungen durch die Ellipsometrie-Messungen bestätigt werden.

Die Monolagen der Verbindungen EG15COOH und EG22COOH zeigen eine vergleichbare Kopplungsrate des Erstantikörpers; für das kürzerkettigere EG15COOH führt die Behandlung mit einem falschen Antigen im Gegensatz zum EG22COOH jedoch zu einem unspezifischen Adsorptionsbeitrag.

Bei einer Verdopplung der Kettenlänge von EG15COOH zu EG30COOH wird die Bindungsrate des Erstantikörpers um etwa 36% reduziert. Ein deutlicher Sprung in der Bindungsrate besteht auch hier zwischen den Verbindungen EG30- und EG36COOH; obwohl der EG-Gehalt zwischen diesen beiden Beschichtungen um nur etwa 20% zunimmt (unter der Annahme eines identischen Bedeckungsgrades; Zunahme von 12% bei Berücksichtigung des Bedeckungsgrades), wird die Bindungsrate des Erstantikörpers um etwa 62 % reduziert.

In der Abbildung IV.I.1-15 ist die prozentuale Bindungsrate des Erstantikörpers zusammen mit der unspezifischen Adsorptionsrate in Abhängigkeit von der mittleren Anzahl der EG-Einheiten graphisch dargestellt.

**Abb. IV.I.1-15:**

Verlauf der ellipsometrisch anhand des Schichtdickenanstiegs ermittelten Erstantikörper-Bindungsrate in Abhängigkeit von der mittleren EG-Anzahl der verwendeten COOH-terminierten PEG-Beschichtungen.

—■— Erstantikörper-Bindungsrate
—▲— unspez. Antikörper-Adsorption

Der erhaltene Verlauf stimmt sehr gut mit demjenigen überein, welcher anhand der Auswertung der FT-IR-Spektren erhalten wurde (vgl. Abb. IV.I.1-11). Ab einer mittleren Kettenlänge von etwa 22 Einheiten wird mit zunehmender EG-Anzahl eine sprunghafte Abnahme der Bindungsrate des Erstantikörpers festgestellt.

Eine unspezifische Antikörper-Adsorption wird bei Reduktion der Kettenlänge hingegen erst bei der Verbindung EG15COOH beobachtet; die restlichen Verbindungen zeigen nach diesem Schritt eine geringfügige Schichtdickenabnahme, welche vermutlich auf eine mit den Waschschrritten verbundene teilweise Ablösung der PEG-Moleküle zurückgeführt werden kann. Obwohl EG22COOH und EG15COOH vergleichbare Bindungskapazitäten aufweisen, verhält sich EG22COOH hingegen proteinresistent.

Analog zu Abschnitt 1.2.1.1 kann daher auch hier postuliert werden, dass die mit der mittleren Kettenlänge ansteigenden Repulsionskräfte der vorwiegend helikal geordneten PEG-Beschichtungen dazu führen, dass die Protein-Bindungskapazität der PEG-Matrix kontinuierlich herabgesetzt wird.

1.2.1.3 Enzymkinetische ELISA-Messungen

Da in den Bindungsstudien Peroxidase-markierte Antikörper verwendet wurden, konnte deren Massenbelegung zusätzlich mittels des Festphasen-ELISAs ermittelt werden.

Die Abbildung IV.I.1-16 zeigt den zeitlichen Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS, welcher nach der Bindung des Erstantikörpers an die verschiedenen Basisfilme erhalten wurde.

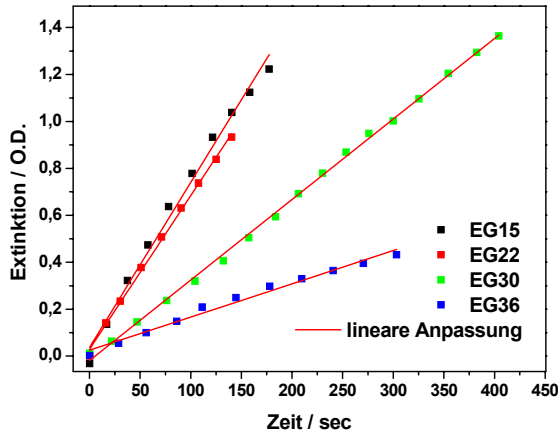


Abb. IV.I.1-16:

Nach Bindung des POD-markierten Erstantikörpers an die COOH-terminierten PEG-Beschichtungen durchgeführte ELISA-Messungen (UV/Vis-spektroskopisch dektektierter Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS).

In der Tabelle IV.I.1-6 ist die für die einzelnen Stufen ermittelte Antikörper-Massenbelegung angegeben.

Massenbelegung [ng/cm²]				
EGnCOOH	n = 15	n = 22	n = 30	n = 36
1. Antikörper	52,55	55,41	33,73	13,69
+ falsches Antigen	63,68	53,41	33,17	12,27
+ spezifisches Antigen	136,09	134,43	65,72	26,40

Tab. IV.I.1-6: Enzymkinetisch mittels des ELISAs ermittelte Antikörper-Massenbelegung für die an den COOH-terminierten PEG-Beschichtungen durchgeführten Antikörper-Antigen-Umsetzungen.

Die Abbildung IV.I.1-17 stellt den für die verschiedenen Basisfilme und Kopplungsstufen erhaltenen Verlauf der Antikörper-Massenbelegung graphisch dar.

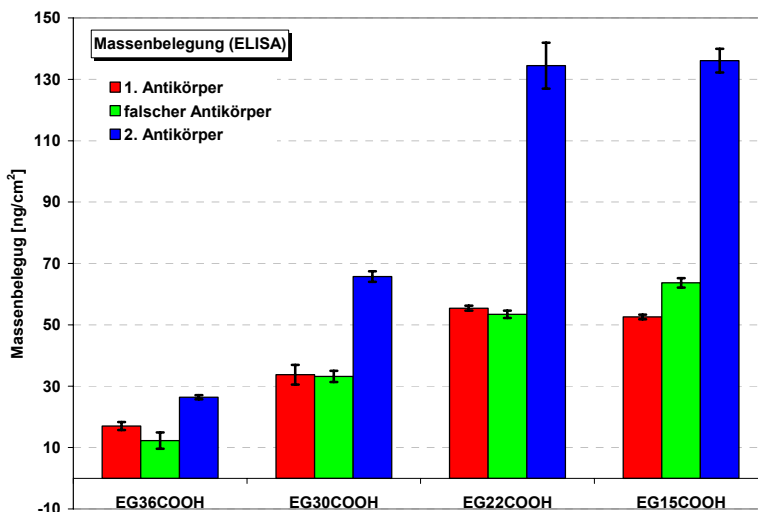


Abb. IV.I.1-17:

Verlauf der anhand des ELISAs ermittelten Antikörper-Massenbelegung (ng/cm²) für die an den COOH-terminierten PEG-Beschichtungen (mittlere EG-Anzahl von 15, 22, 30 und 36 EG-Einheiten) durchgeführten Antikörper-Antigen-Umsetzungen.

Die quantitative Auswertung dieses Immunoassays bestätigt die bereits anhand der Auswertung der FT-IR-Spektren und des ellipsometrisch ermittelten Schichtdickenanstiegs erhaltene Abhängigkeit der Bindungsrate von der mittleren Kettenlänge der zur Immobilisierung der Proteine eingesetzten PEG-Matrizen. Mit zunehmender Anzahl an mittleren EG-Einheiten wird ab einer mittleren EG-Anzahl von etwa 22 EG-Einheiten eine kontinuierliche Abnahme der Bindungsrate des Erstantikörpers festgestellt. Nur die Verbindung EG15COOH weist einen unspezifischen Adsorptionsbeitrag auf; die restlichen Verbindungen zeigen nach diesem Schritt dagegen eine geringfügige Abnahme der Antikörper-Belegung, welche vermutlich auf eine mit den Waschschrritten verbundene teilweise Ablösung der Rezeptor-funktionalisierten PEG-Moleküle zurückgeführt werden kann. In der Abbildung IV.I.1-18 ist der mit der Bindung des Erstantikörpers und der Behandlung mit dem unspezifischen Antikörper verbundene Anstieg der Massenbelegung gegen die mittlere Anzahl der EG-Einheiten der verwendeten PEG-Beschichtungen aufgetragen.

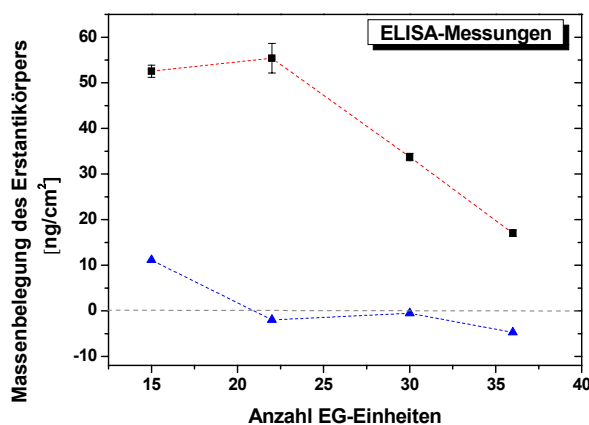


Abb. IV.I.1-18:

Verlauf der enzymkinetisch ermittelten Massenbelegung (ng/cm^2) des kovalent gebundenen Erstantikörpers in Abhängigkeit von der mittleren Kettenlänge der verwendeten COOH-terminierten PEG-Beschichtungen.

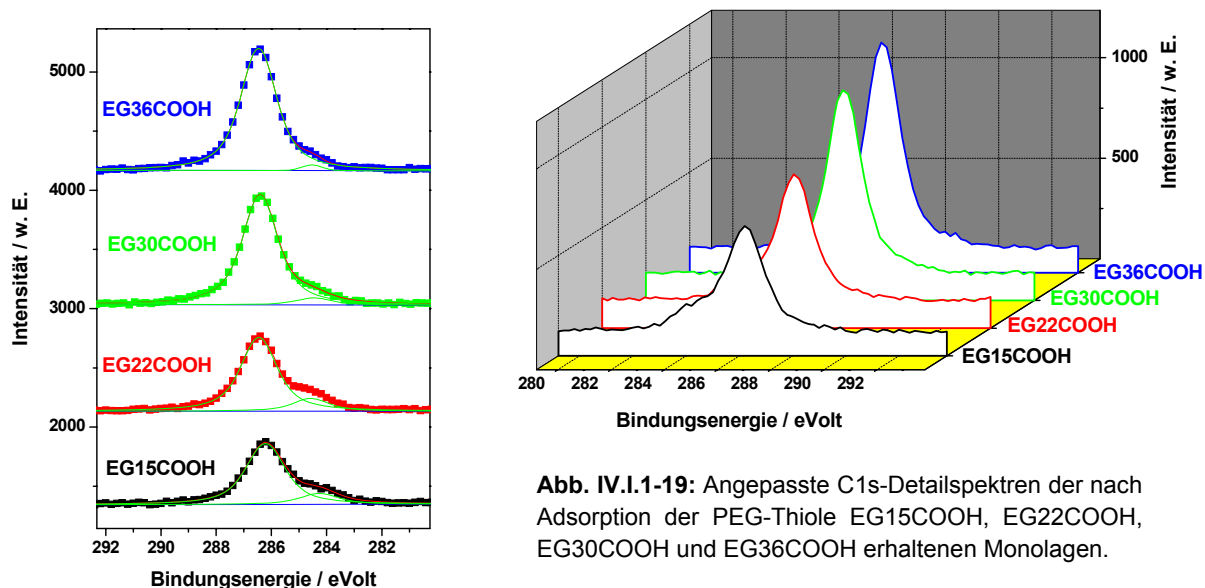
—■— Erstantikörper-Massenbelegung
—▲— unspezifische Antikörper-Adsorption

Ein Vergleich mit den Abbildungen IV.I.1-11 und IV.I.1-15 zeigt die gute Übereinstimmung des mittels der verschiedenen Analysemethoden erhaltenen Verlaufs der Bindungsraten. Bei einer Reduktion der Kettenlänge nimmt die Bindungsrate kontinuierlich zu und geht bei einer Kettenlänge von etwa 22 EG-Einheiten in die Sättigung; eine unspezifische Antikörper-Adsorption wird hingegen erst bei einer Kettenlänge von 15 EG-Einheiten beobachtet.

1.2.1.4 Röntgenphotelektronenspektroskopie

Von den Oberflächen wurden außerdem nach Adsorption der PEG-Thiole sowie nach den einzelnen Umsetzungsschritten mit den Antikörpern XP-Spektren aufgenommen.

In der Abbildung IV.I.1-19 sind die C1s-Detailspektren der verschiedenen Basisfilme dargestellt. Das bei etwa 284,3 eV detektierte Signal entspricht den aliphatischen Kohlenstoffen des Alkanspacers; die Ether-Kohlenstoffe führen zu einer Signallage bei ca. 286,3 eV.



Wie aufgrund der ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken und des relativ hohen mittleren Bedeckungsgrades ($\sim 78\%$) zu erwarten, wird mit steigender Kettenlänge der adsorbierten PEG-Thiole ein Anstieg der C1s-Intensität beobachtet.

Die Ether-Sauerstoffatome werden bei etwa 532,3 eV detektiert. Die Tabelle IV.I.1-7 enthält die berechneten und theoretisch zu erwartenden Ether-C1s/O1s-Verhältnisse.

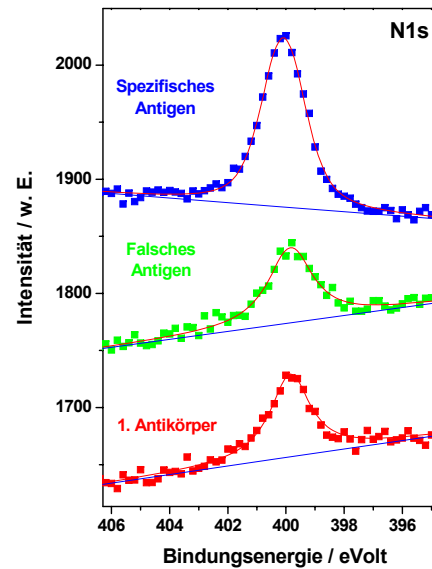
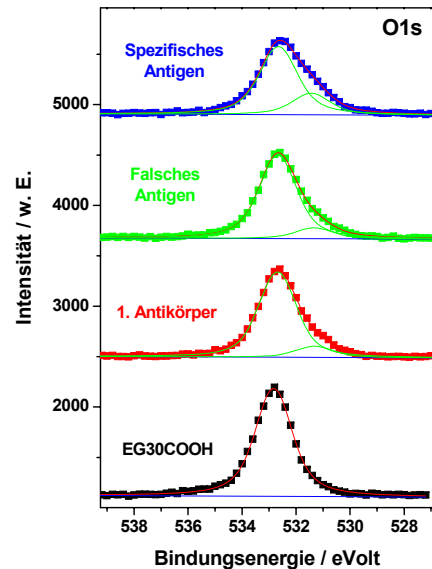
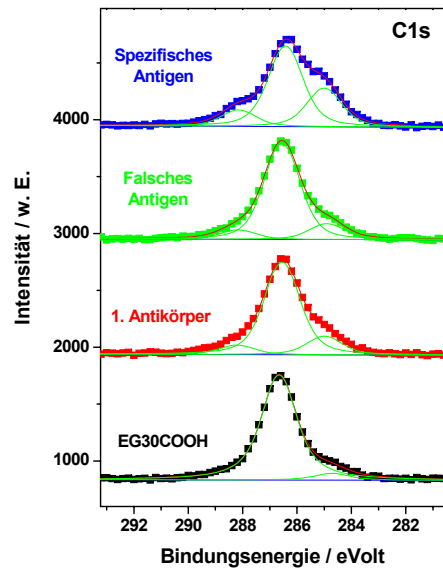
<i>PEG-Matrix</i>	<i>Schichtdicke</i> / Å	<i>Ether-C1s/O1s-Verhältnis</i>	<i>Ether-C1s/O1s-Verhältnis (Soll)</i>
EG15COOH	38,8	2,08	1,78
EG22COOH	58,1	2,07	1,84
EG30COOH	82,2	2,14	1,88
EG36COOH	89,3	2,22	1,90

Tab. IV.I.1-7: Theoretisch zu erwartendes und röntgenphotoelektronenspektroskopisch bestimmtes Ether-C1s-/O1s-Verhältnis für die COOH-terminierten PEG-Beschichtungen.

Das durch Anpassung der Spektren ermittelte Ether-C1s/O1s-Verhältnis liegt geringfügig über dem theoretisch zu erwartendem Sollwert.

Die Bindung der Antikörper führt, wie in Abschnitt 1.1.3.3 bereits beschrieben, zum Auftreten zusätzlicher Signallagen in den C1s- und O1s-Detailspektren. Diese Beiträge können von denen des Basisfilms durch eine Anpassung isoliert werden.

Die Abbildungen IV.I.1-20 bis -23 zeigen die für die einzelnen Basisfilme nach den beschriebenen Biofunktionalisierungen aufgenommenen und angepassten C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren.



EG30COOH

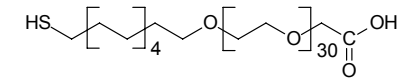
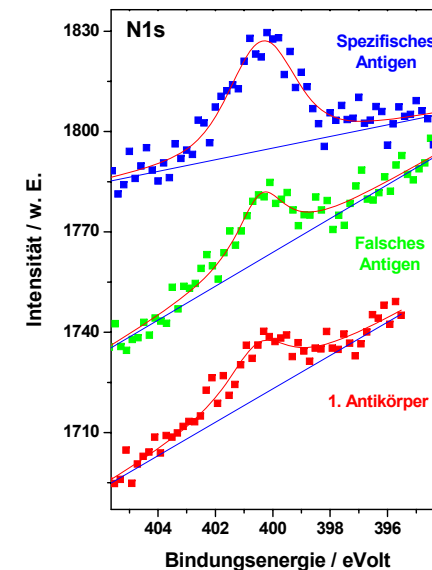
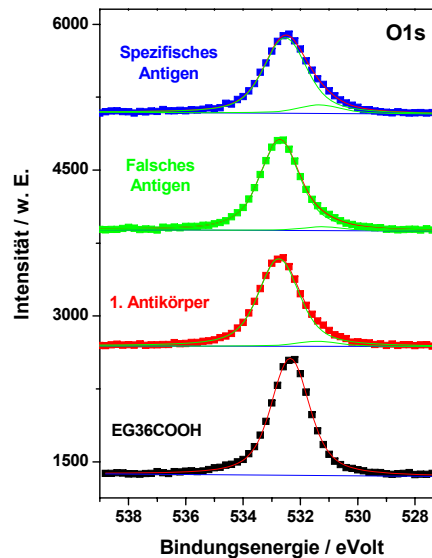
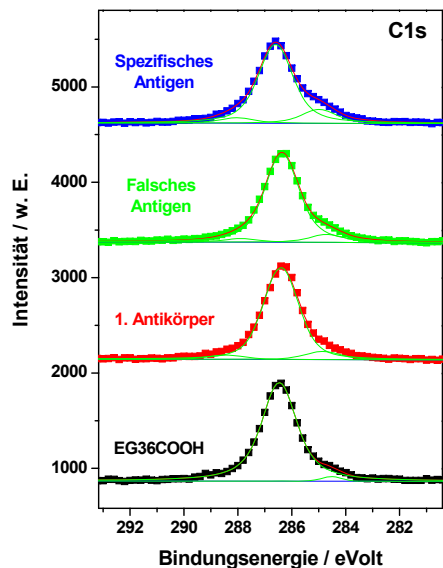


Abb. IV.I.1-22:

Angepasste C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren. Aufgenommen nach Adsorption von EG30COOH (schwarz), Bindung des Erstantikörpers (rot) sowie nach Behandlung mit dem falschen (grün) und dem spezifischen Antigen (rot).



EG36COOH

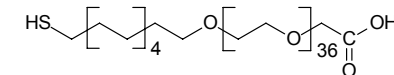


Abb. IV.I.1-23:

Angepasste C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren. Aufgenommen nach Adsorption von EG36COOH (schwarz), Bindung des Erstantikörpers (rot) sowie nach Behandlung mit dem falschen (grün) und dem spezifischen Antigen (rot).

Die Bindung der Antikörper kann anhand des Intensitätsverlaufs der auf sie zurückzuführenden XP-Signale analysiert werden. In den Abbildungen IV.I.1-24 und -25 ist der für die verwendeten PEG-Beschichtungen erhaltene Verlauf der N1s- sowie derer der Protein-C1s-Intensität (C1s-Signale bei 285,1 und 278,8 eV) für die Bindungsstudien an den verschiedenen Basisfilmen graphisch dargestellt. Die Tabelle IV.I.1-8 enthält die nach den Biofunktionalisierungen durch die Spektrenanpassung ermittelten Ether-C1s/O1s-Verhältnisse.

<i>Ether-C1s/O1s-Verhältnis</i>				
<i>Stufe</i>	<i>EG15COOH</i>	<i>EG22COOH</i>	<i>EG30COOH</i>	<i>EG36COOH</i>
1. Antikörper	2,05	1,89	2,22	2,22
falsches Antigen	2,26	2,17	2,25	2,28
spez. Antigen	2,64	2,61	2,24	2,29
Sollwert	1,78	1,84	1,88	1,90

Tab. IV.I.1-8: Nach den Biofunktionalisierungen durch Anpassung der XP-Spektren ermittelte Ether-C1s/O1s-Verhältnisse sowie der theoretisch zu erwartende Sollwert.

Die Ether-Verhältnisse liegen nahe des theoretisch zu erwartenden Sollwerts, was für die Gültigkeit der Spektrenanpassungen spricht. Im Bereich höherer Antikörper-Massenbelegungen ergeben sich jedoch teilweise Werte, die den Theoriewert stärker überschreiten und auf mit der Anpassung mehrerer Signallagen verbundene höhere Ungenauigkeiten zurückgeführt werden können.

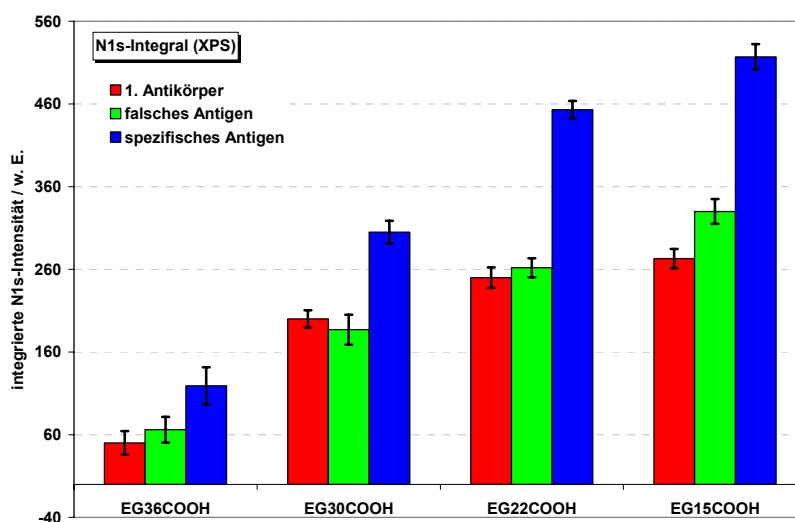
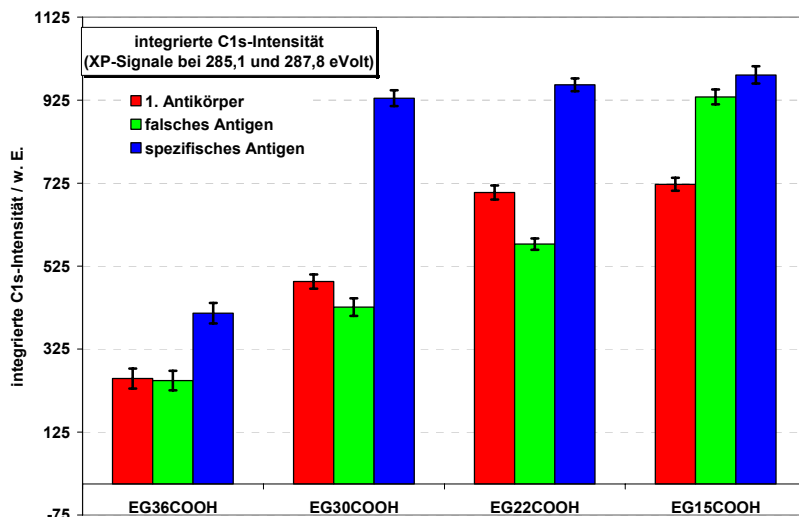


Abb. IV.I.1-24:

Verlauf der auf die gebundenen Proteine zurückzuführenden N1s-Intensität in Abhängigkeit von den an den COOH-terminierten PEG-Beschichtungen (mittlere Kettenlänge von 15, 22, 30 und 36 EG-Einheiten) durchgeführten Antikörper-Antigen-Umsetzungen.

**Abb. IV.I.1-25:**

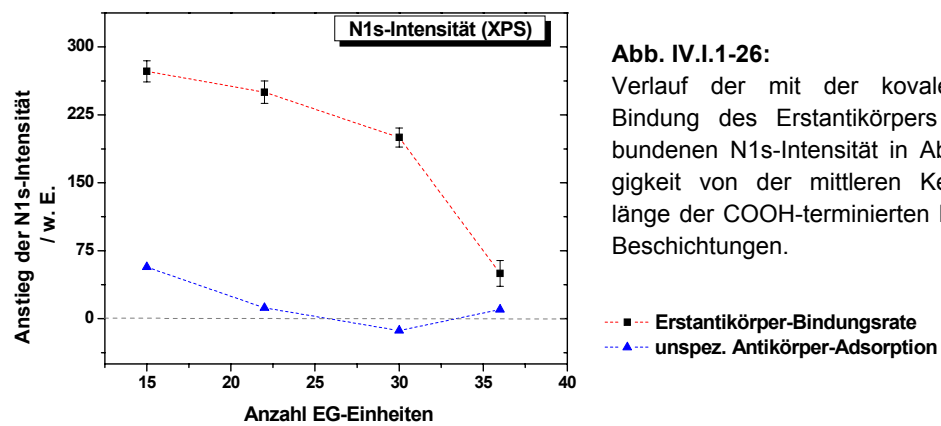
Verlauf der auf die gebundenen Proteine zurückzuführenden C1s-Intensität in Abhängigkeit von den an den COOH-terminierten PEG-Beschichtungen (mittlere Kettenlänge von 15, 22, 30 und 36 EG-Einheiten) durchgeführten Antikörper-Antigen-Umsetzungen.

Der Verlauf der integrierten N1s-Intensität stimmt mit dem anhand der FT-IR- und Ellipsometrie-Messungen erhaltenem Bindungsverlauf gut überein.

Im Bereich höherer Protein-Schichtdicken wird ihre Bindungsrate XP-spektroskopisch jedoch unterschätzt. Insbesondere für die Bindung des Zweitantikörpers fällt der Intensitätsanstieg geringer aus, als anhand der FT-IR- und Ellipsometrie-Auswertungen zu erwarten wäre. Ursache ist, dass im Fall der Röntgenphotoelektronenspektroskopie eine schichtdickenabhängige Signalabschwächung auftritt, so dass der Bindungsverlauf mittels dieser Methode nur qualitativ beschrieben werden kann.

Der Verlauf der Protein-C1s-Intensität ist ebenfalls dem mittels der anderen Analysemethoden Erhaltenem ähnlich. Hier ergeben sich jedoch größere Abweichungen, die vor allem darauf zurückzuführen sind, dass die Auflösung der einzelnen Signallagen nur gering ist und die zur Eliminierung der Basisfilm-Beiträge durchgeführte Spektrenanpassung daher mit höheren Ungenauigkeiten verbunden ist. Allerdings ist auch hier ein mit abnehmender Kettenlänge verbundener Anstieg der Protein-C1s-Intensität deutlich zu erkennen.

Insbesondere für EG15COOH und EG22COOH ergibt auch die Auswertung der XP-Spektren eine ähnlich große Erstantikörper-Bindungsrate, wobei nur im Fall des EG15COOH nach der Behandlung mit dem falschen Antigen ein unspezifischer Adsorptionsbeitrag zu erkennen ist. In der Abbildung IV.I.1-26 ist der nach Bindung des Erstantikörpers und der Behandlung mit dem unspezifischen Antigen resultierende Anstieg der N1s-Intensität gegen die mittlere Anzahl an EG-Einheiten der verschiedenen Basisfilme aufgetragen.

**Abb. IV.I.1-26:**

Verlauf der mit der kovalenten Bindung des Erstantikörpers verbundenen N1s-Intensität in Abhängigkeit von der mittleren Kettenlänge der COOH-terminierten PEG-Beschichtungen.

Ein Vergleich mit den Abbildungen IV.I.1-11, -15, und -18 zeigt die gute Übereinstimmung des erhaltenen Bindungsverlaufs mit den Ergebnissen der bereits beschriebenen Analysemethoden, so dass auch hier die Schlussfolgerungen der Abschnitte 1.2.1.1 und 1.2.1.2 gelten.

1.2.1.5 Fazit

In der Abbildung IV.I.1-27 ist die mittels der verschiedenen Analysemethoden erhaltene Abhängigkeit der Bindungsrate des Erstantikörpers von der mittleren Kettenlänge der verwendeten PEG-Beschichtungen dargestellt; außerdem ist der Verlauf der unspezifischen Adsorptionsrate angegeben, der durch Behandlung der Rezeptor-funktionalisierten Oberflächen mit dem falschen Antigen ermittelt wurde. Die angegebenen Werte beziehen sich in dieser Darstellung auf den jeweiligen Maximalwert, der für alle beschriebenen Analysemethoden bei einer Kettenlänge von 15 EG-Einheiten lag.

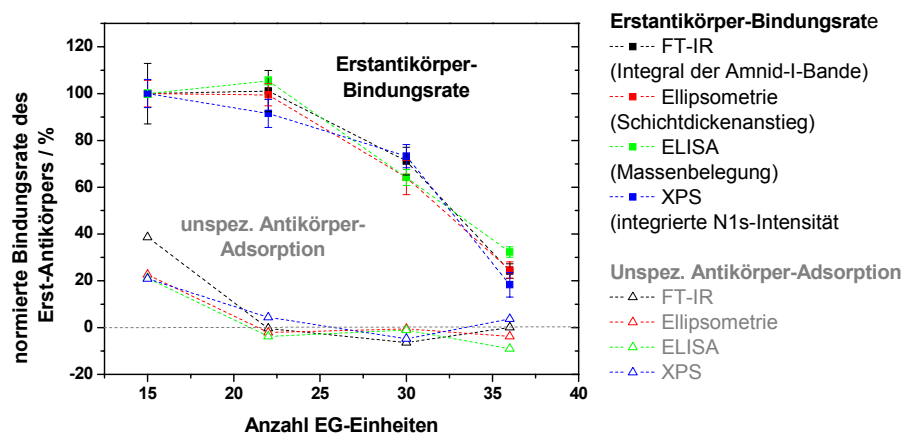


Abb. IV.I.1-27:

Vergleich der mittels der verschiedenen Analysemethoden erhaltenen normierten Bindungsrate des kovalent gebundenen Erstantikörpers in Abhängigkeit von der mittleren EG-Anzahl der COOH-terminierten PEG-Beschichtungen.

In dieser normierten Form zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den anhand der verschiedenen Analysemethoden erhaltenen Bindungs- und Adsorptionsverläufen, wodurch die Auswertungen der vorstehenden Abschnitte zusätzlich bestätigt werden. Die maximale Abweichung liegt in dieser Darstellung bei etwa 15%.

Mit zunehmender Kettenlänge der verwendeten PEG-Matrix nimmt ihre Proteinbindungskapazität ab einer mittleren Kettenlänge von etwa 22 EG-Einheiten kontinuierlich ab. Da die unspezifische Adsorptionsrate mit zunehmender Kettenlänge ebenfalls reduziert wird, besteht die Vermutung, dass mit der Kettenlänge ansteigende Repulsionskräfte eine Annäherung der Proteine an die Oberfläche zunehmend erschweren und die Bindungsraten somit herabsetzen.

1.2.2 Amino-terminierte PEG-Beschichtungen

Die in der Tabelle IV.I.1-1 aufgeführten Amino-terminierten PEG-Thiole EG(17, 31, 40)NH₂ wurden auf eine analoge Weise wie in Abschnitt 1.2.1 für die Carboxyterminierten PEG-Thiole beschrieben hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur kovalenten Integration von Antikörpern untersucht.

1.2.2.1 FT-IR-Messungen

Zur Analyse einer Abhängigkeit zwischen der Proteinbindungskapazität und der Kettenlänge der verwendeten PEG-Beschichtungen ist es wichtig nachzuweisen, dass die präparierten Monolagen einen ähnlichen Bedeckungsgrad aufweisen, da die Bindungsrate auch durch diesen Parameter beeinflusst wird [11]. Zur Bestimmung der Morphologie kann unter anderem die FT-IR-Spektroskopie eingesetzt werden, welche somit auch eine Auskunft über den vorliegenden Bedeckungsgrad ermöglicht.

In der Abbildung IV.I.1-28 sind die FT-IR-Spektren gezeigt, welche von den aminoterminierten Beschichtungen nach den einzelnen Umsetzungsschritten aufgenommen wurden.

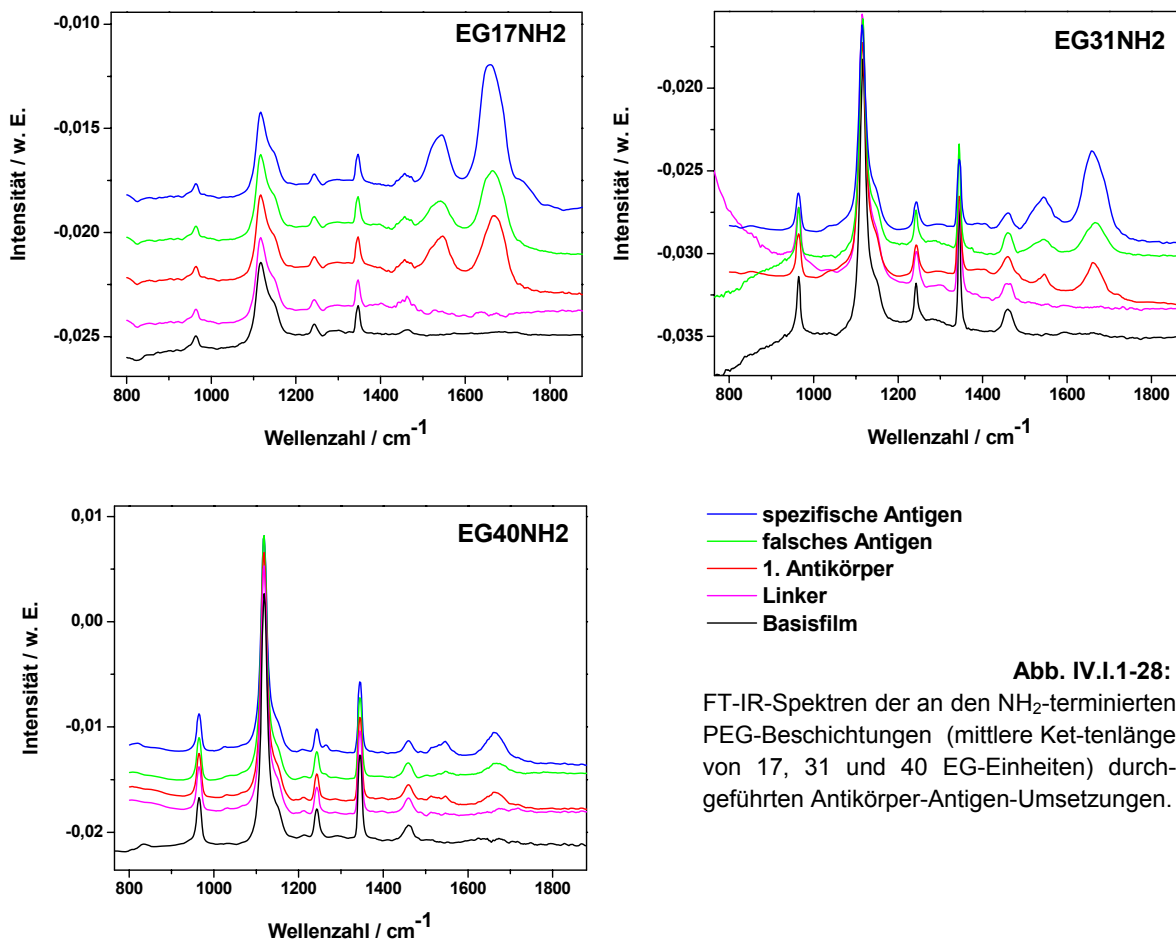


Abb. IV.I.1-28:
FT-IR-Spektren der an den NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen (mittlere Kettenlänge von 17, 31 und 40 EG-Einheiten) durchgeführten Antikörper-Antigen-Umsetzungen.

Die präparierten Monolagen zeigen im Streckschwingbereich die für eine kristalline Modifikation typischen Schwingungsmoden. Insbesondere die schmale und starke Resonanz der bei 1118 cm^{-1} auftretenden COC-Streckschwingung und die CH_2 -Kippschwingung bei 1345 cm^{-1} sind deutlich ausgeprägt, so dass von einer vorwiegend helikalen Konformation der PEG-Ketten und somit auch einem relativ hohem Bedeckungsgrad ausgegangen werden kann, was durch die ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken zusätzlich bestätigt wird.

Bei der Verbindung EG17NH2 ist im Gegensatz zu den längerkettigen PEG-Beschichtungen die bei etwa 1140 cm^{-1} auftretende und für eine amorphe Modifikation typische Schulter der COC-Streckschwingung jedoch deutlicher ausgeprägt. Die Kettenlängenverteilung führt bei dieser kürzerkettigen Verbindung somit zu einem höheren amorphen Filmbestandteil.

In der Abbildung IV.I.1-29 ist der Verlauf des Flächeninhaltes der Amid-I-Bande (Integrationsbereich von 1590 bis 1780 cm^{-1}) für die aminotermiierten PEG-Thiole graphisch dargestellt.

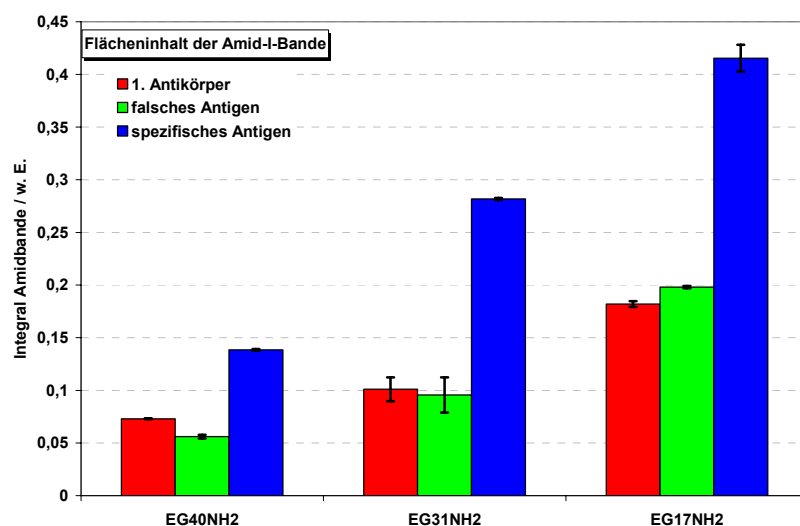


Abb. IV.I.1-29:

Verlauf der Intensität der in den FT-IR-Spektren nach der Umsetzung mit den Antikörpern bei $\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ auftretenden Amid-I-Bande für die an den NH_2 -terminierten PEG-Beschichtungen unterschiedlicher Kettenlänge durchgeführten Antikörper-Antigen-Kopplungen.

Die Abbildung IV.I.1-29 zeigt eine mit ansteigender Kettenlänge verbundene Abnahme der Bindungskapazität.

Ein deutlicher Sprung in der Bindungsrate besteht zwischen den Verbindungen EG17NH2 und EG31NH2. Die Bindungsrate des Erstantikörpers nimmt bei einer Zunahme der mittleren EG-Anzahl zwischen diesen beiden Verbindungen (Erhöhung des EG-Gehalts um 82,4 %) um etwa 44,5 % ab. Bei den hinsichtlich der Kettenlänge vergleichbaren Verbindungen EG15COOH und EG30COOH wurde dagegen nur eine Abnahme von etwa 29% festgestellt. Eine weitere Zunahme der Kettenlänge von EG31NH2 zu EG40NH2 (Zunahme des EG-Gehaltes um 29%) führt zu einer fortschreitenden Reduktion der Kopplungsrate um etwa 27,7%. Zwischen den vergleichbaren Verbindungen EG30COOH und EG36COOH wurde eine ähnlich große Abnahme der Bindungskapazität von etwa 20% ermittelt.

Im Fall des EG17NH₂ wird im Gegensatz zu den längerkettigen Verbindungen nach Behandlung der Rezeptor-funktionalisierten Oberflächen mit einem falschen Antigen ein Intensitätsanstieg von etwa 8,8% beobachtet, der einen unspezifischen Adsorptionsbeitrag darstellt.

Die Tabelle IV.I.1-9 gibt die Erstantikörper-Bindungsraten an, welche anhand der FT-IR-Spektren für die NH₂- und COOH-terminierten Basisfilme vergleichbarer Kettenlänge berechnet wurden. In der Abbildung IV.I.1-30 sind diese gegen die mittlere Anzahl an EG-Einheiten aufgetragen; außerdem ist die durch Behandlung mit dem falschen Antigen hervorgerufene unspezifische Adsorption der aminotermierten Oberflächen angegeben.

<i>PEG-Matrix</i>	<i>Bindungsrate</i> / %	<i>Bindungsrate</i> / %	<i>PEG-Matrix</i>
EG17NH₂	56	38	EG15COOH
EG31NH₂	32	27	EG30COOH
EG40NH₂	23	9	EG36COOH

Tab. IV.I.1-9: FT-IR-spektroskopisch für die COOH- und NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen ermittelte Bindungsrate des Erstantikörpers.

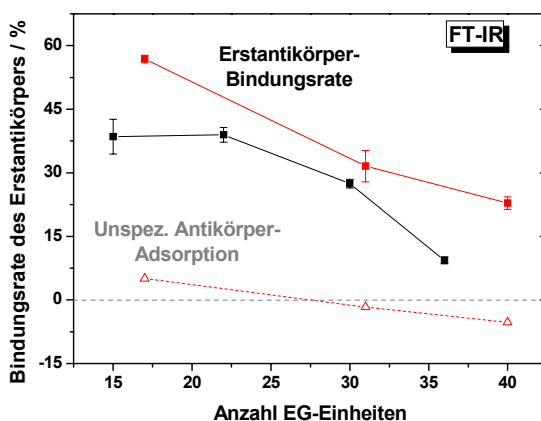


Abb. IV.I.1-30:

Abhängigkeit der FT-IR-spektroskopisch ermittelten Erstantikörper-Bindungsrate von der mittleren EG-Anzahl der NH₂- und COOH-terminierten PEG-Beschichtungen.

Erstantikörper-Bindungsrate
 —■— NH₂-terminiert
 —■— COOH-terminiert
Unspez. Antikörper-Adsorption
 - - - Δ - - - NH₂-terminiert

Analog zu den carboxyterminierten Verbindungen zeigen auch die aminotermierten eine mit der mittleren Kettenlänge verbundene Abnahme ihrer Bindungs- und Adsorptionsraten. Im Gegensatz zu den längerkettigen Verbindungen zeigt nur EG17NH₂ einen unspezifischen Adsorptionsbeitrag.

Der Bindungsverlauf der COOH- und NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen unterscheidet sich jedoch; neben der mittleren Anzahl an EG-Einheiten scheint die Proteinresistenz einer

PEG-Beschichtung daher auch von der Art ihrer funktionellen Terminierung bestimmt zu werden.

Die Bindungskurve der aminoterminierten Beschichtungen liegt über derer der Carboxy-terminierten; bei einer vergleichbaren Kettenlänge ist die Bindungsrate der aminoterminierten Matrizen daher durchweg höherer als diejenige der Carboxyterminierten. Die Bindungsrate des EG17NH₂ überschreitet diejenige der Verbindung EG15COOH um einen Faktor von etwa 1,5; für EG31NH₂ wird eine etwa 1,2-fach höhere Bindungsrate als für das vergleichbar lange EG30COOH ermittelt und die Bindungskapazität des EG40NH₂ liegt trotz der längeren PEG-Kette etwa 2,5-fach höher als diejenige der Verbindung EG36COOH. Die aminoterminierten Beschichtungen zeichnen sich somit durch eine höhere Protein-Bindungskapazität aus.

Während die Bindungskurve der carboxyterminierten PEG-Beschichtungen bereits bei einer Kettenlänge von etwa 22 EG-Einheiten in die Sättigung geht, scheint bei den Aminoterminierten eine weitere Steigerung der Kopplungsrate bei Reduktion der Kettenlänge hingegen möglich.

Zwischen einer mittleren EG-Anzahl von 30 bis 40 EG-Einheiten zeigen die carboxyterminierten Verbindungen zudem eine stärkere Abnahme der Bindungskapazität als die aminoterminierten Beschichtungen, deren Bindungskurve durch einen näherungsweise linearen Verlauf charakterisiert wird.

Die bei einer vergleichbaren Kettenlänge auftretenden Abweichungen müssen auf ihre funktionelle Terminierung zurückgeführt werden, welche den einzigen Unterschied zwischen den beiden Beschichtungsklassen ausmacht (die Verbindungen weisen einen ähnlichen Bedeckungsgrad auf; s. Abschnitt 1.2.2.2). Es wird vermutet, dass diese zu unterschiedlichen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der PEG-Matrix und der Proteine führt.

Da die meisten Proteine eine negative Nettoladung besitzen, sind verstärkte Anziehungskräfte im Fall positiv geladener Oberflächen zu erwarten. Die in wässriger Lösung eintretende Protonierung der Aminogruppen führt bei dieser Verbindungsklasse zu einer Ausbildung von positiven Oberflächenladungen, so dass die in diesem Fall beobachteten höheren Bindungsraten verständlich sind. Denn es ist davon auszugehen, dass selbst nach der Umsetzung mit dem Linkermolekül noch freie Aminogruppen im Innern der amorphen Oberflächenstruktur der PEG-Matrix vorhanden sind.

Dagegen bewirkt die Dissoziation der Carboxygruppen über die Entstehung von Carboxylatgruppen eine Ausbildung von negativen Oberflächenladungen, welche eine verstärkte Protein-Abstoßung zur Folge haben sollten.

Beide Verbindungsklassen führen somit über die Beeinflussung des Protolysegleichgewichts und der Ausbildung von Oberflächenladungen zu unterschiedlichen elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der PEG-Matrix und der Proteine.

Der Einfluss der Kettenlänge auf die Bindungsrate der aminoterminierten Beschichtungen macht sich analog zu den carboxy-terminierten Verbindungen allerdings auch hier in einer mit der Kettenlänge deutlich abnehmenden Bindungsrate bemerkbar.

Insgesamt kann daher festgestellt werden, dass das Aussehen der in Abbildung III.I.1-30 gezeigten Bindungskurven sowohl von der mittleren Kettenlänge der PEG-Matrix, ihres Bedeckungsgrads und der Endgruppenfunktionalität (bzw. der effektiven Oberflächenladungen) bestimmt wird.

1.2.2.2 Ellipsometrie-Messungen

Die nach den einzelnen Umsetzungsschritten resultierenden Schichtdicken wurden ellipsometrisch bestimmt. In der Abbildung IV.I.1-31 sind diese für die verwendeten PEG-Beschichtungen graphisch dargestellt.

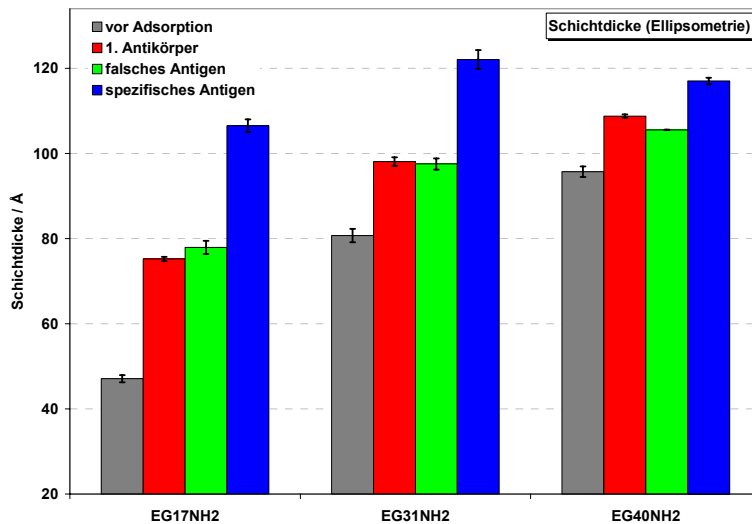


Abb. IV.I.1-31:

Verlauf der ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken für die an den NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen (EG17NH₂, EG31-NH₂ und EG40NH₂) durchgeführten Antikörper-Antigen-Kopplungen.

Die Schichtdicken der PEG-Monolagen nehmen mit der Kettenlänge der adsorbierten PEG-Thiole erheblich zu, so dass von einer vorwiegend helikalen und gestreckten Konformation der PEG-Ketten ausgegangen werden kann. Ihr Bedeckungsgrad kann durch Bezug auf der für einen vollständig helikal geordneten PEG-Film theoretisch zu erwartenden Schichtdicke berechnet werden.

In der Tabelle IV.I.1-10 sind die Schichtdicken der jeweiligen Basisfilme, ihr Bedeckungsgrad und die prozentuale Bindungsrate des Erstantikörpers angegeben. Zum Vergleich ist außerdem die prozentuale Bindungsrate angegeben, die anhand der FT-IR-Spektren berechnet werden konnte.

PEG-Matrix	Schichtdicke	Bedeckungsgrad	Bindungsrate	Bindungsrate
	/ Å	/ %	(Ellips.) / %	(FT-IR) / %
EG17NH2	47,1	78	55	56
EG31NH2	80,7	81	39	32
EG40NH2	95,7	77	30	23

Tab. IV.I.1-10: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicke, Bedeckungsgrad und normierte Bindungsrate des Erstantikörpers für die NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen; rechte Spalte: FT-IR-spektroskopisch ermittelte Bindungsrate des Erstantikörpers.

Auch diese Messungen ergeben eine mit der mittleren Kettenlänge verbundene Abnahme der Antikörper-Bindungsrate. Die ermittelten Bindungsraten stimmen zudem gut mit den anhand der FT-IR-Messungen erhaltenen überein; die maximale Abweichung beträgt etwa 7%.

Der Bedeckungsgrad der präparierten Monolagen ist jedoch sehr ähnlich (Durchschnitt 78,6%), so dass die unterschiedlichen Kopplungsraten nicht auf diesen zurückgeführt werden können.

In der Abbildung IV.I.1-33 ist der mit den einzelnen Umsetzungsschritten verbundene Schichtdickenanstieg graphisch dargestellt; die jeweiligen Werte sind in der Tabelle IV.I.1-11 aufgeführt.

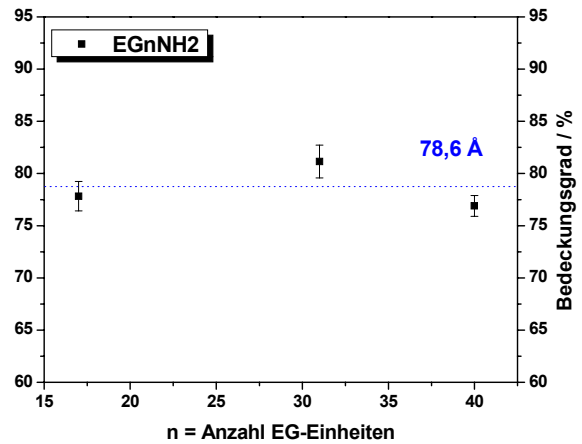


Abb. IV.I.1-32: Ellipsometrisch ermittelter Bedeckungsgrad der NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen (17, 31 und 40 EG-Einheiten).

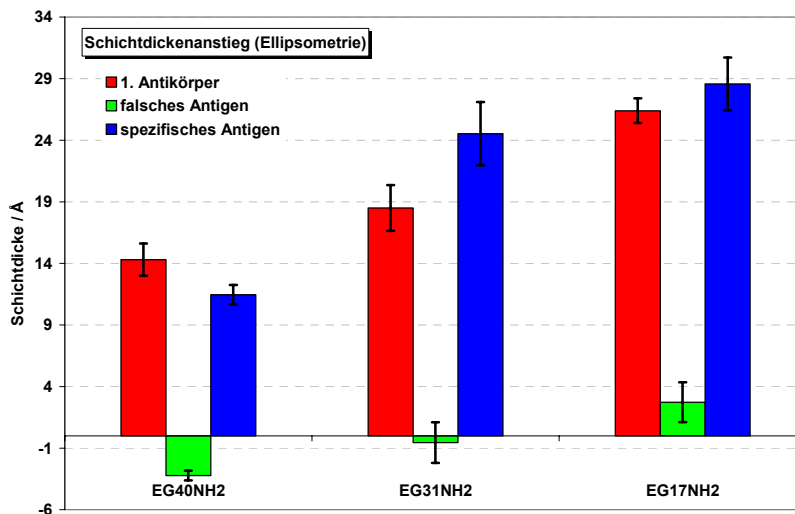


Abb. IV.I.1-33: Verlauf des mit den Anti-körper-Antigen-Umsetzungen an den NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen (mittlere Kettenlänge von 17, 31 und 40 EG-Einheiten) verbundenen Schichtdickenanstiegs.

Stufe	EG17NH2	EG31NH2	EG40NH2
1. Antikörper	26,40	2,73	28,57
Falscher Antikörper	18,50	-0,55	24,54
Spez. Antigen	14,30	-3,22	11,46

Tab. IV.I.1-11: Nach den Biofunktionalisierungen an den verschiedenen NH₂-terminierten PEG-Matrizen ellipsometrisch ermittelter Schichtdickenanstieg.

Die mit zunehmender Kettenlänge der PEG-Moleküle verbundene Abnahme der Bindungsrate ist in dieser Darstellung deutlich erkennbar. Nur die Verbindung EG17NH2 zeigt nach der Behandlung mit dem falschen Antigen einen unspezifischen Adsorptionsbeitrag; die längerkettigeren PEG-Moleküle weisen nach diesem Schritt jedoch geringfügig niedrigere Schichtdicken auf, die vermutlich auf eine mit den Waschschrritten verbundene teilweise Ablösung der PEG-Matrix zurückzuführen sind.

In der Abbildung IV.I.1-34 ist die Bindungsrate des Erstantikörpers und die unspezifische Adsorptionsrate des falschen Antigens in Abhängigkeit von der mittleren Anzahl der EG-Einheiten graphisch dargestellt; zum Vergleich ist außerdem die Bindungskurve der carboxyterminierten PEG-Thiole mit eingetragen.

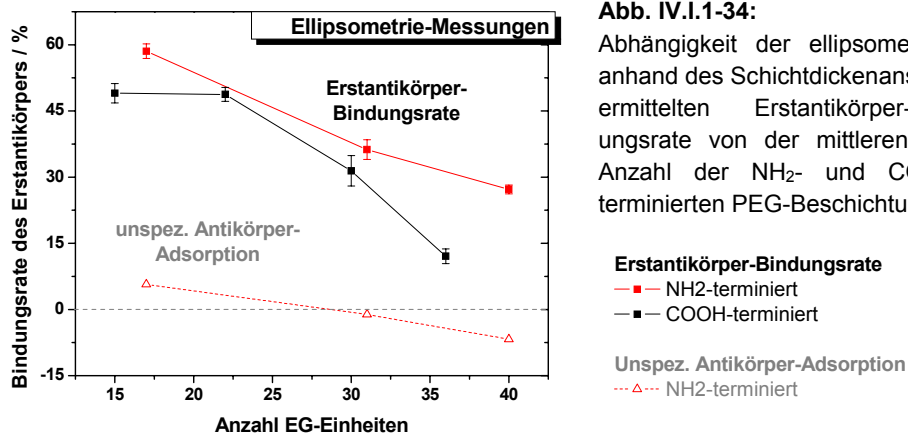


Abb. IV.I.1-34:

Abhängigkeit der ellipsometrisch anhand des Schichtdickenanstiegs ermittelten Erstantikörper-Bindungsrate von der mittleren EG-Anzahl der NH₂- und COOH-terminierten PEG-Beschichtungen.

Erstantikörper-Bindungsrate

—■— NH₂-terminiert
—■— COOH-terminiert

Unspez. Antikörper-Adsorption

---△--- NH₂-terminiert

Ein Vergleich mit der Abbildung IV.I.1-30 zeigt die gute Übereinstimmung des ellipsometrisch ermittelten Bindungsverlaufs mit dem anhand der Auswertung der FT-IR-Spektren erhaltenen. Es gelten somit auch hier die Schlussfolgerungen des Abschnitts 1.2.2.1

1.2.2.3 Enzymkinetische ELISA-Messungen

Die Massenbelegung der immobilisierten Peroxidase-markierten Antikörper wurde mittels eines Festphasen-ELISAs bestimmt.

Die Abbildung IV.I.1-35 zeigt den Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS, der nach der Bindung des Erstantikörpers an die verschiedenen Basisfilme erhalten wurde.

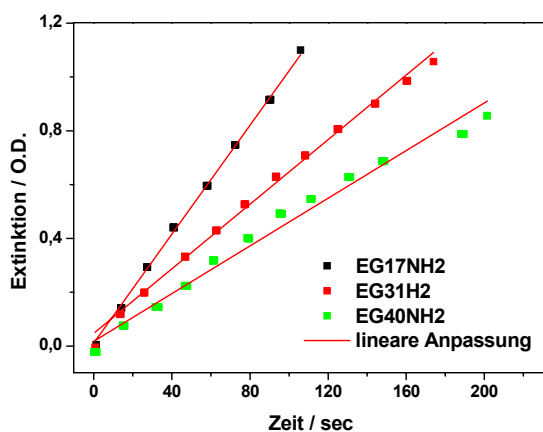


Abb. IV.I.1-35:

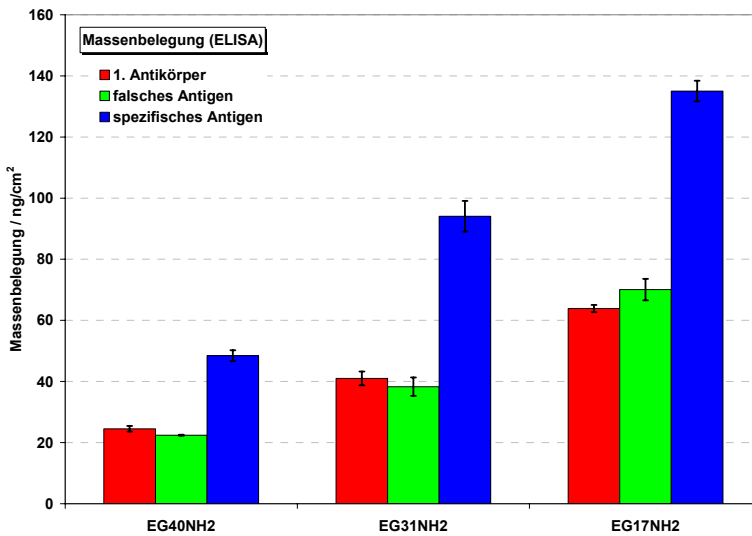
Nach Bindung des Erstantikörpers an die NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen durchgeführte ELISA-Messungen (UV/Vis-spektroskopisch detektierter Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS).

Eine enzymkinetische Auswertung nach dem Michaelis-Menten-Mechanismus führt zu den in der Tabelle IV.I.1-12 aufgeführten Antikörper-Massenbelegungen.

	<i>Massenbelegung [ng/cm²]</i>		
EGnNH₂	n = 17	n = 31	n = 40
1. Antikörper	63,9	39,6	29,7
Falsches Antigen	70,1	38,3	22,4
Spezifisches Antigen	135,0	94,1	48,4

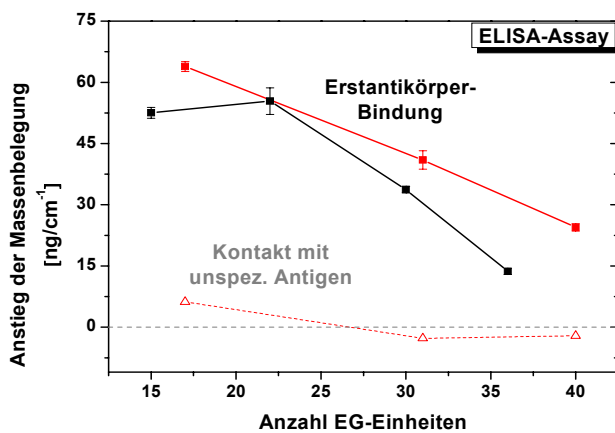
Tab. IV.I.1-12: Enzymkinetisch mittels des ELISA-Assays bestimmte Antikörper-Massenbelegung für die an den NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen durchgeführten Antikörper-Antigen-Umsetzungen.

Die Abbildung IV.I.1-36 zeigt den für die verschiedenen Basisfilme erhaltenen Verlauf der Antikörper-Massenbelegung.

**Abb. IV.I.1-36:**

Verlauf der anhand des ELISA-Assays ermittelten Antikörper-Massenbelegung (ng/cm^2) für die an den NH_2 -terminierten PEG-Beschichtungen (mittlere EG-Anzahl von 17, 31 und 40 EG-Einheiten) durchgeführten Antikörper-Antigen-Umsetzungen.

In der Abbildung IV.I.1-37 ist der nach Bindung des Erstantikörpers und der Behandlung mit dem falschen Antigen enzymkinetisch ermittelte Anstieg der Antikörper-Massenbelegung gegen die mittlere Anzahl der EG-Einheiten aufgetragen; zum Vergleich ist außerdem der für die carboxyterminierten Beschichtungen erhaltene Verlauf mit angegeben.

**Abb. IV.I.1-37:**

Verlauf der enzymkinetisch ermittelten Massenbelegung (ng/cm^2) des kovalent gebundenen Erstantikörpers in Abhängigkeit von der mittleren Kettenlänge der NH_2 - und COOH -terminierten PEG-Beschichtungen.

Erstantikörper-Bindung
 —■— NH_2 -terminiert
 —■— COOH -terminiert

Unspez. Antigen
 - - -△- - - NH_2 -terminiert

Der erhaltene Bindungsverlauf ist dem anhand der FT-IR- und Ellipsometrie-Messungen Erhaltenem sehr ähnlich (s. Abschnitt 1.2.2.1 und 1.2.2.2), so dass auch hier dieselben Aussagen bezüglich der Abhängigkeit der Bindungsrate von der mittleren Kettenlänge der PEG-Beschichtungen und der Art ihrer funktionellen Terminierung gelten.

1.2.2.4 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Von den Oberflächen wurden außerdem vor und nach der Adsorption der PEG-Thiole sowie nach den einzelnen Umsetzungsschritten mit den Antikörpern XP-Spektren aufgenommen. In der Abbildung IV.I.1-38 sind die C1s-Detailspektren der verschiedenen Basisfilme dargestellt. Das bei etwa 284,3 eV detektierte Signal ist den aliphatischen Kohlenstoffen des Alkylspacers zuzuordnen; die Ether-Kohlenstoffe führen zu einer Signallage bei ca. 286,3 eV.

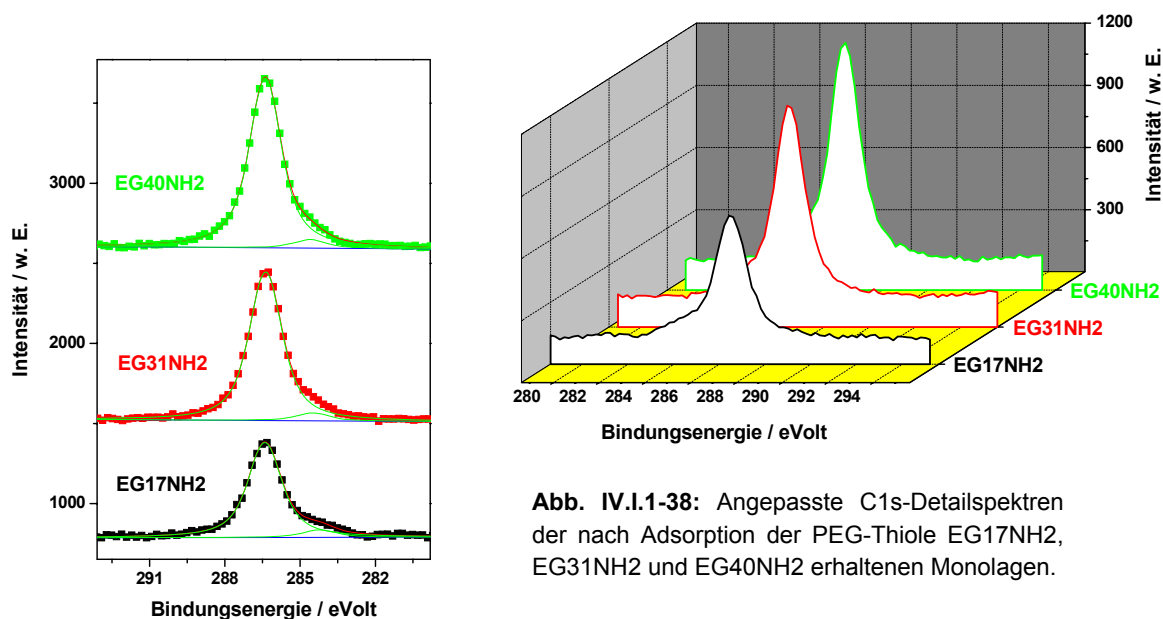


Abb. IV.I.1-38: Angepasste C1s-Detailspektren der nach Adsorption der PEG-Thiole EG17NH2, EG31NH2 und EG40NH2 erhaltenen Monolagen.

Mit zunehmender Kettenlänge der adsorbierten PEG-Thiole ist, wie anhand der ellipsoidisch ermittelten Schichtdicken zu erwarten, ein Anstieg der C1s-Intensität verbunden. Die Tabelle IV.I.1-13 enthält die berechneten und theoretisch zu erwartenden Ether-C1s/O1s-Verhältnisse.

<i>PEG-Matrix</i>	<i>Schichtdicke</i> / Å	<i>Ether-C1s/O1s-Verhältnis</i>	<i>Ether-C1s/O1s-Verhältnis (Soll)</i>
EG17NH2	47,1	2,19	2,06
EG31NH2	80,7	2,17	2,03
EG40NH2	95,7	2,30	2,03

Tab. IV.I.1-13: Theoretisch zu erwartendes und röntgenphotoelektronenspektroskopisch bestimmtes Ether-C1s-/O1s-Verhältnis für die NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen.

Die durch Anpassung der Spektren erhaltenen Ether-C1s/O1s-Verhältnisse liegen nahe am theoretisch zu erwartenden Sollwert. Verunreinigungen der präparierten Monolagen können somit weitgehend ausgeschlossen werden.

Die Bindung der Antikörper führt, wie bereits beschrieben, zum Auftreten zusätzlicher Signallagen in den C1s- und O1s-Detailspektren, deren Beiträge von denen des verwendeten Basisfilms durch eine Spektren-Anpassung isoliert und zu einer qualitativen Interpretation dieser Bindungsprozesse herangezogen werden können.

In den Abbildungen IV.I.1-39 bis -41 sind die angepassten C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren gezeigt, welche für die verschiedenen Basisfilme nach den einzelnen Umsetzungsschritten mit den Antikörpern aufgenommen wurden.

Die nach den Biofunktionalisierungen erhaltenen Ether-C1s/O1s-Verhältnisse sind in der Tabelle IV.I.1-14 aufgeführt.

<i>Ether-C1s/O1s-Verhältnis</i>			
<i>Stufe</i>	<i>EG17NH2</i>	<i>EG31NH2</i>	<i>EG40NH2</i>
1. Antikörper	2,43	2,00	2,00
falsches Antigen	2,55	2,07	2,00
spez. Antigen	2,61	2,27	1,98
Sollwert	2,06	2,03	2,03

Tab. IV.I.1-14: Nach den Biofunktionalisierungen durch Anpassung der XP-Spektren ermittelte Ether-C1s/O1s-Verhältnisse sowie der theoretisch zu erwartende Sollwert.

Diese liegen, mit einigen Ausnahmen im Bereich höherer Proteinschichtdicken, innerhalb des theoretisch zu erwartenden Sollwertbereiches und bestätigen somit die Gültigkeit der durchgeführten Spektrenanpassungen.

In den Abbildungen IV.I.1-42 und IV.I.1-43 ist der Verlauf der auf die Proteine zurückzuführenden N1s- und C1s-Intensitäten dargestellt.

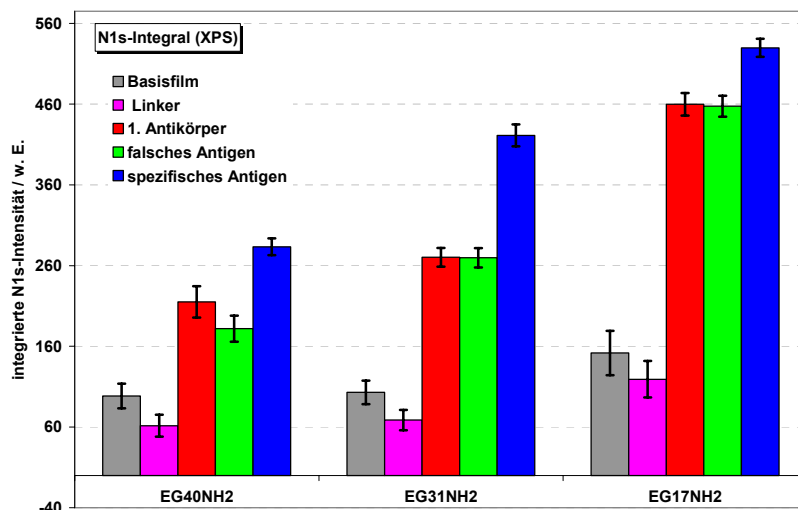
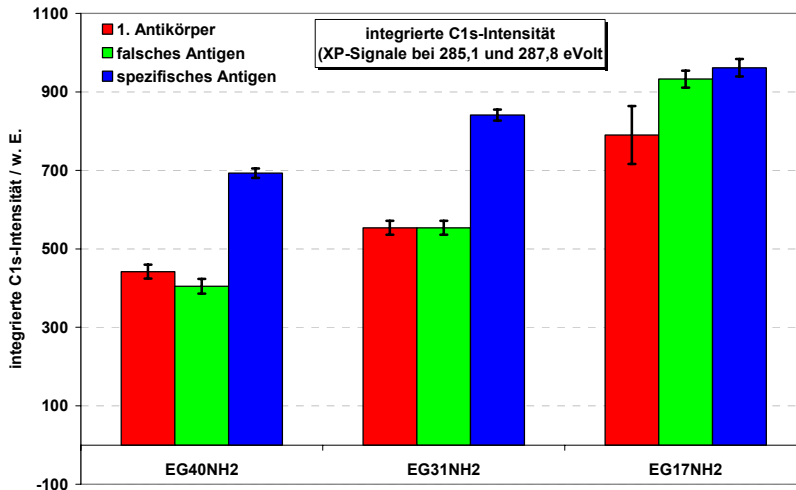


Abb. IV.I.1-42:

Verlauf der auf die gebundenen Proteine zurückzuführenden N1s-Intensität in Abhängigkeit von den an den NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen (mittlere Kettenlänge von 17, 31 und 40 EG-Einheiten) durchgeführten Antikörper-Antigen-Umsetzungen.

**Abb. IV.I.1-43:**

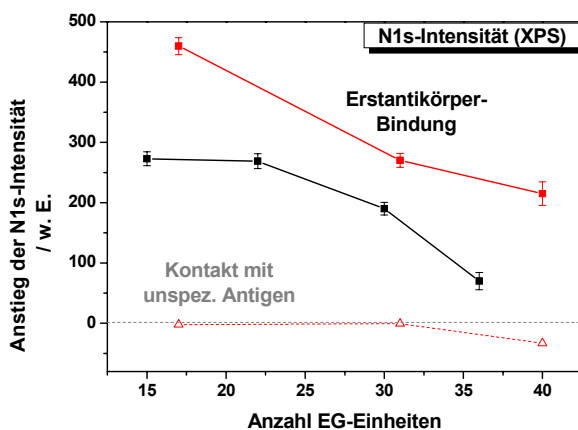
Verlauf der auf die gebundenen Proteine zurückzuführenden C1s-Intensität in Abhängigkeit von den an den NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen (mittlere Kettenlänge von 17, 31 und 40 EG-Einheiten) durchgeführten Antikörper-Antigen-Umsetzungen.

Der in beiden Fällen erhaltene Bindungsverlauf stimmt mit den Ergebnissen der FT-IR- und Ellipsometrie-Messungen gut überein. Mit zunehmendem EG-Gehalt wird eine Abnahme der Bindungsrate des Erstantikörpers festgestellt.

Die Einführung des aliphatischen Linkers Glutardialdehyd ist mit einer Abnahme der N1s-Intensität verbunden; nach der kovalenten Bindung des Erstantikörpers steigt diese jedoch wieder deutlich an.

Der nach der Umsetzung mit dem spezifischen Antigen resultierende Anstieg der Signalintensität fällt jedoch geringer aus als anhand der FT-IR- und Ellipsometrie-Messungen zu erwarten wäre. Ursache ist die schichtdickenabhängige Signalabschwächung, die sich besonders im Fall höherer Proteinschichtdicken bemerkbar macht und dazu führt, dass die Bindungsrate des Zweitantikörpers mit dieser Methode unterschätzt wird.

In der Abb. IV.I.1-44 ist der mit der Bindung des Erstantikörpers und der Behandlung mit dem falschen Antigen verbundene Anstieg der N1s-Intensität gegen die mittlere Anzahl an EG-Einheiten aufgetragen; zum Vergleich ist auch die entsprechende Bindungskurve der carboxy-terminierten PEG-Verbindungen mit eingetragen.

**Abb. IV.I.1-44:**

Verlauf der mit der kovalenten Bindung des Erstantikörpers verbundenen N1s-Intensität in Abhängigkeit von der mittleren Kettenlänge der COOH- (rot) und NH₂-terminierten (blau) PEG-Beschichtungen.

Erstantikörper-Bindung
 —■— NH₂-terminiert
 —■— COOH-terminiert

un spez. Antigen
 - - - △ - - - NH₂-terminiert
 - - - △ - - - COOH-terminiert

Es ergibt sich auch hier ein Bindungsverlauf, der eine große Ähnlichkeit mit dem anhand der anderen Methoden Erhaltenem zeigt. Bedingt durch den inhärenten N1s-Beitrag der aminoterminierten Basisfilme liegt deren Bindungskurve in dieser Darstellung jedoch etwas zu hoch.

1.2.3 Gesamtbetrachtung zu den Antikörper-Bindungsstudien

In der Abbildung IV.I.1-45 ist die mittels der verschiedenen Analysemethoden erhaltene Bindungsrate des Erstantikörpers für die carboxy- und aminoterminierten PEG-Beschichtungen in einer normierten Form dargestellt. Zur Referenzierung wurde hierbei der mit der jeweiligen Analysemethode ermittelte Maximalwert herangezogen.

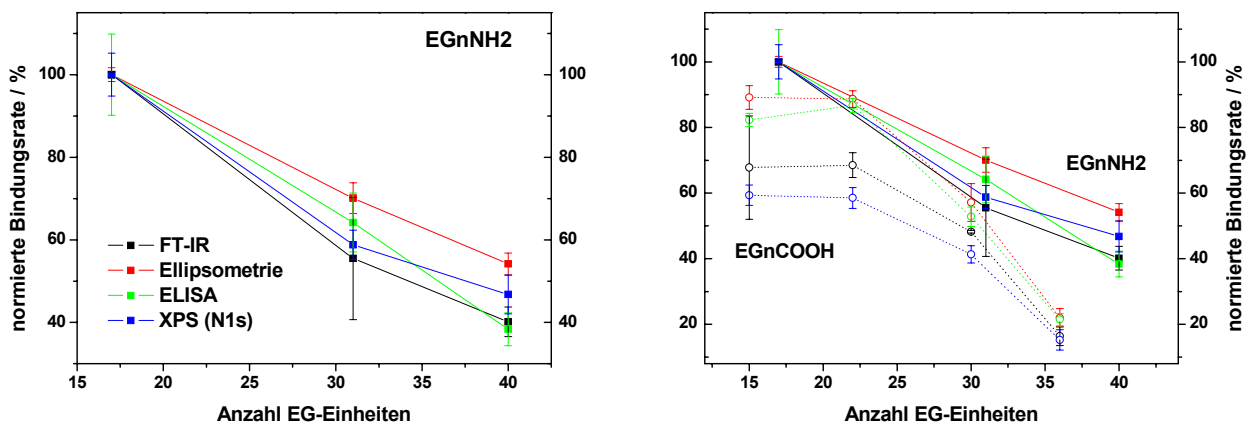


Abb. IV.I.1-45:

Rechts: Vergleich der für die NH₂- und COOH-terminierten PEG-Beschichtungen mittels der verschiedenen Analysemethoden erhaltenen Erstantikörper-Bindungskurven (Abhängigkeit der normierten Bindungsrate von der mittleren Kettenlänge der PEG-Beschichtungen).

Links: getrennte Darstellung der für die NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen mittels der verschiedenen Analysemethoden erhaltenen und normierten Erstantikörper-Bindungsrate von der mittleren Kettenlänge.

EGnNH₂
 ■ FT-IR
 ■ Ellipsometrie
 ■ ELISA
 ■ XPS (N1s)

EGnCOOH
 ○ FT-IR
 ○ Ellipsometrie
 ○ ELISA
 ○ XPS (N1s)

Anhand des Bindungsverlaufes der carboxy-terminierten Verbindungen zeigt sich, dass die Abweichung der mittels der verschiedenen Methoden erhaltenen Bindungsraten mit zunehmender Massenbelegung der Proteine ansteigt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die XP-spektroskopisch anhand der N1s-Intensität für die COOH-terminierten Verbindungen ermittelte Kurve in dieser Darstellung zu niedrig liegt, da sie sich auf die N1s-Intensität der aminoterminierten Beschichtungen bezieht, deren Basisfilme jedoch bereits schon einen inhärenten Beitrag zur N1s-Intensität leisten. Außerdem findet im Fall der Röntgenphotoelektronenspektroskopie eine schichtdickenabhängige Signalabschwächung statt, so dass die Bindungsraten hier insbesondere im Bereich höherer Massenbelegungen (bzw. niedriger Kettenlängen) zunehmend unterschätzt werden.

Unabhängig von der jeweiligen Antikörper-Belegung ergibt sich im Fall der COOH-terminierten Verbindungen jedoch eine gute Übereinstimmung zwischen den auf Grundlage des Schichtdickenanstiegs (Ellipsometrie) und der mittels des Immunoassays (ELISA) bestimmten Bindungsraten. Die FT-IR- und XP-spektroskopisch erhaltenen Ergebnisse zeigen allerdings eine mit der Massenbelegung kontinuierlich ansteigende Abweichung von diesen Werten; bei einer Kettenlänge von 15 Einheiten beträgt der Unterschied zu der FT-IR-spektroskopisch ermittelten Bindungsrate etwa 20 - 30%.

Beide Verbindungsklassen (amino- und carboxy-terminierte PEG-Beschichtungen) zeigen eine mit der mittleren Kettenlänge abnehmende Bindungsrate. Es wird vermutet, dass diese auf eine mit der mittleren EG-Anzahl ansteigende Proteinresistenz zurückgeführt werden kann, die eine Annäherung der Proteine an die Oberfläche und somit auch deren kovalente Anbindung an die PEG-Matrix zunehmend erschwert.

Weiterhin ist zu erkennen, dass die Bindungskurve der aminoterminierten Verbindungen unabhängig von der Kettenlänge stets über derer der carboxy-terminierten Verbindungen liegt. Dies ist vermutlich auf unterschiedliche elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und protonierten Aminogruppen dieser PEG-Matrix zurückzuführen.

Dagegen sollte die Dissoziation der Carboxygruppen über die Ausbildung von negativ geladenen Carboxylat-Gruppen umgekehrt zu verstärkten repulsiven Kräften zwischen der PEG-Matrix und den Proteinen führen.

Auch hinsichtlich des Bindungsverlaufes bestehen Unterschiede zwischen beiden Verbindungsklassen. Während die Kurve der aminoterminierten Verbindungen in dem betrachteten Bereich von Kettenlängen näherungsweise linear verläuft, geht die Kurve der carboxy-terminierten Verbindungen bereits ab einer Kettenlänge von etwa 22 EG-Einheiten in die Sättigung. Außerdem verläuft die mit der Zunahme der EG-Anzahl verbundene Abnahme der Bindungsrate des Erstantikörpers hier steiler als im Fall der aminoterminierten Verbindungen.

1.3 Resistenz gegenüber unspezifischer Proteinadsorption

In den Antikörper-Bindungsstudien zeigte sich eine Abhängigkeit der Proteinbindungskapazität der vorwiegend helikal geordneten PEG-Beschichtungen von ihrer Kettenlänge und der Art ihrer funktionellen Terminierung. Es wurde vermutet, dass dieser Zusammenhang auf eine von den genannten Parametern beeinflusste Proteinresistenz zurückzuführen ist, welche die Zugänglichkeit der Proteine zur Oberfläche und somit auch ihre Bindungsrate bestimmt.

Die in den Antikörper-Bindungsstudien verwendeten PEG-Beschichtungen wurden daher eingehender hinsichtlich ihrer Proteinresistenz untersucht. Hierzu wurden die beschichteten Substrate mit einer konzentrierten Fibrinogen- und einer Blutplasma-Lösung behandelt und die resultierende Adsorptionsrate wie in Abschnitt 1.1.3 dieses Kapitels beschrieben, anhand von FT-IR-, XPS- und Ellipsometrie-Messungen ermittelt.

Durch Behandlung der Rezeptor-funktionalisierten Oberflächen mit einem falschen Antigen konnten bereits Aussagen bezüglich ihrer Proteinresistenz getroffen werden; in diesen Versuchen zeigten nur die Verbindungen EG15COOH und EG17NH₂ einen unspezifischen Adsorptionsbeitrag.

In vielen immunodiagnostischen Anwendungen, vor allem bei der Verwendung realer biologischer Proben, wie z.B. von Blutplasma, sind die Anforderungen hinsichtlich einer Vermeidung von unspezifischer Adsorption jedoch wesentlich höher. Die zu detektierende Spezies befindet sich hier oft in einem Gemisch verschiedener Störkomponenten mit wesentlich höheren Konzentrationen. Eine eindeutige Identifikation ist daher nur möglich, sofern die Spezifität der detektierten Wechselwirkungen gesichert und eine unspezifische Adsorption ausgeschlossen werden kann.

1.3.1 FT-IR-Messungen

Die in der Tabelle IV.I.1-1 aufgeführten Carboxy-, Amino- und Hydroxy-terminierten PEG-Thiole wurden unter Ausbildung selbstordnender Monolagen auf Au-bedampften Si-wafern adsorbiert und die erhaltenen Beschichtungen nach dem in Kapitel 1.1.2 beschriebenen Protokoll für eine Stunde in einer konzentrierten Fibrinogen-Lösung bzw. einer Blutplasma-Lösung inkubiert.

In den Abbildungen IV.I.1-46 und -47 sind die FT-IR-Spektren gezeigt, welche von den Carboxy- und Aminoterminierten Oberflächen nach Kontakt mit einer Fibrinogen-Lösung aufgenommen wurden.

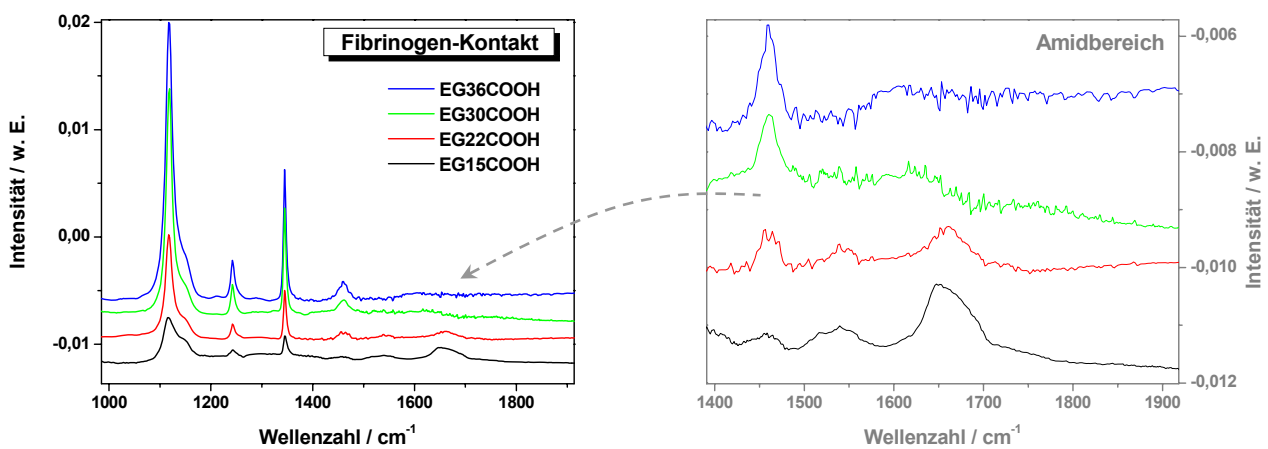


Abb. IV.I.1-46: Nach dem Fibrinogen-Kontakt der COOH-terminierten PEG-Beschichtungen (EG15COOH, EG22COOH, EG30COOH und EG36COOH) aufgenommene FT-IR-Spektren; rechts: Ausschnitt des Amidbereichs.

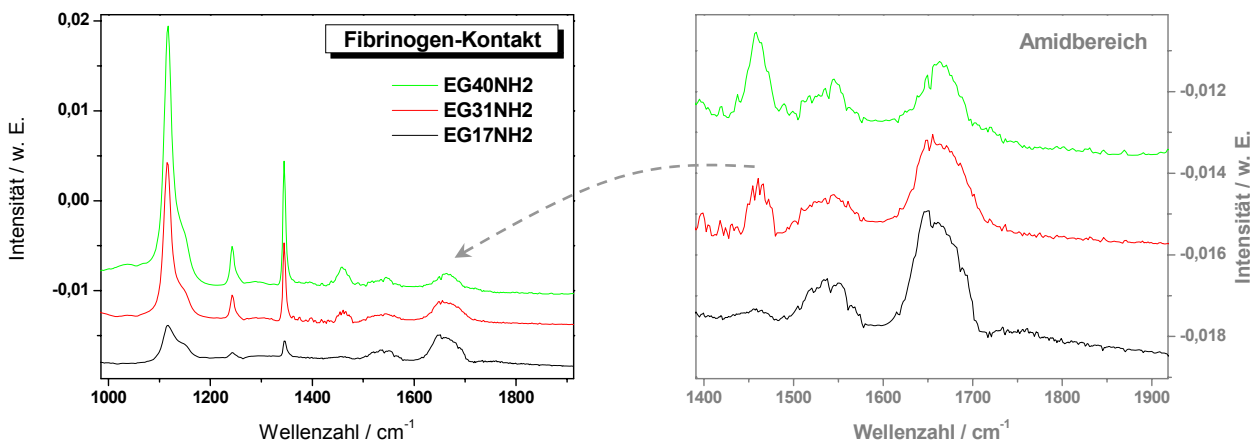


Abb. IV.I.1-47: Nach dem Fibrinogen-Kontakt der NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen (EG17NH₂, EG31NH₂ und EG40NH₂) aufgenommene FT-IR-Spektren; rechts: Ausschnitt des Amidbereichs.

In den FT-IR-Spektren sind die für eine kristalline Modifikation charakteristischen Schwingungsmoden zu erkennen (s. Abschnitt 1.2.1.1). Es kann daher von einer vorwiegend helikalen Konformation der PEG-Ketten und einem hohen Bedeckungsgrad ausgegangen werden, was durch die Ellipsometrie-Messungen zusätzlich bestätigt wird (s. Abschnitt 1.3.2).

Die Amid-I-Bande wurde unter Anwendung eines linearen Untergrundabzugs integriert; in der Abbildung IV.I.1-48 ist der für die verschiedenen Basisfilme erhaltene Verlauf graphisch dargestellt.

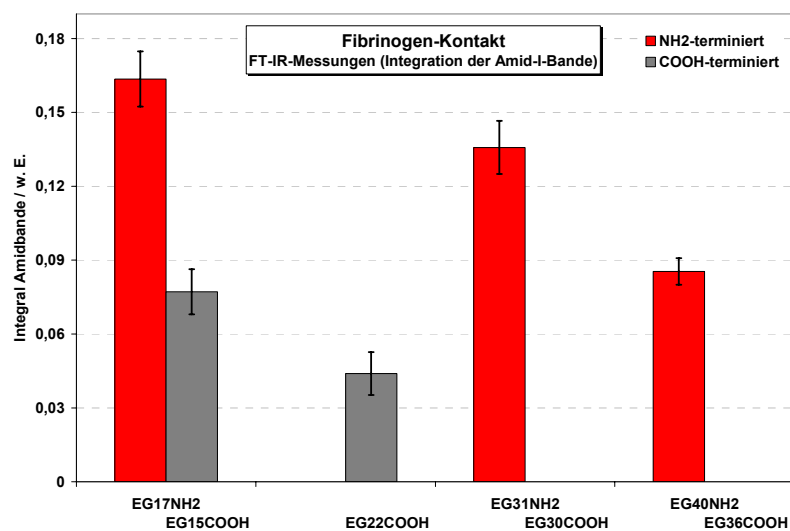


Abb. IV.I.1-48:

Abhängigkeit der Intensität der in den FT-IR-Spektren nach dem Fibrinogen-Kontakt auftretenden und auf die adsorbierten Proteine zurückzuführenden Amid-I-Bande von der mittleren Kettenlänge der COOH- (grau) und NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen.

Mit zunehmender Kettenlänge der verwendeten PEG-Beschichtungen ist eine Abnahme der Fibrinogen-Adsorption verbunden. Die Adsorptionsrate der aminoterminierten Verbindungen liegt unabhängig von der Kettenlänge jedoch sehr viel höher als diejenige der carboxyterminierten Beschichtungen. Trotz vergleichbarer Kettenlänge zeigt die Verbindung EG17NH₂ eine etwa 2,1-fach höhere Adsorptionsrate als die Verbindung EG15COOH.

Bei einer Zunahme der Kettenlänge von 7 Einheiten von EG15COOH zu EG22COOH nimmt die unspezifische adsorbierte Fibrinogen-Menge um etwa 43% ab. Für die Verbindungen EG30COOH und EG36COOH konnte keine Protein-Adsorption mehr festgestellt werden. Dagegen beträgt die Adsorptionsrate der aminoterminierten Verbindung EG40NH₂ noch etwa 52% des für die EG17NH₂-beschichteten Oberflächen ermittelten Wertes.

In der Abbildung IV.I.1-49 ist die auf die unspezifische Fibrinogen-Adsorption eines Hexadecanthiolfilms bezogene Adsorptionsrate in Abhängigkeit von der mittleren Anzahl der EG-Einheiten für die amino- und carboxyterminierten Oberflächen graphisch dargestellt.

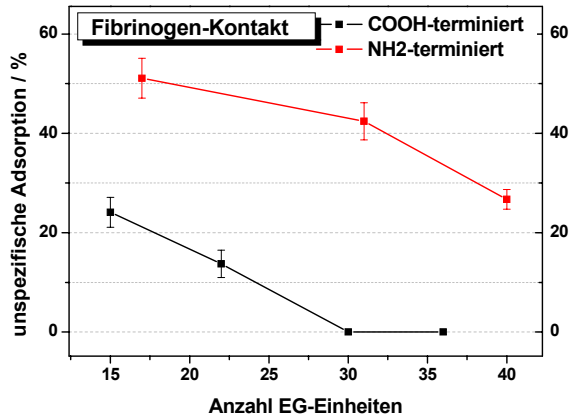


Abb. IV.I.1-49:

Abhängigkeit der FT-IR-spektroskopisch für die NH₂- und COOH-terminierten PEG-Beschichtungen ermittelten Fibrinogen-Adsorptionsrate von der mittleren Kettenlänge.

Beide Verbindungsklassen zeigen eine nahezu lineare Abnahme der Adsorptionsrate bei Zunahme der mittleren EG-Anzahl. Die Adsorptionskurve der aminoterminierten Oberflächen weist jedoch einen weniger steilen Verlauf als die Kurve der carboxyterminierten Oberflächen auf. Außerdem zeichnet sie sich durch einen positiven Offset aus, so dass bei vergleichbarer Kettenlänge wesentlich höhere Adsorptionsraten als bei den analogen COOH-terminierten Beschichtungen resultieren.

Da der einzige Unterschied beider Verbindungsklassen ihre funktionelle Terminierung betrifft, liegt es nahe, diese unterschiedliche Reaktion auf ihre Endgruppen zurückzuführen.

Es wurde bereits erläutert, dass im Fall der Aminogruppen ihre Protonierung in wässriger Lösung mit der Ausbildung von positiven Oberflächenladungen verbunden ist. Da das Fibrinogen-Molekül eine negative Nettoladung besitzt, führen die elektrostatischen Wechselwirkungen mit dieser Beschichtungsklasse zu höheren Adsorptionsraten als im Fall einer Carboxy-Terminierung.

In der Abbildung IV.I.1-50 und -51 sind die nach dem Blutplasma-Kontakt der Oberflächen aufgenommenen FT-IR-Spektren gezeigt.

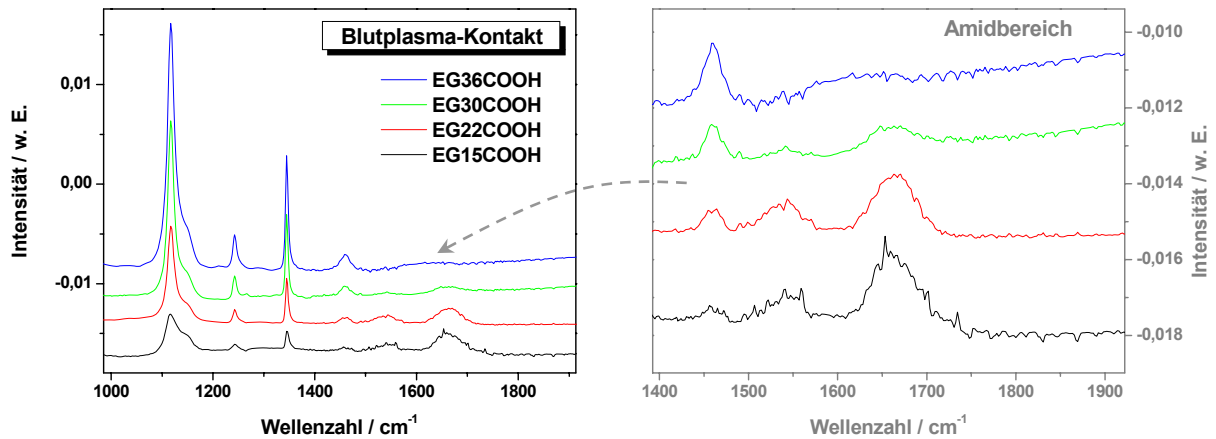


Abb. IV.I.1-50: Nach dem Blutplasma-Kontakt der COOH-terminierten PEG-Beschichtungen (EG15COOH, EG22COOH, EG30COOH und EG36COOH) aufgenommene FT-IR-Spektren; rechts: Ausschnitt des Amidbereichs.

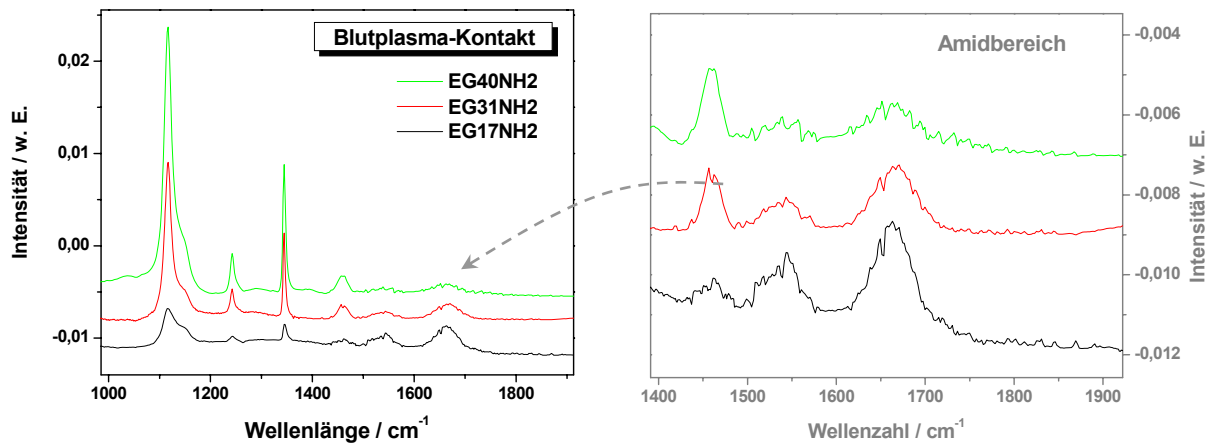
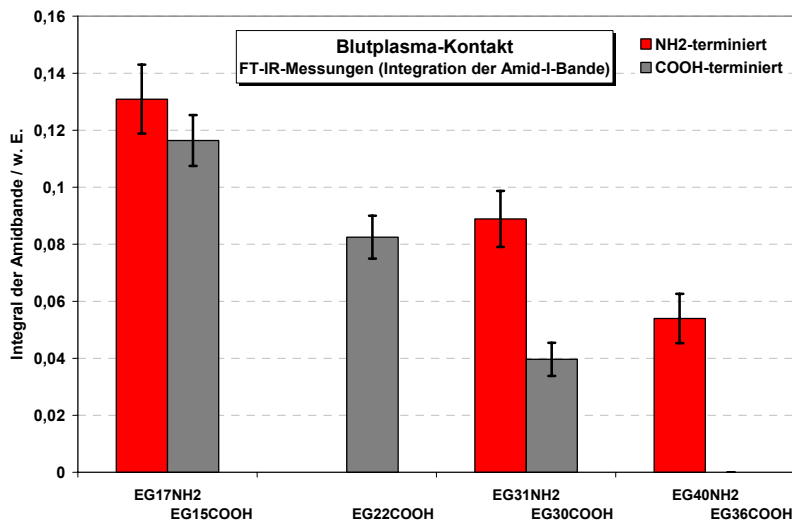


Abb. IV.I.1-51: Nach dem Blutplasma-Kontakt der NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen (EG17NH₂, EG31NH₂ und EG40NH₂) aufgenommene FT-IR-Spektren; rechts: Ausschnitt des Amidbereichs.

Auch hier dominieren die für eine kristalline PEG-Modifikation typischen Schwingungsmoden. Die Amid-I-Bande wurde unter Anwendung eines linearen Untergrundabzugs integriert; der für die einzelnen Basisfilme erhaltene Verlauf ist in der Abbildung IV.I.1-52 graphisch dargestellt.

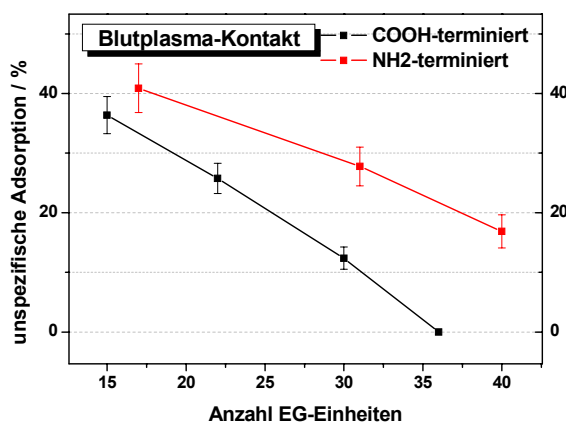
**Abb. IV.I.1-52:**

Abhängigkeit des Flächeninhalts der in den FT-IR-Spektren nach dem Blutplasma-Kontakt auftretenden und auf die adsorbierten Proteine zurückzuführenden Amid-I-Bande von der mittleren Kettenlänge der COOH- (grau) und NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen.

Beide Verbindungsklassen zeigen analog zu ihrer Behandlung mit einer Fibrinogen-Lösung eine mit der Kettenlänge abnehmende Adsorptionsrate.

Die Blutplasma-Behandlung der COOH-terminierten PEG-Beschichtungen ist jedoch mit höheren Adsorptionsraten verbunden als der Kontakt mit einer Fibrinogen-Lösung. Allerdings liegt die Adsorptionsrate der aminotermierten Beschichtungen auch hier bei einer vergleichbaren Kettenlänge stets über derer der carboxyterminierten Oberflächen.

In der Abbildung IV.I.1-53 ist die auf die unspezifische Adsorptionsrate einer Hexadecanthiolmonolage bezogene Adsorptionsrate gegen die mittlere Anzahl der EG-Einheiten aufgetragen.

**Abb. IV.I.1-53:**

Abhängigkeit der FT-IR-spektroskopisch ermittelten und mit dem Blutplasma-Kontakt verbundenen Protein-Adsorptionsrate von der mittleren Kettenlänge der amino- und carboxyterminierten PEG-Beschichtungen.

Bei niedrigen Kettenlängen von etwa 15 EG-Einheiten unterscheiden sich die Adsorptionsraten nur geringfügig.

Bei den carboxyterminierten Verbindungen verläuft die mit der Kettenlänge verbundene Abnahme der Adsorptionsrate allerdings wesentlich steiler als bei den aminotermierten Ver-

bindungen. Während für EG36COOH bereits keine Adsorption mehr festgestellt werden kann, beträgt die Adsorptionsrate des vergleichbaren Moleküls EG40NH₂ immerhin noch 41% des für die EG17NH₂-terminierten Beschichtungen ermittelten Wertes.

Der einzige Unterschied beider Beschichtungsklassen betrifft die Art ihrer funktionellen Terminierung (es liegt ein vergleichbarer Bedeckungsgrad vor; s. Abschnitt 1.3.2), so dass ihr abweichendes Adsorptionsverhalten auf diese zurückzuführen ist. Da die meisten Proteine eine negative Nettoladung besitzen und in wässriger Lösung die Amino-Endgruppen teilweise protoniert werden, treten stärkere elektrostatische Wechselwirkungen mit dieser Beschichtungsklasse auf.

Die Tabelle IV.I.1-15 enthält die FT-IR-spektroskopisch ermittelten Adsorptionsraten.

<i>PEG-Matrix</i>	<i>Fibrinogen- Adsorption / %</i>	<i>Blutplasma- Adsorption / %</i>
EG15COOH	24,1	36,4
EG22COOH	13,7	25,8
EG30COOH	0,0	12,4
EG36COOH	0,0	0,0
EG17NH ₂	51,1	40,9
EG31NH ₂	42,4	27,8
EG40NH ₂	26,7	16,9
EG13OH	0,0	0,0
EG22OH	0,0	0,0

Tab. IV.I.1-15: FT-IR-spektroskopisch ermittelte Fibrinogen- und Blutplasma-Adsorptionsrate für die verschiedenen Endgruppen-funktionalisierten (COOH-, NH₂-, OH-terminiert) PEG-Beschichtungen.

Zur Verdeutlichung ihrer unterschiedlichen Fibrinogen- und Blutplasma-Adsorptionsraten sind die FT-IR-spektroskopisch erhaltenen Adsorptionsverläufe für die amino- und carboxy-terminierten PEG-Beschichtungen in der Abbildung IV.I.1-54 getrennt dargestellt. Diese zeigen den anhand der Integration der Amid-I-Bande erhaltenen Intensitätsverlauf sowie die auf die unspezifische Fibrinogen-Adsorption einer Hexadecanthalmonolage bezogene Adsorptionsrate in Abhängigkeit von der mittleren EG-Anzahl der jeweiligen PEG-Matrix.

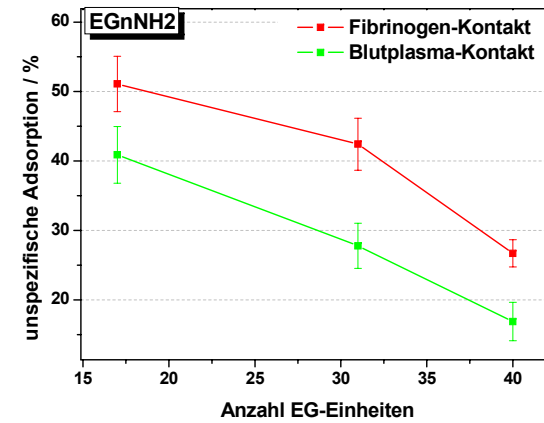
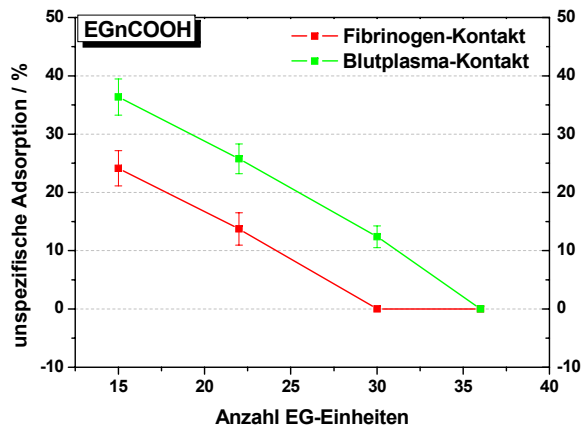
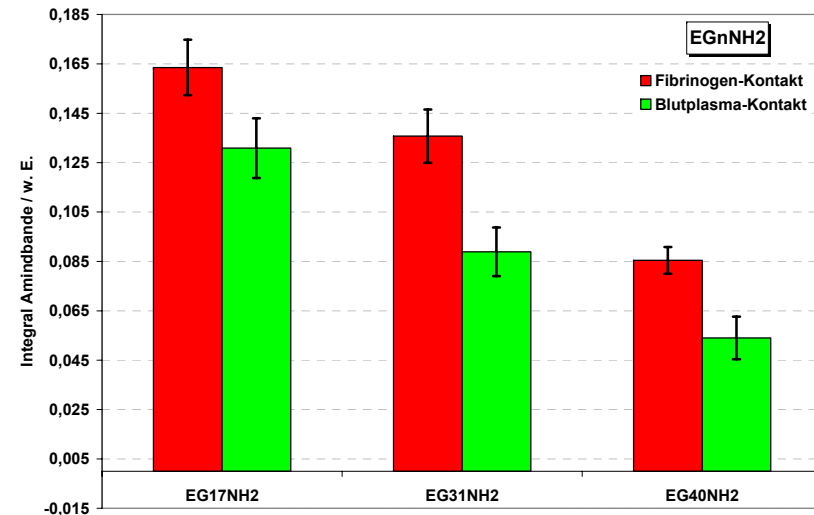
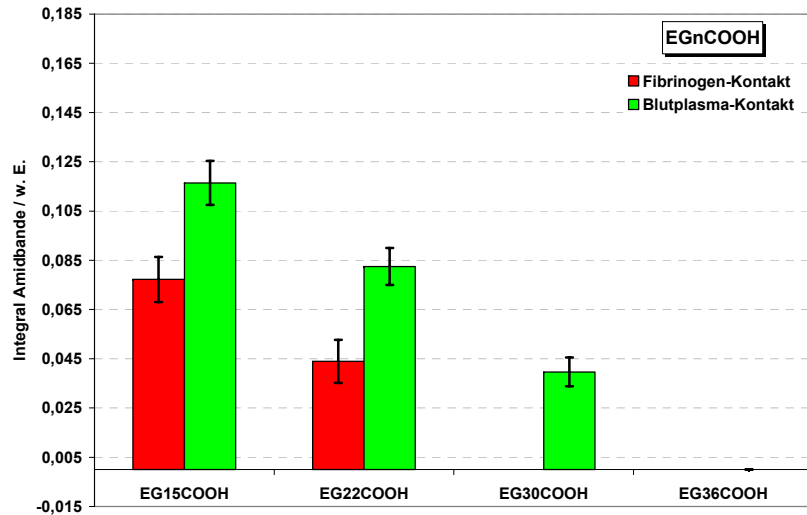


Abb. IV.1.1-54: Abhängigkeit der mit dem Fibrinogen- und Blutplasma-Kontakt verbundenen und FT-IR-spektroskopisch ermittelten Protein-Adsorption von der mittleren Kettenlänge der COOH-(links) und NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen. Oben: Intensitätsverlauf der Amid-I-Bande; unten: Verlauf der normierten Adsorptionsrate.

Für die carboxyterminierten PEG-Beschichtungen führt die Blutplasma-Behandlung zu höheren Adsorptionsraten als die Behandlung mit einer Fibrinogen-Lösung. Beide Adsorptionskurven zeigen eine näherungsweise linear mit der mittleren EG-Anzahl abnehmende Adsorption, wobei die Steigung beider Kurven ebenfalls sehr ähnlich ist. Ein Unterschied betrifft lediglich einen positiven Offset von etwa 12,5 % im Fall der Blutplasma-Adsorption; daher resultieren hier bei derselben Kettenlänge stets höhere Adsorptionsraten als bei der Behandlung mit einer der Fibrinogen-Lösung.

Im Fall der aminotermiierten Beschichtungen ist hingegen der Fibrinogen-Kontakt mit höheren Adsorptionbeiträgen verbunden. In beiden Adsorptionsstudien ergibt sich auch hier ein sehr ähnlicher Adsorptionsverlauf. Ein Unterschied besteht lediglich in einem positiven Offset von etwa 11-15 % im Fall des Fibrinogen-Kontakts. Daher führt diese Behandlung bei derselben Kettenlänge stets zu höhere Adsorptionsraten als die Inkubation in einer Blutplasma-Lösung.

Unabhängig von der verwendeten Proteinlösung (Fibrinogen- oder Blutplasma-Lösung) zeigen beide Verbindungsklassen einen sehr ähnlichen, mit der mittleren EG-Anzahl linear abnehmenden Adsorptionsverlauf. Es besteht daher die Vermutung, dass die mit der Kettenlänge ansteigende Proteinresistenz ein Charakteristikum der verwendeten PEG-Beschichtungen ist und weniger durch die Art der adsorbierenden Spezies und die Endgruppenfunktionalität der PEG-Matrix beeinflusst wird.

Der Einfluss des Adsorbates äußert sich lediglich in der Größe eines Offsets um den diese Beschichtungs-typischen Adsorptionskurven verschoben sind. Es wird vermutet, dass seine Größe hauptsächlich durch die Stärke der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den sich in wässriger Lösung durch Protolyse ausbildenden Oberflächenladungen (protonierte Aminogruppen bzw. Carboxylatgruppen) und der Nettoladung der jeweiligen Proteine bestimmt wird.

In der Abbildung IV.I.1-55 sind die FT-IR-Spektren gezeigt, welche von den Verbindungen EG13OH und EG22OH vor und nach der Fibrinogen- und Blutplasma-Behandlung aufgenommen wurden.

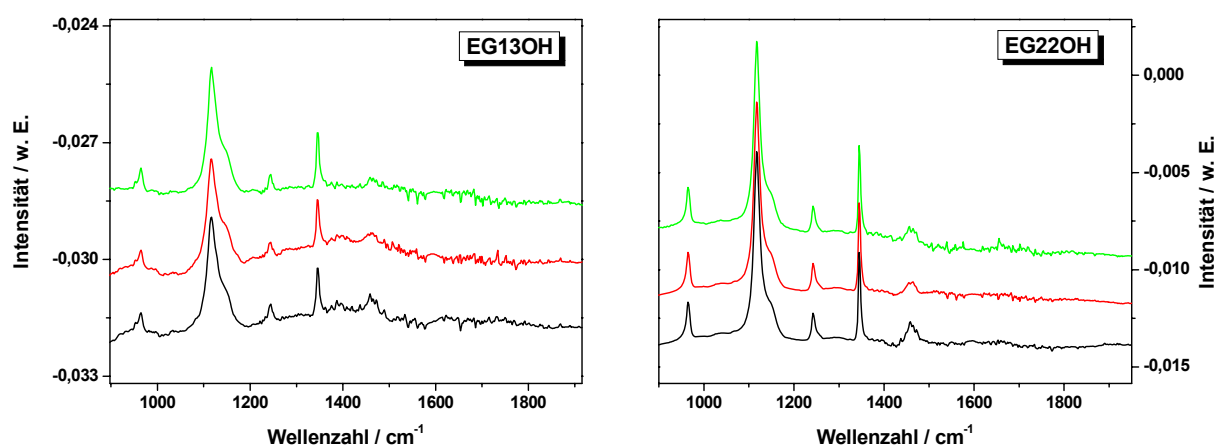


Abb. IV.I.1-55: Nach dem Blutplasma- und Fibrinogen-Kontakt der OH-terminierten PEG-Beschichtungen aufgenommene FT-IR-Spektren. Links: EG13OH; rechts: EG22OH.

— Blutplasma-Kontakt
— Fibrinogen-Kontakt
— Basisfilm

Für die OH-terminierten Beschichtungen (EG13OH, EG22OH) konnte weder nach einer Fibrinogen- noch nach einer Blutplasma-Behandlung eine Proteinadsorption festgestellt werden. Beide Verbindungen zeichnen sich daher durch vollständige Proteinresistenz aus.

Fazit zu den FT-IR-Auswertungen

Die Proteinresistenz-Studien ergaben für beide Verbindungsklassen (amino- und carboxy-terminierte PEG-Beschichtungen) einen mit der Kettenlänge verbundenen Anstieg der Proteinresistenz.

Die aminoterminierten Oberflächen zeigten sowohl bei einer Fibrinogen- als auch bei einer Blutplasma-Behandlung stets höhere Adsorptionsraten als die carboxyterminierten Oberflächen. Es wird vermutet, dass dies auf elektrostatische Wechselwirkungen mit protonierten Aminogruppen dieser Matrix zurückgeführt werden kann.

Die funktionelle Terminierung scheint daher einen entscheidenden Einfluss auf die Proteinresistenz der vorwiegend helikal geordneten PEG-Beschichtungen auszuüben. Hierbei kann folgende Resistenzreihe aufgestellt werden:



Während sich OH-terminierte PEG-Beschichtungen (selbst bei einer Kettenlänge von nur 13 EG-Einheiten) durch vollständige Proteinresistenz auszeichneten, erwiesen sich die COOH-terminierten Oberflächen im Fall einer Fibrinogenbehandlung erst ab einer Kettenlänge von etwa 30 EG-Einheiten und im Fall einer Blutplasma-Behandlung ab einer mittleren EG-Anzahl von etwa 36 Einheiten als resistent gegenüber unspezifischer Adsorption. Bei den

aminoterminalen Beschichtungen wurde jedoch selbst bei einer Kettenlänge von 40 EG-Einheiten in beiden Fällen noch unspezifische Adsorption beobachtet.

Die Resistenz-Studien bestätigen somit die bereits anhand der Antikörper-Bindungsstudien gezogene Schlussfolgerung, dass die mit der Kettenlänge abnehmende Bindungskapazität der PEG-Beschichtungen auf einen Anstieg ihrer Proteinresistenz zurückzuführen ist; diese erschwert die Protein-Annäherung an die Matrix zunehmend, wodurch ihre Bindungsrate herabgesetzt wird. Die aminoterminalen PEG-Matrizen zeichnen sich hierbei bei vergleichbarer Kettenlänge durch eine geringere Proteinresistenz als die carboxyterminalen aus, was wahrscheinlich auf eine Ausbildung von positiven Oberflächenladungen zurückgeführt werden kann.

Unabhängig von der Art des adsorbierenden Proteins zeigen beide Verbindungsklassen jedoch einen sehr ähnlichen und von der Art der adsorbierenden Spezies nahezu unabhängigen Adsorptionsverlauf (Abhängigkeit der Adsorptionsrate von der mittleren EG-Anzahl bei vergleichbarem Bedeckungsgrad; s. Abschnitt 1.3.2). Es wird daher vermutet, dass dieser ein Merkmal der verwendeten PEG-Beschichtung ist. Der Einfluss des Adsorbates äußert sich nur in der Größe eines Offsets, um den die Adsorptionskurven verschoben sind.

Hinsichtlich einer Anwendung zur Integration von Rezeptoren für immunodiagnostische Anwendungen sollte eine optimale Beschichtungsmatrix zwar hohe Rezeptor-Bindungsraten ermöglichen, gleichzeitig eine unspezifische Adsorption jedoch weitgehend unterdrücken. Bei einer Verwendung der beschriebenen Endgruppen-funktionalisierten (COOH, NH₂) PEG-thiole muß man daher einen Kompromiss eingehen, da die Proteinresistenz zwar mit der Kettenlänge ansteigt, die Bindungsrate jedoch abnimmt.

Im Fall der COOH-terminalen Verbindungen ist die Verbindung EG30COOH ein guter Kandidat; diese Matrix ermöglicht zwar recht hohe Bindungsraten, unterdrückt eine unspezifische Adsorption jedoch weitgehend (nur eine Blutplasma-Behandlung führt zu einem geringfügigen Adsorptionsbeitrag).

Die NH₂-terminalen Verbindungen ergeben bei vergleichbarer Kettenlänge zwar stets höhere Bindungsraten als die COOH-terminalen Beschichtungen; allerdings wird selbst bei einer mittleren EG-Anzahl von 40 Einheiten sowohl bei Kontakt mit einer Fibrinogen- als auch einer Blutplasma-Lösung ein nicht unbeachtlicher unspezifischer Adsorptionsbetrag festgestellt. Sind die Anforderungen hinsichtlich einer Vermeidung von unspezifischer Adsorption nicht besonders hoch, so empfiehlt sich daher die Verwendung einer aminoterminalen Matrix, da diese Endgruppenfunktionalität mit höheren Rezeptor-Kopplungsraten verbunden ist; andernfalls sind die eine unspezifische Adsorption effektiver unterdrückenden carboxyterminalen Beschichtungen zu bevorzugen.

Allerdings ist zu beachten, dass sich die Proteinresistenz nach Umsetzung der Endgruppen eventuell ändert, so dass im Rezeptor-funktionalisierten Zustand eine von der unfunktionali-

sierten Matrix abweichende Resistenz beobachtet werden kann. Da die PEG-Matrix jedoch eine amorphe Oberflächenstruktur aufweist, ist allerdings nicht mit einer vollständigen Umsetzung der Endgruppen zu rechnen.

1.3.2 Ellipsometrie-Messungen

Die Schichtdicken der nach den einzelnen Umsetzungsschritten erhaltenen Adsorbatlagen wurden ellipsometrisch bestimmt. Durch Vergleich mit der für eine vollständig helikal geordnete PEG-Monolage zu erwartenden Schichtdicke konnte der Bedeckungsgrad der verschiedenen Basisfilme ermittelt werden; die erhaltenen Werte sind in der Tabelle IV.I.1-16 aufgeführt. Die angegebenen Adsorptionsraten beziehen sich auf die unspezifische Fibrinogen-Adsorption eines Hexadekanthiolfilms, die mit einem Schichtdickenanstieg von 48 Å verbunden war.

<i>PEG-Matrix</i>	<i>Schichtdicke</i> / Å	<i>Bedeckungsgrad</i> / %	<i>Fibrinogen</i> <i>Adsorption / %</i>	<i>Blutplasma</i>
EG15COOH	41,8	76,1	22,0	29,3
EG22COOH	56,7	76,2	12,42	22,9
EG30COOH	79,6	82,4	0,0	8,9
EG36COOH	92,3	81,4	0,0	0,0
EG17NH2	49,7	82,1	54,8	38,2
EG31NH2	84,2	84,7	39,8	24,8
EG40NH2	95,6	76,8	21,5	12,7
EG13OH	39,5	71,5	0,0	0,0
EG22OH	53,9	72,2	0,0	0,0

Tab. IV.I.1-16: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicke, Bedeckungsgrad und mit dem Fibrinogen- und Blutplasma-Kontakt verbundene unspezifische Adsorptionsrate.

Die in den Resistenzstudien eingesetzten PEG-Monolagen besitzen einen sehr ähnlichen Bedeckungsgrad. Für die COOH-terminierten Beschichtungen liegt dieser bei durchschnittlich 79%, der mittlere Bedeckungsgrad der verwendeten aminotermi- nierten Beschichtungen beträgt etwa 81%. Analog zu den Antikörperbindungsstudien kann aufgrund der hohen Bedeckungen daher auch hier von einer vorwiegend helikalen Konformation der PEG-Ketten ausgegangen werden; zudem kann infolge der vergleichbaren Bedeckungen ihr unterschiedliches Proteinadsorptions- und bindungsverhalten folglich nicht auf einen abweichenden Bedeckungsgrad zurückgeführt werden.

Mit zunehmender Kettenlänge wird eine abnehmende Adsorptionsrate festgestellt.

In den Abbildung IV.I.1-56 ist der mit der Fibrinogen- und Blutplasma-Behandlung verbundene Schichtdickenanstieg und die Abhängigkeit der Adsorptionsrate von der mittleren Anzahl der EG-Einheiten graphisch dargestellt.

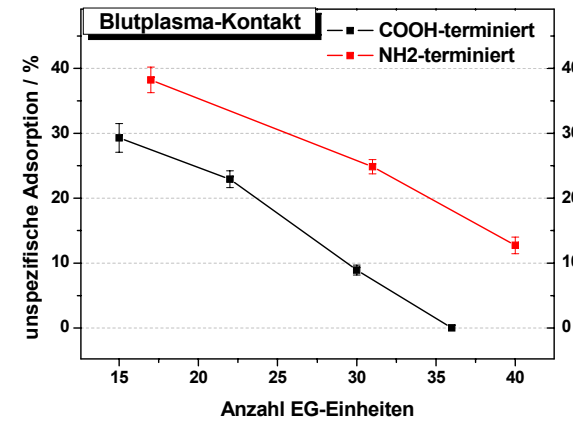
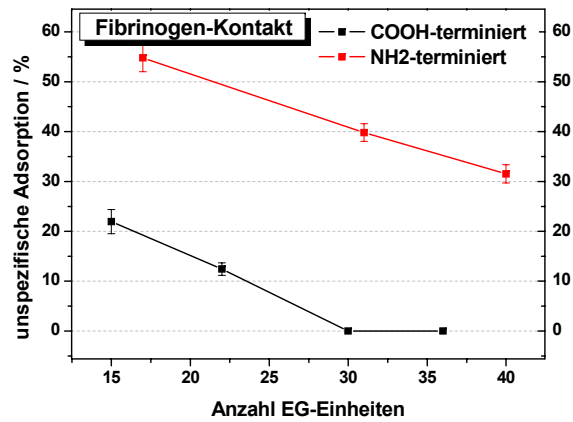
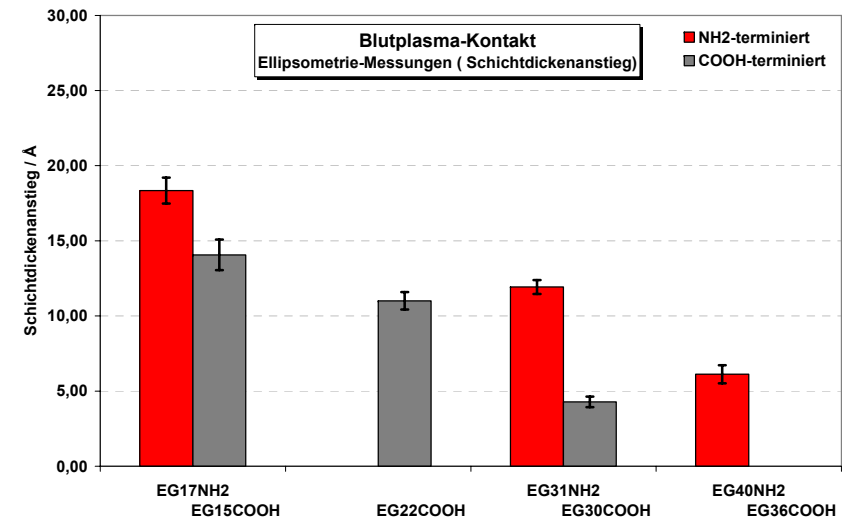
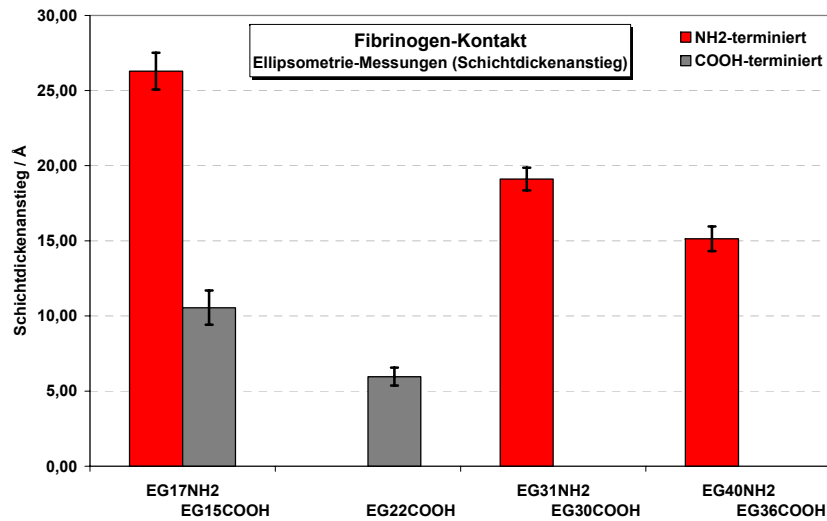


Abb. IV.I.1-56: Abhängigkeit der anhand des ellipsometrischen Schichtdickenanstiegs ermittelten Fibrinogen- (links) und der Blutplasma-Adsorption (rechts) von der mittleren Kettenlänge der COOH- und NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen. Oben: Durch unspezifische Adsorption hervorgerufener Schichtdickenanstieg; Unten: normierte Adsorptionsrate.

Die Ergebnisse stimmen mit den anhand der FT-IR-Messungen Erhaltenen gut überein (vgl. Abschnitt 1.3.1). Unabhängig von der Art der adsorbierenden Spezies weisen die aminoterminierten Oberflächen bei vergleichbarer Kettenlänge stets höhere Adsorptionsraten als die COOH-terminierten Beschichtungen auf.

Die nach dem Fibrinogen-Kontakt resultierenden Adsorptionsraten zeigen für beide Verbindungsklassen eine mit der Kettenlänge näherungsweise linear abnehmende Adsorptionsrate. Selbst bei einer mittleren Kettenlänge von 40 EG-Einheiten liegt die Adsorptionsrate der aminoterminierten Verbindungen noch über derer der Verbindung EG15COOH mit einer mittleren Kettenlänge von nur 15 EG-Einheiten. Für die Matrices der Verbindungen EG30COOH und EG36COOH konnte dagegen keine Fibrinogen-Adsorption festgestellt werden.

Die Behandlung der Oberflächen mit Blutplasma ergibt ebenfalls einen mit der Kettenlänge näherungsweise linear abnehmenden Adsorptionsverlauf. Auch hier zeichnen sich die aminoterminierten Oberflächen bei vergleichbarer Kettenlänge durch höhere Adsorptionsraten als die carboxyterminierten aus. Der Unterschied in den Adsorptionsraten beider Verbindungsklassen ist jedoch geringer als im Fall der Fibrinogen-Behandlung, was auf die höheren Adsorptionsraten der COOH-terminierten Beschichtungen zurückgeführt werden kann. Die aminoterminierten Verbindungen zeigen bei jeder der untersuchten Kettenlängen unspezifische Adsorption; dagegen wird im Fall einer Carboxyterminierung Resistenzverhalten bereits ab einer mittleren EG-Anzahl von 36 Einheiten festgestellt.

In den Abbildungen IV.I.1-57 ist das unspezifische Adsorptionsverhalten der amino- und carboxyterminierten Beschichtungen getrennt dargestellt.

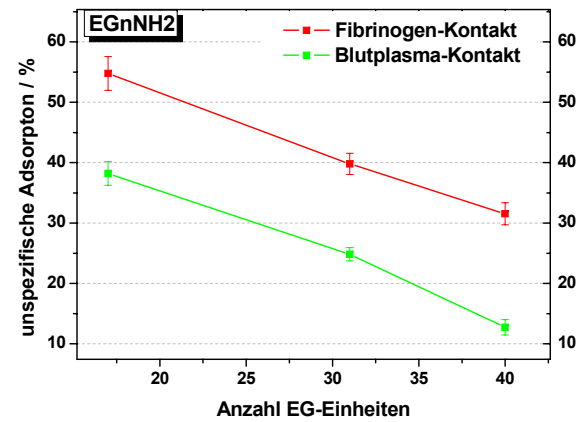
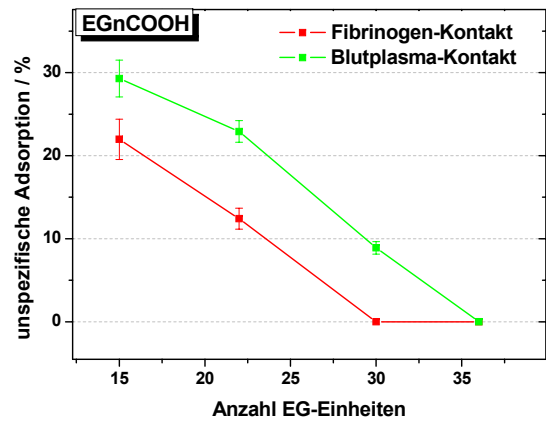
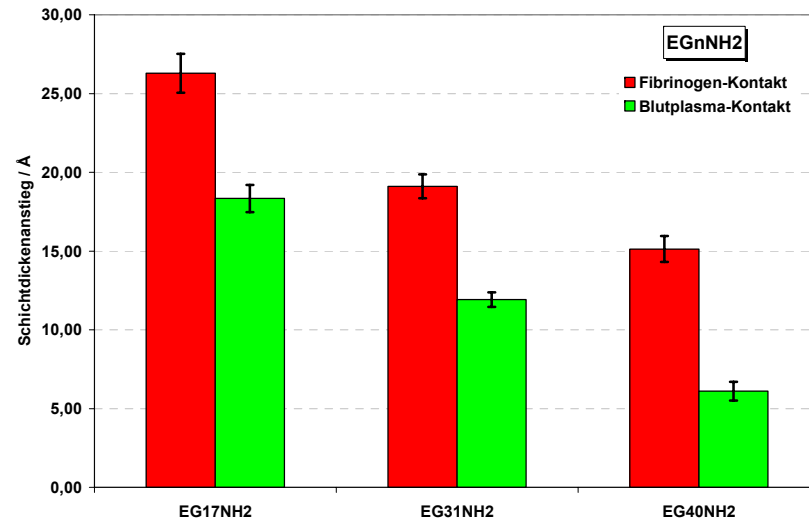
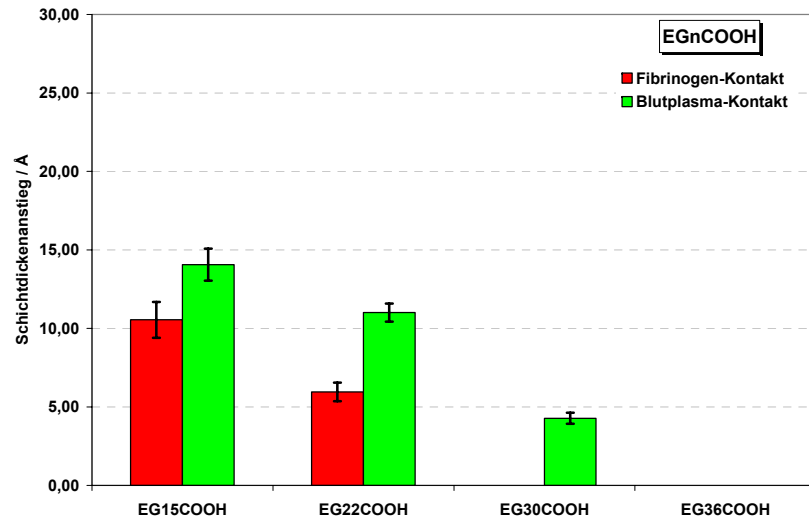
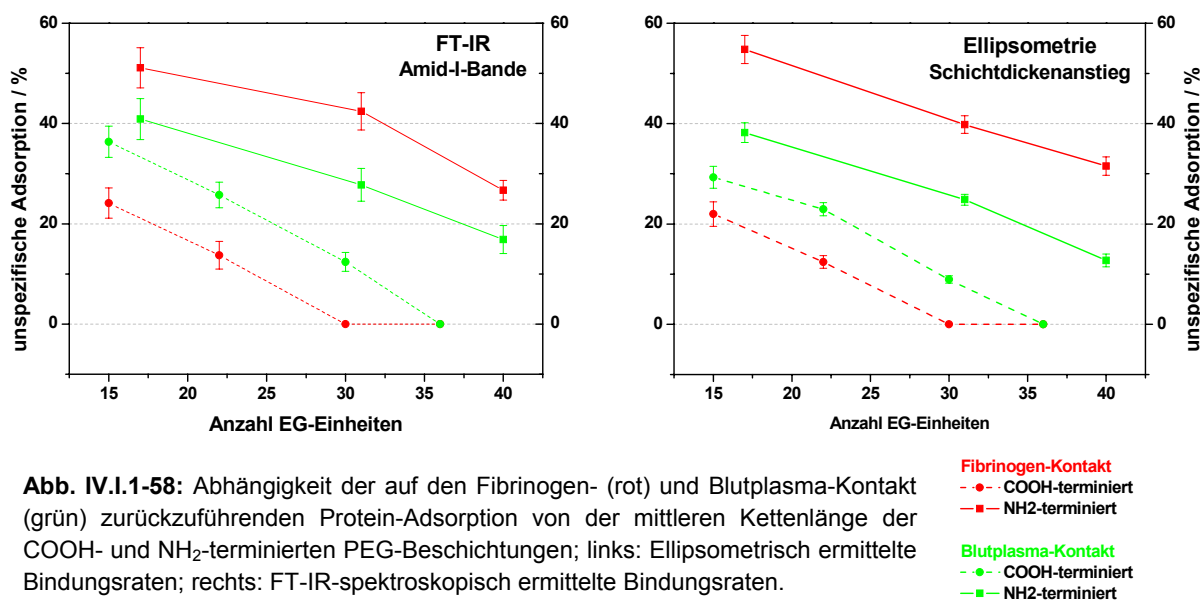


Abb. IV.I.1-57: Abhängigkeit der mit dem Fibrinogen- und Blutplasma-Kontakt verbundenen und anhand des Schichtdickenanstiegs bestimmten Protein-Adsorption von der mittleren Kettenlänge der COOH-(links) und NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen. Oben: Durch unspezifische Adsorption hervorgerufener Schichtdickenanstieg; unten: Verlauf der normierten Adsorptionsrate.

Im Fall einer Carboxy-Terminierung ist der Blutplasma-Kontakt mit höheren Adsorptionsraten verbunden als die Behandlung der Oberflächen mit einer Fibrinogen-Lösung; für die aminoterminierten Oberflächen tritt jedoch ein entgegengesetztes Verhalten ein, so dass hier die Fibrinogen-Behandlung zu höheren Adsorptionsraten führt. Es wird vermutet, dass dieses abweichende Adsorptionsverhalten beider Verbindungsklassen hauptsächlich auf unterschiedliche elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Endgruppen-funktionalisierten PEG-Matrix und den Proteinen zurückgeführt werden kann.

In dem betrachteten Bereich von Kettenlängen zeigen die aminoterminierten Verbindungen stets einen unspezifischen Adsorptionsbeitrag. Im Fall einer Carboxy-Terminierung tritt Resistenzverhalten gegenüber einer unspezifischen Fibrinogen-Adsorption bereits ab einer mittleren EG-Anzahl von 30 Einheiten ein; bei einer Blutplasma-Behandlung wird Resistenz hingegen erst ab einer Kettenlänge von 36 Einheiten festgestellt.

In den Abbildungen IV.I.1-58 sind die beschriebenen Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.



In dieser Darstellung zeigt sich deutlich, dass eine Amino-Terminierung mit höheren Adsorptionsraten verbunden ist als eine Carboxyterminierung; die mit der Kettenlänge verbundene Zunahme der Proteinresistenz fällt hier außerdem geringer aus als im Fall einer Carboxy-Terminierung.

1.3.3 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Von den Oberflächen wurden vor und nach der Behandlung mit der Fibrinogen- und Blutplasma-Lösung XP-Spektren aufgenommen.

In der Tabelle IV.I.1-17 sind die theoretisch zu erwartenden und die vor und nach dem Kontakt mit der Fibrinogen- und Blutplasma-Lösung röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelten Ether-C1s/O1s-Verhältnisse angegeben.

<i>PEG-Matrix</i>	<i>Schichtdicke</i> / Å	<i>Ether-C1s/O1s-Verhältnis</i>			
		<i>Sollwert</i>	<i>Basisfilm</i>	<i>Fibrinogen-Kontakt</i>	<i>Blutplasmasa-Kontakt</i>
EG15COOH	41,8	1,78	2,10	1,79	2,12
EG22COOH	56,7	1,84	2,16	2,11	2,07
EG30COOH	79,6	1,88	2,06	2,20	2,11
EG36COOH	92,3	1,90	2,29	2,23	2,27
EG17NH2	49,7	2,06	2,16	2,17	2,12
EG31NH2	84,2	2,03	2,12	2,03	2,20
EG40NH2	95,6	2,03	2,20	2,27	2,07

Tab. IV.I.1-17: Theoretisch zu erwartendes Ether-C1s/O1s-Verhältnis und das anhand der Anpassung der nach dem Fibrinogen- und Blutplasma-Kontakt aufgenommenen XP-Spektren ermittelte Ether-C1s/O1s-Verhältnis.

Die ermittelten Werte liegen innerhalb des theoretisch zu erwartenden Sollwertbereichs. Die nach dem Kontakt mit der Fibrinogen- und Blutplasma-Lösung berechneten Ether-C1s/O1s-Verhältnisse stimmen ebenfalls gut mit den entsprechenden Werten des Basisfilms überein; dies spricht für die durchgeführten Spektrenanpassungen, insbesondere für die Zuordnung der jeweiligen proteinspezifischen Signalbeiträge in den XP-Spektren, die somit zu einer Analyse dieser Bindungsprozesse herangezogen werden können.

In den Abbildungen IV.I.1-59 und -60 sind die für die einzelnen Basisfilme nach dem Fibrinogen-Kontakt aufgenommenen C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren dargestellt.

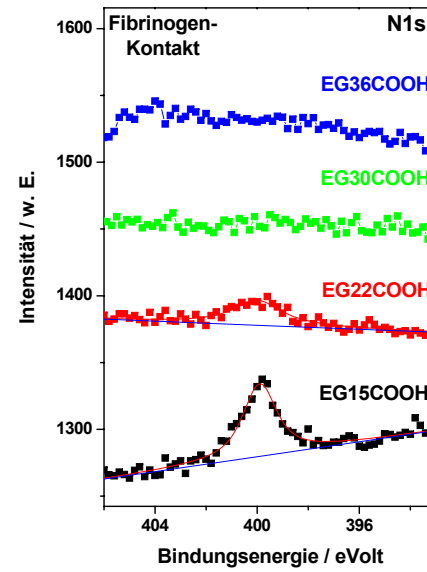
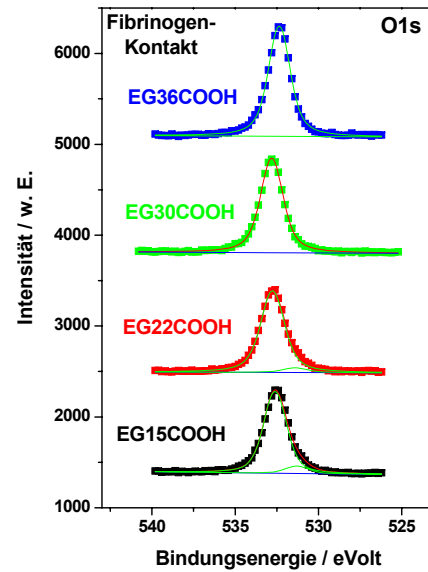
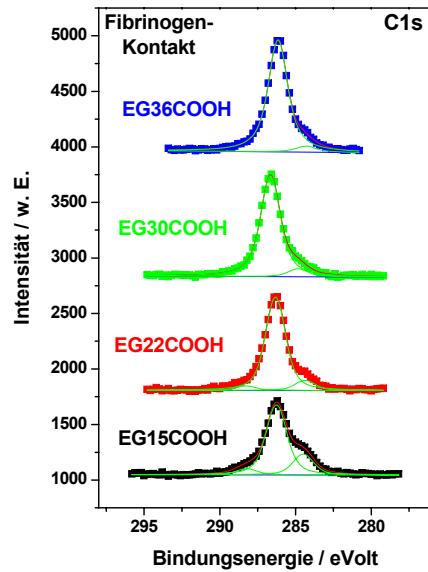


Abb. IV.I.1-59: Nach dem Fibrinogen-Kontakt der COOH-terminierten PEG-Beschichtungen aufgenommene C1s, O1s und N1s-Detailspektren.

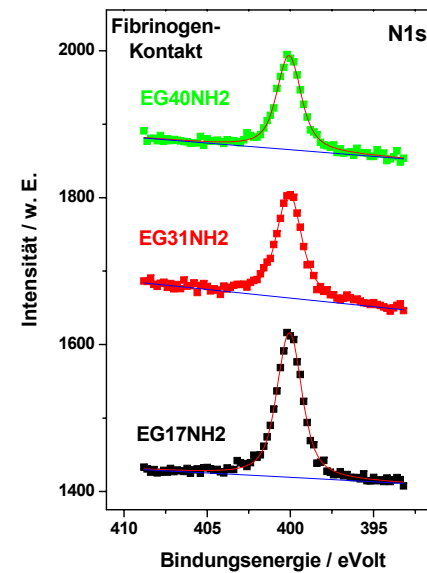
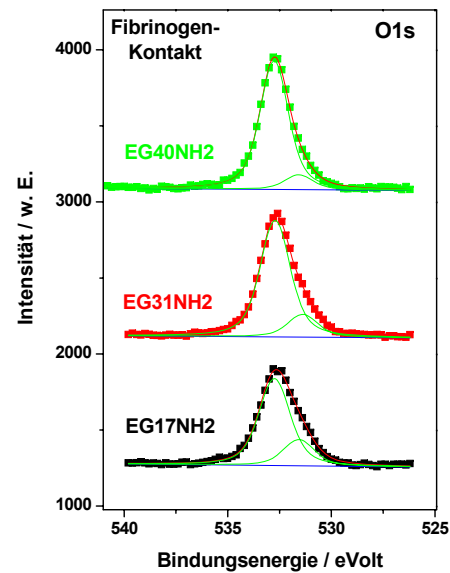
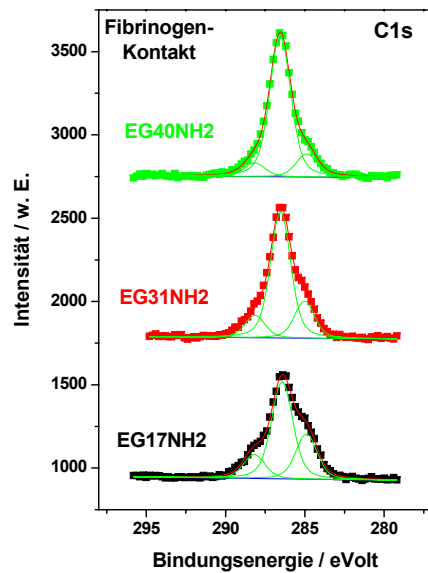
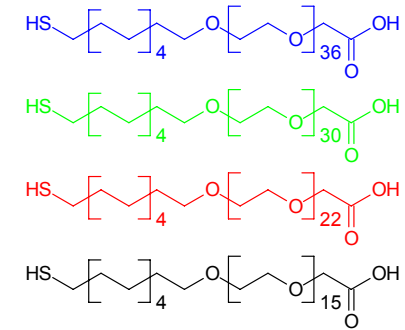
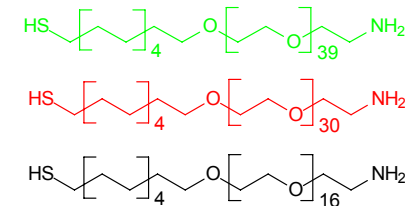


Abb. IV.I.1-60: Nach dem Fibrinogen-Kontakt der NH₂-terminierten Beschichtungen aufgenommene C1s, O1s und N1s-Detailspektren.



In der Abbildung IV.1.1-61 ist die gesamte C1s-Intensität der Proteine (Signale bei 285,1 und 287,8 eV) sowie der Verlauf der N1s-Intensität für die verschiedenen Basisfilme graphisch dargestellt; weiterhin ist in einer normierten Form die Abhängigkeit der Adsorptionsrate von der Kettenlänge der amino- und carboxy-terminierten PEG-Beschichtungen angegeben. Hierzu wurden die ermittelten Integrale für jede Adsorptionsreihe (Fibrinogen- bzw. Blutplasma-Kontakt) auf den jeweiligen Maximalwert bezogen.

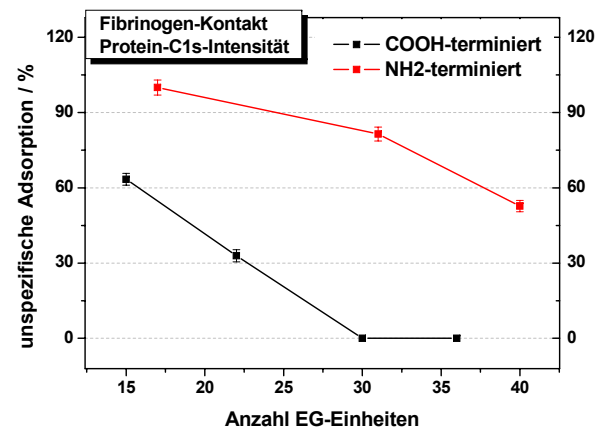
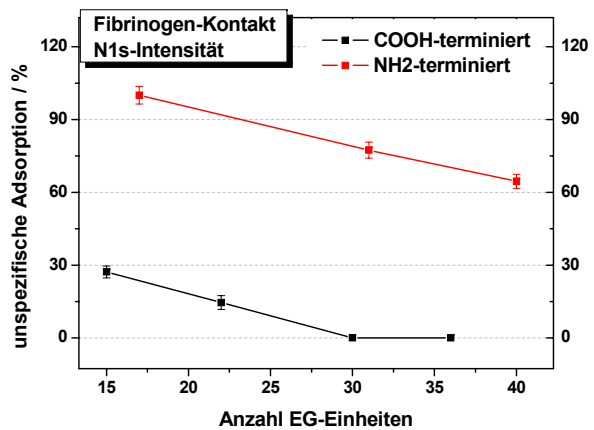
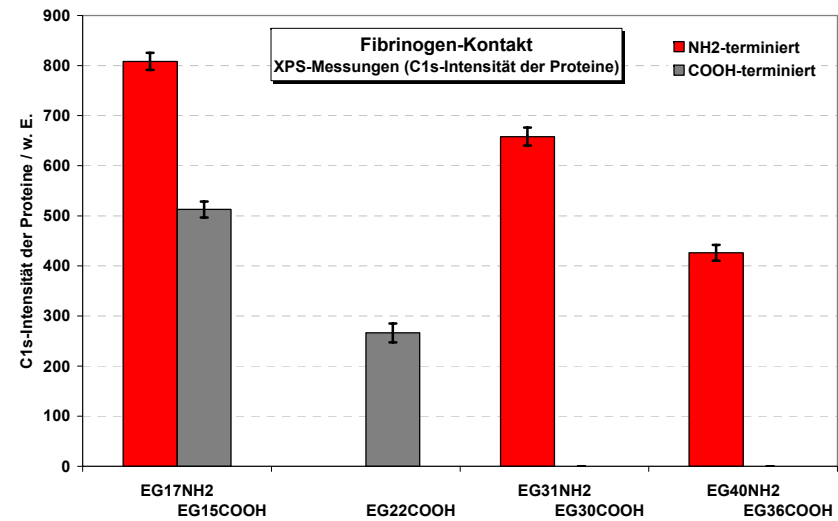
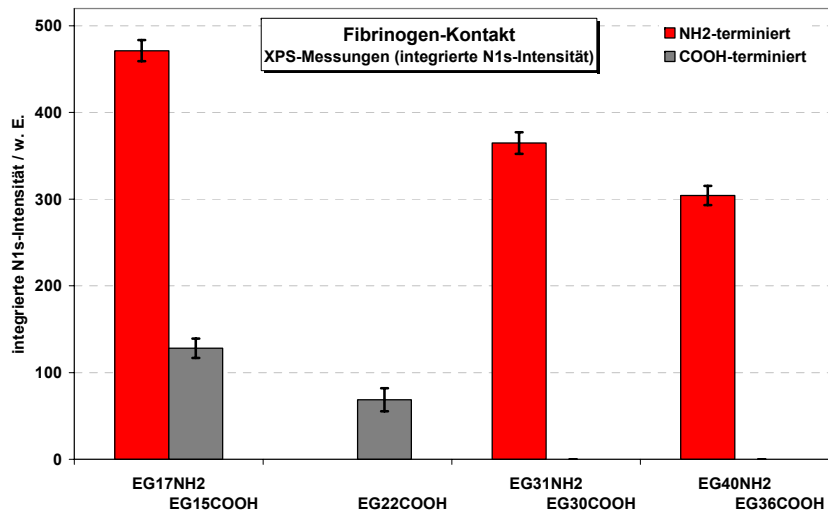


Abb. IV.1.1-61: Abhängigkeit der Fibrinogen-Adsorption von der Kettenlänge der Amino- und Carboxy-terminierten PEG-Beschichtungen. Links: Verlauf der Protein-N1s-Intensität; rechts: Verlauf der auf die Proteine zurückzuführenden C1s-Intensität; unten: normierte Darstellung.

Beide Methoden, sowohl die Analyse der Protein-C1s- als auch der N1s-Intensität, führen zu einer ähnlichen Abhängigkeit der Adsorptionsrate von der mittleren Anzahl der EG-Einheiten. In beiden Fällen wird analog zu den bereits beschriebenen Analysemethoden (FT-IR, Ellipsometrie) eine abnehmende Adsorption mit zunehmender Kettenlänge beobachtet. Eine Bewertung der erhaltenen Ergebnisse ist jedoch schwierig, da der Verlauf der XP-Intensitäten zum einen infolge der schichtdickenabhängigen Signalintensitäten den Adsorptionsverlauf nur qualitativ beschreiben kann und eine Anpassung mehrerer Signallagen, wie hier im Fall der schlecht aufgelösten C1s-Detailspektren, mit größeren Ungenauigkeiten verbunden.

Die Anpassung der C1s-Spektren ergibt im Gegensatz zur Auswertung der N1s-Spektren und der bisherigen Ergebnisse auch für die Verbindungen EG30COOH und EG36COOH einen unspezifischen Adsorptionsbeitrag, der vermutlich auf Ungenauigkeiten des Anpassungsprozesses zurückzuführen ist. Übereinstimmend mit den anderen Analysemethoden ergeben auch die XPS-Messungen für die aminoterminierten Beschichtungen wesentlich höhere Adsorptionsraten als für die carboxyterminierten Oberflächen.

Die nach dem Blutplasma-Kontakt aufgenommenen und angepassten Detailspektren sind in den Abbildungen IV.I.1-62 und -63 gezeigt. Der Verlauf der N1s- und der Protein-C1s-Intensität sowie die Abhängigkeit der Adsorptionsrate von der mittleren Anzahl der EG-Einheiten sind in der Abbildung IV.I.1-64 graphisch dargestellt. Die prozentualen Werte beziehen sich auch hier auf den jeweiligen Maximalwert der Adsorptionsreihe.

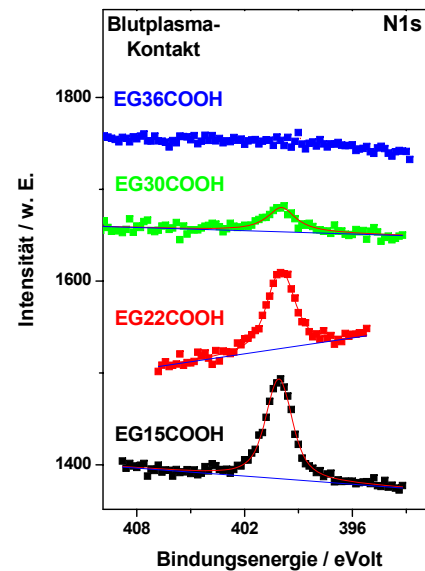
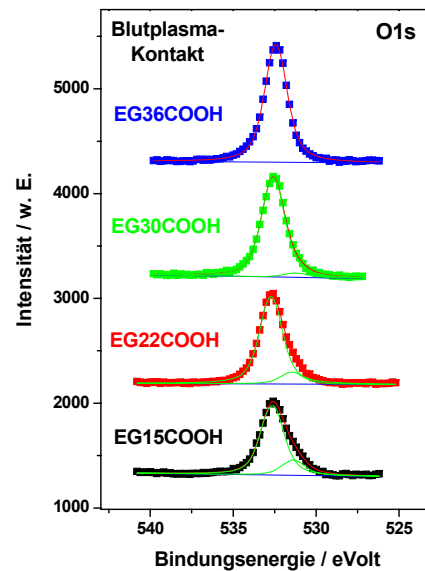
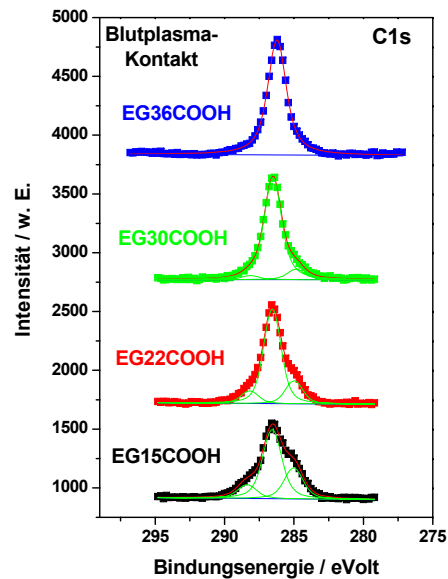


Abb. IV.I.1-62:

Nach dem Blutplasma-Kontakt von den COOH-terminierten PEG-Beschichtungen aufgenommene C1s, O1s und N1s-Detail-spektr.

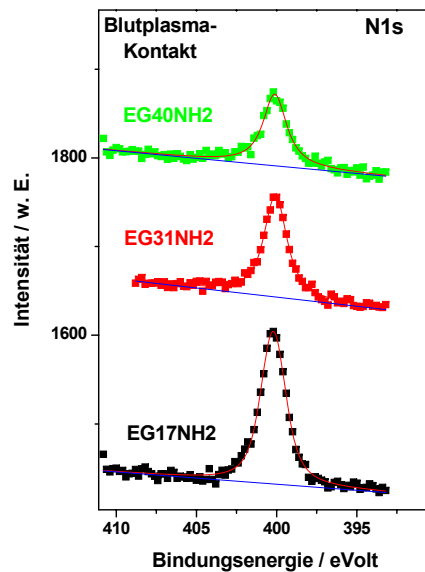
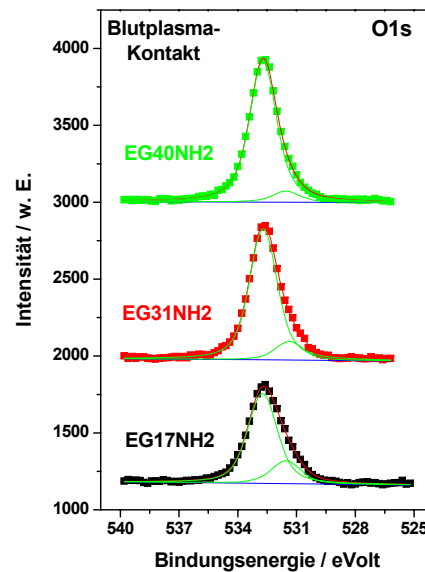
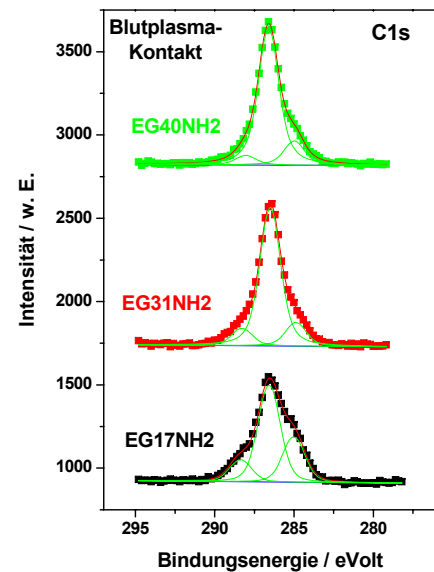
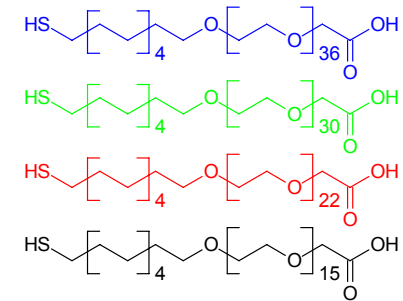
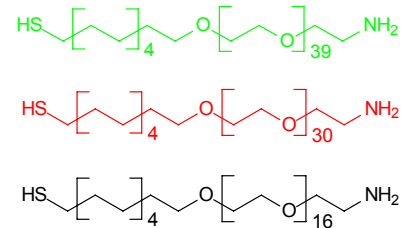


Abb. IV.I.1-63:

Nach dem Blutplasma-Kontakt von den NH₂-terminierten Beschichtungen aufgenommene C1s, O1s und N1s-Detailspektr.



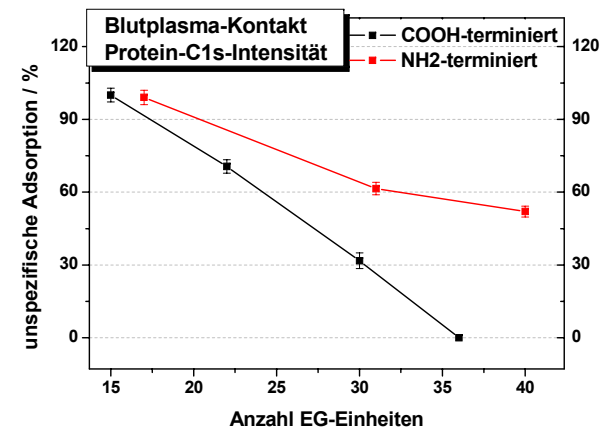
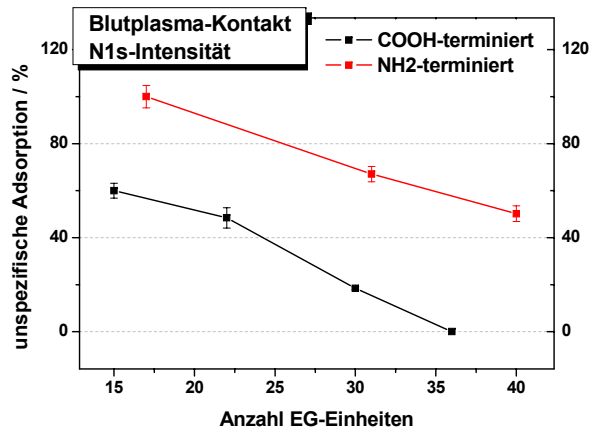
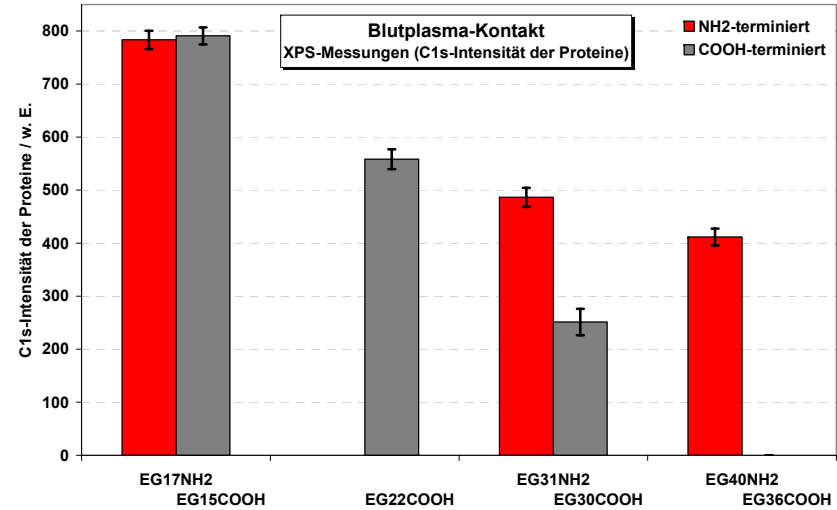
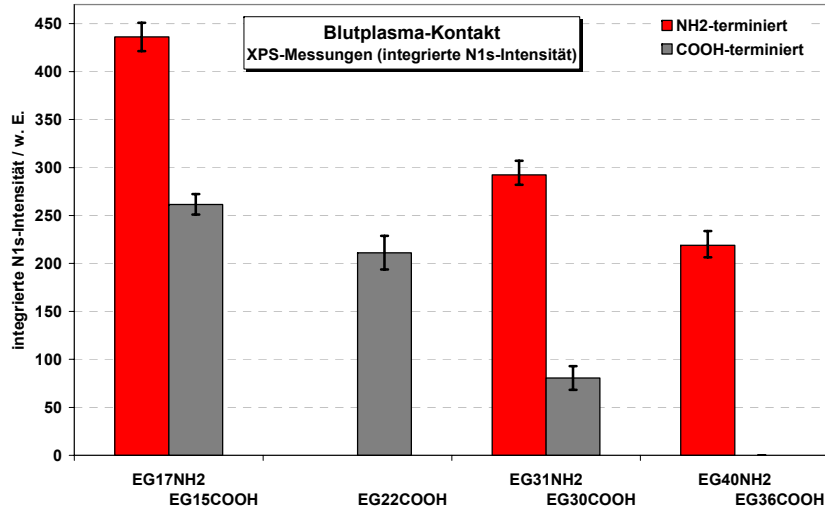


Abb. IV.I.1-64: Abhängigkeit der Blutplasma-Adsorption von der Kettenlänge der Amino- und Carboxy-terminierten PEG-Beschichtungen. Links: Verlauf der Protein-N1s-Intensität; rechts: Verlauf der auf die Proteine zurückzuführenden C1s-Intensität; unten: normierte Darstellung.

Auch diese Auswertungen ergeben eine mit der Kettenlänge nahezu linear abnehmende Adsorptionsrate, wobei die aminoterminierten Oberflächen jedoch höhere Adsorptionsraten zeigen als die carboxyterminierten.

Der anhand der N1s-Intensitäten erhaltene Adsorptionsverlauf zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der bereits beschriebenen Analysemethoden. Im Fall der Auswertung der C1s-Spektren werden im Gegensatz zu den anderen Analysemethoden für die carboxyterminierten Oberflächen jedoch höhere Adsorptionsraten ermittelt, die vermutlich auf mit der Anpassung verbundene Ungenauigkeiten zurückgeführt werden können.

In den Abbildungen IV.1.1-65 und -66 sind für beide Verbindungsklassen getrennt ihre Adsorptionsraten in Abhängigkeit von der Kettenlänge dargestellt.

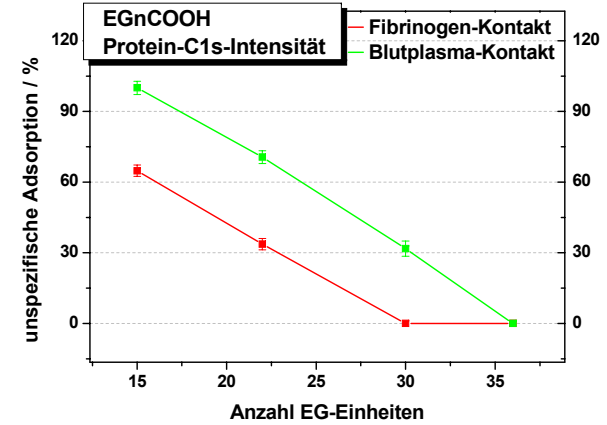
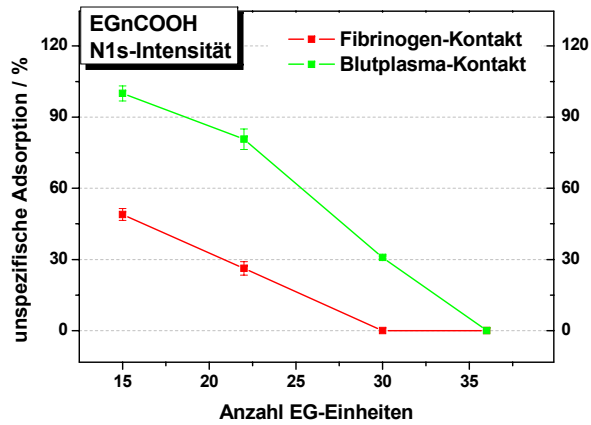
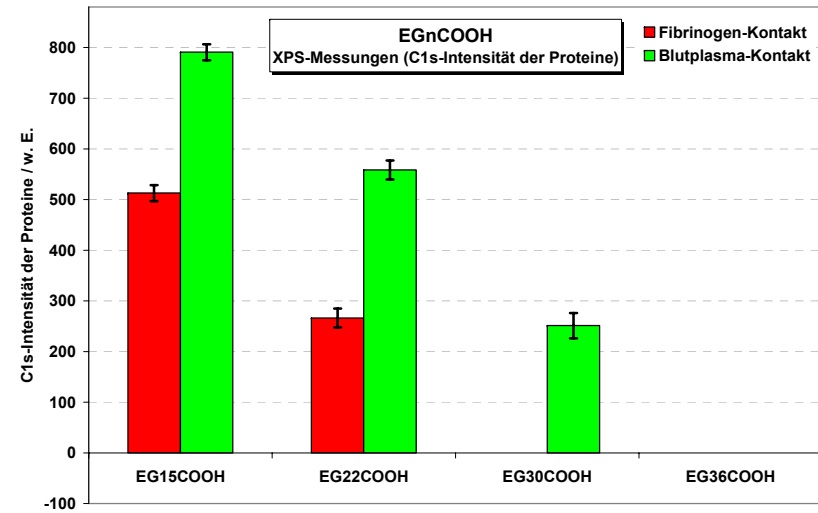
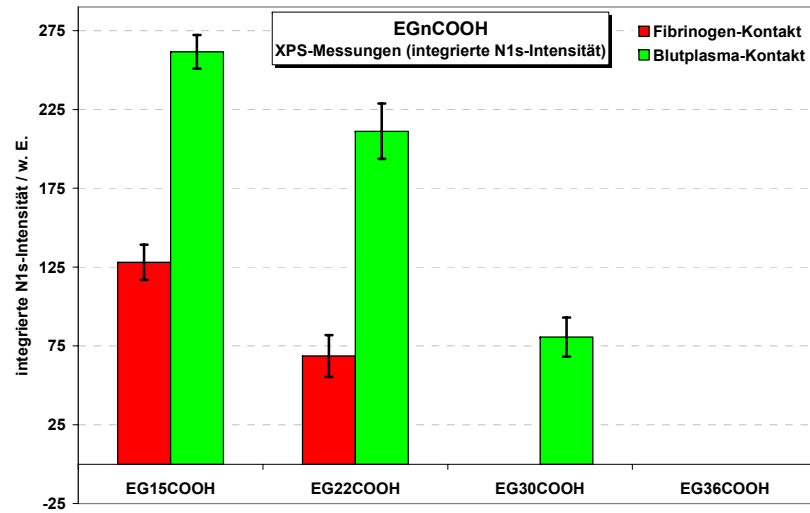


Abb. IV.I.1-65: Abhängigkeit der Fibrinogen- und Blutplasma-Adsorption von der Kettenlänge der COOH-terminierten PEG-Beschichtungen. Links: Verlauf der Protein-N1s-Intensität; rechts: Verlauf der auf die Proteine zurückzuführenden C1s-Intensität; unten: normierte Darstellung.

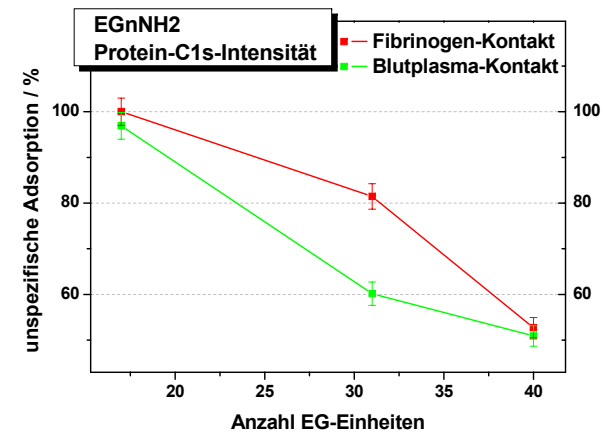
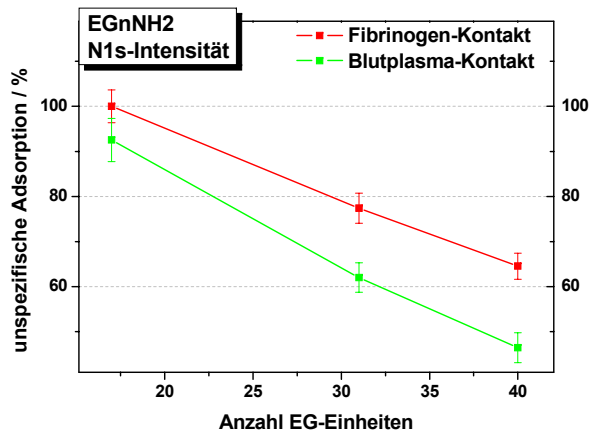
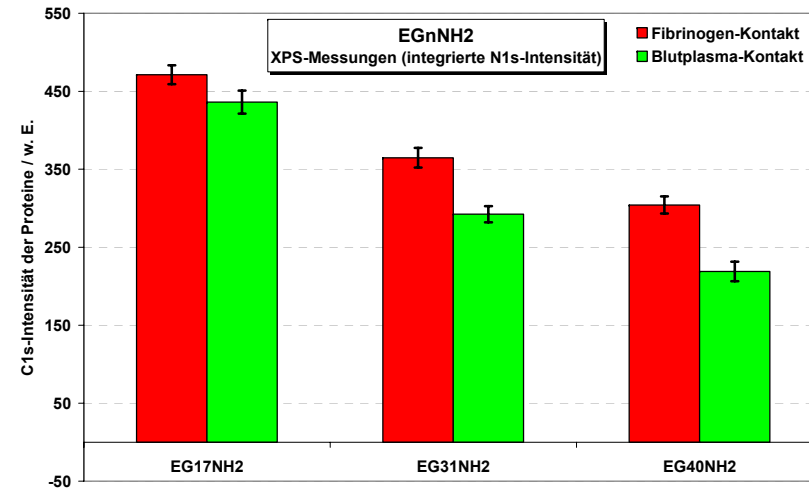
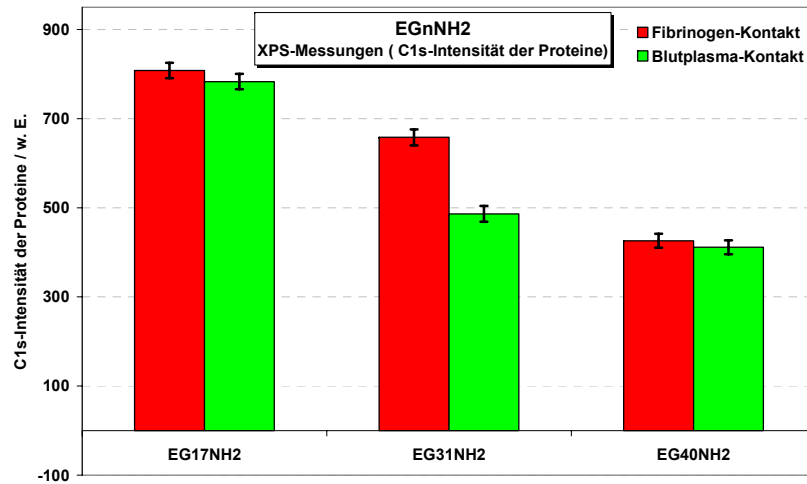


Abb. IV.I.1-66: Abhängigkeit der Fibrinogen- und Blutplasma-Adsorption von der Kettenlänge der NH₂-terminierten PEG-Beschichtungen. Links: Verlauf der Protein-N1s-Intensität; rechts: Verlauf der auf die Proteine zurückzuführenden C1s-Intensität; unten: normierte Darstellung.

Im Fall der carboxyterminierten PEG-Beschichtungen führt die Blutplasma-Behandlung zu höheren Adsorptionsraten als eine Fibrinogen-Behandlung. In Übereinstimmung mit den anderen Analysemethoden ergibt sich auch hier ein von der Art der adsorbierenden Spezies näherungsweise unabhängiger und linearer Adsorptionsverlauf.

Für die aminoterminierten Beschichtungen führt dagegen die Fibrinogen-Behandlung zu höheren Adsorptionsbeiträgen. Unabhängig von der Art der adsorbierenden Spezies ergibt sich aber auch hier ein sehr ähnlicher Adsorptionsverlauf, der durch eine mit der Kettenlänge näherungsweise linear abnehmende Adsorptionsrate gekennzeichnet ist.

In den Abbildungen IV.I.1-67 und -68 sind die XP-Spektren abgebildet, welche nach Kontakt der EG13OH- und EG22OH-beschichteten Oberflächen mit einer Fibrinogen- und Blutplasma-Lösung aufgenommen wurden.

Weder im C1s- noch im O1s-Bereich ist in den Spektren nach diesen Behandlungsschritten eine Veränderung zu erkennen; insbesondere im N1s-Bereich tritt kein detektierbarer Signalbeitrag auf. Somit wird auch anhand dieser Messungen ihr Resistenzverhalten bestätigt.

1.3.4 Gesamtbetrachtung zu den Proteinresistenzstudien

Die Proteinresistenz-Studien zeigen, dass unabhängig von der funktionellen Terminierung mit zunehmender Kettenlänge der vorwiegend helikal geordneten PEG-Beschichtungen eine Zunahme ihrer Proteinresistenz verbunden ist.

Die in den Antikörper-Bindungsstudien festgestellte Abnahme der Bindungsrate mit der mittleren EG-Anzahl kann daher auf eine ansteigende Proteinresistenz der verwendeten PEG-Beschichtungen zurückgeführt werden. Die mit der Kettenlänge zunehmenden Repulsionskräfte bewirken, dass die Oberfläche für die Proteine zunehmend schlechter zugänglich wird und ihre Bindungsraten somit abnehmen.

Die aminoterminierten Oberflächen zeichnen sich dabei bei vergleichbarer Kettenlänge stets durch höhere unspezifische Adsorptionen aus als die carboxyterminierten; somit erklären sich auch die höheren Bindungsraten im Fall der Aminoterminierung.

Weiterhin ergab sich, dass beide Verbindungsklassen einen von der Art des adsorbierenden Proteins näherungsweise unabhängigen Adsorptionsverlauf zeigen, der durch eine mit der mittleren EG-Anzahl nahezu linear abnehmende Adsorptionsrate gekennzeichnet ist. Die mit der Kettenlänge einhergehende Zunahme der Proteinresistenz verläuft bei den COOH-terminierten PEG-Beschichtungen dabei steiler als bei den Aminoterminierten; der Einfluss der adsorbierenden Spezies auf den Adsorptionsverlauf äußert sich lediglich in der Größe eines Offsets, um den die Adsorptionskurven verschoben sind.

Es wird vermutet, dass bezüglich der Proteinresistenz elektrostatische Wechselwirkungen eine entscheidende Bedeutung spielen. Da die meisten Proteine eine negative Nettoladung besitzen, sind höhere Adsorptionsraten im Fall positiv geladener Oberflächen zu erwarten; somit erklären sich die höheren Adsorptionsraten der aminoterminierten Oberflächen durch eine Protonierung ihrer Endgruppenfunktionalitäten. Die aminoterminierten Verbindungen zeigten bei jeder der untersuchten Kettenlängen, sowohl im Fall der Fibrinogen- als auch der Blutplasma-Behandlung unspezifische Adsorption.

Dagegen erwiesen sich die carboxyterminierten Oberflächen bereits ab einer Kettenlänge von 30 Einheiten als resistent gegenüber einer unspezifischen Fibrinogen-Adsorption; bei einer Blutplasma-Behandlung wurde Resistenzverhalten hingegen erst ab einer Kettenlänge von 36 Einheiten festgestellt.

In immunodiagnostischen Anwendungen, in denen man auf der einen Seite zwar in Bezug auf eine Rezeptor-Funktionalisierung an möglichst hohen Bindungsraten interessiert ist, eine

unspezifische Adsorption jedoch gleichzeitig möglichst vermeiden will, muss man daher bei Gebrauch der beschriebenen PEG-Beschichtungen einen Kompromiss eingehen.

Bestehen höhere Anforderungen bezüglich der Proteinresistenz, so sollte auf COOH-terminierte Beschichtungen zurückgegriffen werden. Hier wäre die Verbindung EG30COOH zu empfehlen, da diese recht hohe Bindungsraten erlaubt, unspezifische Adsorptionsprozesse jedoch weitgehend unterdrückt. Ist man dagegen vorwiegend an hohen Bindungsraten interessiert und bestehen niedrigere Anforderungen bezüglich der Proteinresistenz, so sollte auf eine aminoterminierte PEG-Matrix zurückgegriffen werden; diese Endgruppenfunktionalität führt im Vergleich zu einer Carboxyterminierung zu höheren Bindungsraten; die Kettenlänge der verwendeten Matrix ist entsprechend der gewünschten Proteinresistenz einzustellen.

1.4 Zusammenfassende Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Abschnitts 1.2 und 1.3 kurz zusammenfassend diskutiert.

Als wichtigstes Ergebnis der Proteinbindungs- und Resistenzstudien kann festgehalten werden, dass die Fähigkeit zur kovalenten Bindung von Protein-Rezeptoren (Bindungskapazität) einer endgruppenfunktionalisierten und vorwiegend helikal geordneten PEG-Matrix durch ihre Proteinresistenz bestimmt wird, die mit der Anzahl an EG-Einheiten in einem Bereich von $n_{EG} = 15$ bis 40 kontinuierlich zunimmt, sowie durch die Art ihrer funktionellen Terminierung.

Eine mit zunehmendem Molekulargewicht ansteigende Proteinresistenz von PEG wurde sowohl theoretisch vorhergesagt [68], [69], [70], [71] als auch bereits experimentell belegt [39], [73], [74], [75]. Des Weiteren zeigen PEG-Beschichtungen eine Abhängigkeit ihrer Proteinresistenz vom Bedeckungsgrad auf der jeweiligen Substratoberfläche [66], [85], [237]. In den beschriebenen Versuchen wurde daher darauf geachtet, von jeder PEG-Verbindung einen möglichst identischen Bedeckungsgrad auf den verwendeten Gold-Oberflächen einzustellen, so dass eine vergleichbare Anzahl von EG-Einheiten pro Flächeneinheit des Substrates resultiert.

Die Anzahl an EG-Einheiten pro Flächeneinheit N_{EG} (= EG-Dichte) kann nach der Gleichung (98) berechnet werden [238], [239], [240]

$$N_{EG} = n_{EG} \frac{MW}{10 \cdot \rho \cdot d \cdot N_A} \quad [\text{nm}^2] \quad (98)$$

Hierbei bezeichnet n_{EG} die Anzahl an EG-Einheiten der verwendeten PEG-Verbindung, MW ihr Molekulargewicht, d ist die Dicke der PEG-Beschichtung in Å und ρ die Dichte von PEG (1 g/cm^3); die Größe N_{EG} beinhaltet somit die kombinierte Information über die Anzahl an EG-Einheiten und den Bedeckungsgrad der erzeugten PEG-Beschichtung und stellt somit eine effektive Anzahl an EG-Einheiten dar.

In den Abbildungen IV.I.1-69 ist für beide Verbindungsklassen (EGnCOOH und EGnNH₂) die in den Proteinbindungs- und Resistenzstudien resultierende immobilisierte und auf die unspezifische Fibrinogenadsorption einer Hexadecanthalmonolage normierte Proteinmenge in Abhängigkeit von der Größe N_{EG} dargestellt; die Abbildung IV.I.1-70 zeigt dieselben Daten in einer linearen Anpassung.

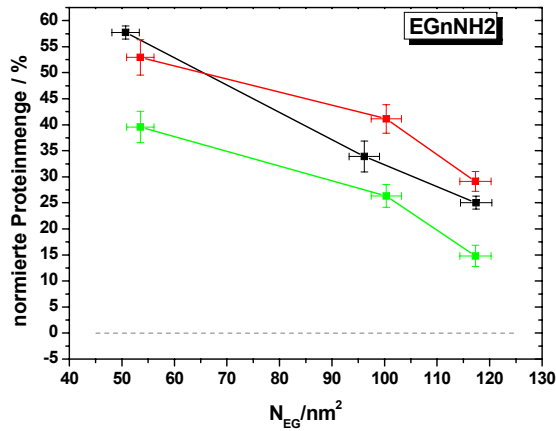
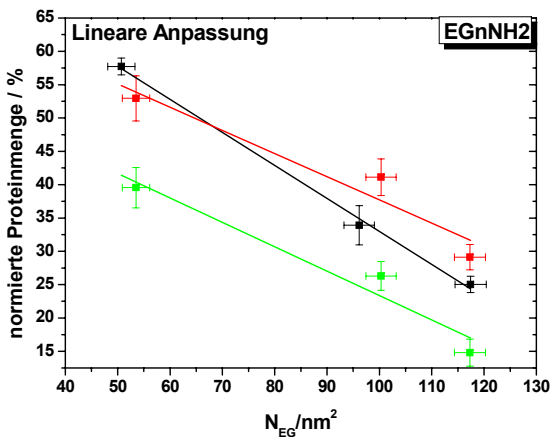
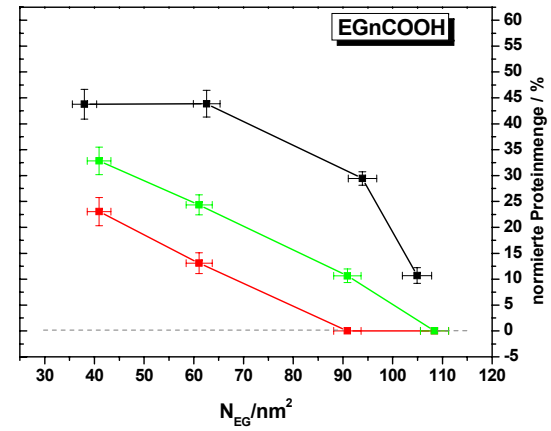


Abb. IV.I.1-69:
 Abhängigkeit der normierten immobilisierten Proteinmenge (kovalente Antikörper-Bindung bzw. nach Fibrinogen- und Blutplasma-Kontakt resultierende unspezifische Adsorption) von der EG-Dichte (N_{EG}/nm^2).
 Links: Aminoterminierte PEG-Oberflächen;
 Rechts: Carboxyterminierte PEG-Oberflächen.

■ — kovalente Antikörper-Bindung
 ■ — Blutplasma-Kontakt } unspezifische
 ■ — Fibrinogen-Kontakt } Adsorption

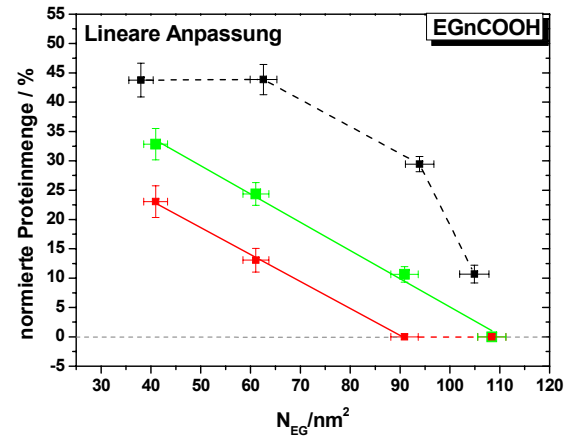


kovalente Antikörper-Bindung
 $\chi^2/DoF = 1.543$
 $R^2 = 0.9973$
 P1 -0.49522 ± 0.02577
 P2 82.50984 ± 2.38059

Fibrinogen-Kontakt
 $\chi^2/DoF = 19.87678$
 $R^2 = 0.92999$
 P1 -0.34772 ± 0.0954
 P2 72.48229 ± 8.99769

Blutplasma-Kontakt
 $\chi^2/DoF = 14.95746$
 $R^2 = 0.95125$
 P1 -0.36556 ± 0.08276
 P2 59.92836 ± 7.80526

■ — kovalente Antikörper-Bindung
 ■ — Blutplasma-Kontakt } unspezifische
 ■ — Fibrinogen-Kontakt } Adsorption



Blutplasma-Kontakt
 $\chi^2/DoF = 1.61495$
 $R^2 = 0.99491$
 P1 -0.48145 ± 0.02436
 P2 53.22804 ± 1.94196

Fibrinogen-Kontakt
 $\chi^2/DoF = 0.31189$
 $R^2 = 0.99883$
 P1 -0.45965 ± 0.01571
 P2 41.59946 ± 1.06065

- - - kovalente Antikörper-Bindung } lineare
 ■ — Blutplasma-Kontakt } Anpassung
 ■ — Fibrinogen-Kontakt } Anpassung

Abb. IV.I.1-70: Links: lineare Anpassung der Adsorptions- und Bindungskurven der aminoterminierten PEG-Oberflächen.
 Rechts: lineare Anpassung der Adsorptions- und Bindungskurven der carboxyterminierten PEG-Oberflächen.

Ein Vergleich mit den Auswertungen des Abschnitts 1.2 und 1.3 zeigt, dass die zusätzliche Berücksichtigung des jeweiligen Bedeckungsgrades zu keiner wesentlichen Veränderung der ermittelten Bindungs- und Adsorptionsverläufe führt. Ihr unterschiedliches Adsorptionsverhalten kann somit weder auf einen abweichenden Bedeckungsgrad noch eine variierende Oberflächendichte an funktionelle Gruppen zurückgeführt werden. Dies wird auch durch die Abbildungen IV.I.1-71 bestätigt, in denen die normierte immobilisierte Proteinmenge sowohl für die Bindungs- als auch Resistenzstudien in Abhängigkeit von der Oberflächendichte an funktionellen Gruppe aufgetragen ist.

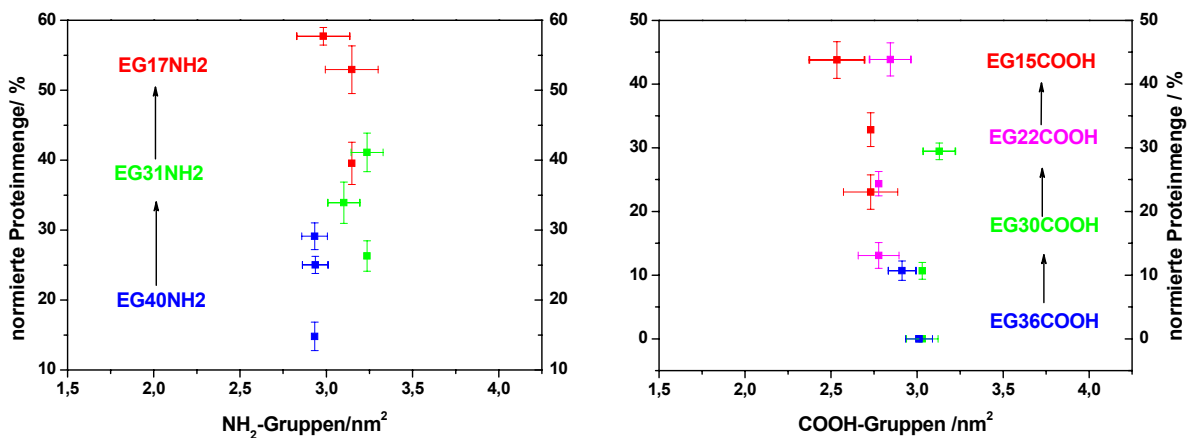


Abb. IV.I.1-71: Normierte immobilisierte Proteinmenge (1x kovalente Bindung, 2x unspezifische Adsorption) in Abhängigkeit von der Dichte funktioneller Gruppen (X-Gruppen/nm²). Links: aminoterminierte Oberflächen; Rechts: carboxyterminierte Oberflächen.

Die jeweiligen PEG-Matrices weisen eine sehr ähnliche Funktionsdichte von durchschnittlich etwa 3,0 funktionellen Endgruppen/nm² auf.

Unabhängig von der Art der Immobilisierung (kovalente Fixierung, Physisorption) und des verwendeten Proteins ist anhand der Abbildung IV.I.1-71 eine mit abnehmender Anzahl an EG-Einheiten ansteigende Immobilisationsrate erkennbar; diese Beobachtung wird auch durch die Abbildungen IV.I.1-69 bestätigt. Sowohl die amino- als auch carboxy-terminierten PEG-Oberflächen zeigen einen sehr ähnlichen und nahezu linearen Adsorptionsverlauf, der sich für verschiedene Adsorbate lediglich in einem Offset unterscheidet.

Eine lineare Anpassung (Abbildung IV.I.1-70) ergibt für die Adsorptionskurven der aminoterminierten PEGs eine mittlere Steigung von -0,36 Protein/N_{EG}; die Adsorptionskurven der carboxyterminierten PEGs verlaufen dagegen um etwa 32% steiler (Steigung = -0,47 Protein/N_{EG}), so dass die Adsorptionsraten hier mit Zunahme der EG-Dichte wesentlich schneller abnehmen als im Fall einer Amino-Terminierung.

Die Bindungskurve der aminoterminierten PEGs liegt in einem ähnlichen Bereich von Proteinmengen wie die bei der entsprechenden EG-Dichte (N_{EG}) beobachtete unspezifische Proteinadsorption (Fibrinogen-Adsorption) und verläuft ebenfalls nahezu linear.

Dagegen befindet sich die Bindungskurve der Carboxyterminierten PEGs deutlich oberhalb der Adsorptionskurven. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass nicht alle Proteine, welche diese PEG-Oberfläche erreichen, auch irreversibel an dieser physisorbiert werden, sondern teilweise durch den Waschprozess von der Oberfläche wieder abgelöst werden. Diese Beschichtungsklasse zeichnet sich daher durch schwächere Protein-Matrix-Wechselwirkungen aus als eine aminoterminierte PEG-Oberfläche. Die Bindungskurve weist im Gegensatz zu derer der aminoterminierten Oberflächen weiterhin Abweichungen von einer linearen Form auf; bereits ab einer Kettenlänge von 22 EG-Einheiten wird eine maximale Bindungskapazität erreicht und ab einer EG-Anzahl von 30 Einheiten nimmt die Bindungsrate wesentlich steiler ab als die unspezifische Adsorptionsrate. Die höhere Proteinresistenz dieser Verbindungsklasse äußert sich somit in einer empfindlicheren Reaktion ihrer Bindungskapazität in Bezug auf Änderungen der EG-Dichte.

Theoretische und experimentelle Ansätze zur Beschreibung der die Proteinresistenz von PEG-Beschichtungen bestimmenden Faktoren weisen vor allem der Kettenlänge und dem Bedeckungsgrad eine besondere Relevanz zu [66], [68], [69], [70], [71], [85]. Während ein ausreichender Bedeckungsgrad erforderlich ist, um eine unspezifische Adsorption auf dem verwendeten Träger zu vermeiden, ist die mit der Kettenlänge zunehmende Proteinresistenz ein inhärentes Merkmal der verwendeten PEG-Beschichtung.

Es wurde bereits nachgewiesen, dass eine Zunahme der Kettenlänge von 10 bis 120 EG-Einheiten mit einer ansteigenden Proteinresistenz einhergeht [73], [74], [75]; diese wurde auf ein höheres Ausschlussvolumen, sowie eine zunehmende konformelle Entropie und somit eine verstärkte sterische Repulsion zurückgeführt wird .

In [241] wurden PET-Oberflächen (PET = Polyethylenterephthalat) kovalent mit di-Amino-PEGs unterschiedlichen Molekulargewichts (MW = 400 - 20.000 g/mol) kovalent funktionalisiert und ihre Proteinresistenz durch Behandlung mit ^{125}I -markiertem Fibrinogen und BSA und einer anschließenden Radioaktivitätsmessung ermittelt. Bis hin zu einem Molekulargewicht von 3500 g/mol wurde in beiden Fällen eine erhebliche Steigerung der Proteinresistenz festgestellt. Im Fall einer Fibrinogen-Behandlung nimmt die adsorbierte Proteinmenge von etwa $0,85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei einem MW von 400 g/mol bis auf etwa ein viertel ($0,22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) bei einem MW von 3500 g/mol ab. Eine weitere Zunahme des Molekulargewichts hat allerdings nur eine geringfügige Abnahme der unspezifisch adsorbierten Fibrinogen-Menge zur Folge. Bei einem MW von 20.000 g/mol liegt diese immerhin noch bei etwa $0,09 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; diese trotz des hohen Molekulargewichts relativ hohe Adsorptionsrate wurde auf elektrostatische Wechselwirkungen mit den Aminogruppen der Oberfläche zurückgeführt wurde, die sich unter an-

derem in einer mit zunehmender Ionenstärke abnehmenden Adsorptionsrate äußerten. Insgesamt wurde in der Referenz [241] aus den beschriebenen Studien gefolgert, dass ein Molekulargewicht von mindestens 2000 - 3500 g/mol erforderlich ist, um eine unspezifische Adsorption weitgehend zu unterdrücken.

In einem weiteren Ansatz [39] wurde auf analogem Weg die Proteinresistenz von auf PET-Oberflächen kovalent aufgebrachter statistischer Kopolymere des Typs PEO/PPO mit einem MW von 2000 g/mol und einem variierendem EG-Gehalt untersucht. Auch hierbei wurde bis hin zu einem EG-Anteil von 94% (entspricht einer Anzahl von 43 EG-Einheiten) eine nahezu lineare Abnahme der adsorbierten Proteinmenge festgestellt. Im Fall eines Fibrinogen-Kontakts nimmt diese von etwa $1,29 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei einem EG-Gehalt von 6% (3 EG-Einheiten) bis auf etwa $0,58 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bei einem EG-Anteil von 94% (43 EG-Einheiten) ab.

In den beiden Literaturbeispielen wurde die mit dem EG-Gehalt der PEG-Beschichtungen ansteigende Proteinresistenz auf eine Ausdehnung ihrer Hydrathülle zurückgeführt, die wiederum ein größeres Ausschlussvolumen zur Folge hat und somit der mit einer Proteinadsorption einhergehenden kompressiven Dehydratisierung entgegenwirkt.

Die in dieser Arbeit präparierten PEG-Beschichtungen zeigten bei einer Zunahme der mittleren Anzahl an EG-Einheiten einen zu den beschriebenen Resistenzstudien vergleichbaren Anstieg der Proteinresistenz. Die in den beiden Literaturbeispielen ermittelte Fibrinogenadsorption ist in den Abbildungen IV.I.1-72 derer der aminoterminierten PEG-Oberflächen (EGnNH₂) gegenübergestellt; dargestellt ist jeweils die normierte unspezifisch adsorbierte Proteinmenge in Abhängigkeit von der mittleren EG-Anzahl der immobilisierten PEG-Moleküle.

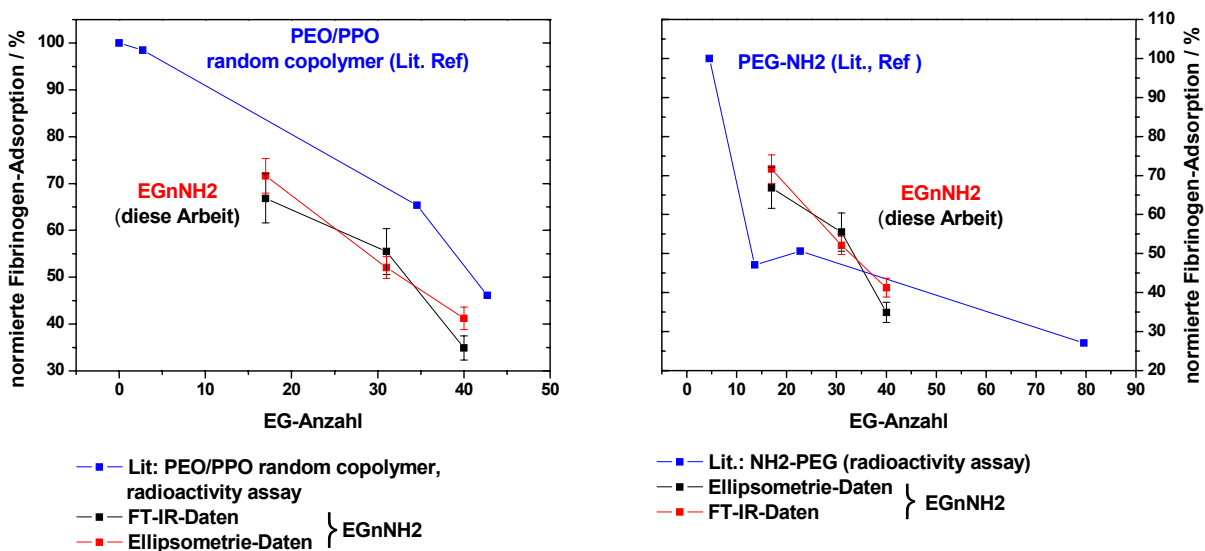


Abb. IV.I.1-72: Normierte Fibrinogenadsorption in Abhängigkeit von der EG-Anzahl der PEG-Moleküle. Vergleich der Adsorptionsraten der aminoterminierten PEG-Beschichtungen mit den Adsorptionsraten der Literaturreferenz [39] (links) und der Referenz [241] (rechts).

Obwohl sich die jeweiligen Systeme in verschiedenen Aspekten teilweise erheblich unterscheiden (adsorbierte PEG-Verbindung, verwendeter Träger, Bedeckungsgrad), ergibt sich in dieser normierten Darstellung eine gute Übereinstimmung bezüglich des Adsorptionsverlaufs.

In vielen in der Literatur beschriebenen Beispielen wird die Proteinresistenz unfunktionalisierter PEG-Beschichtungen analysiert; in den meisten Fällen reduziert sich die Proteinadsorption dabei in einem Bereich von EG-Dichten bis zu $N_{EG} \sim 20 \text{ nm}^{-2}$ bereits auf das Nullniveau und ist neben einer mit dem Molekulargewicht ansteigenden Proteinresistenz hauptsächlich auch auf eine mit dem Bedeckungsgrad zunehmende Abschirmung der unspezifischen Protein-Substrat-Wechselwirkungen zurückzuführen.

Dagegen weisen die in dieser Arbeit präparierten PEG-Verbindungen durchweg einen sehr ähnlichen und hohen Bedeckungsgrad von etwa 78% (bezogen auf vollständig helikal geordnete PEG-Monolagen) auf, so dass Wechselwirkungen mit dem Träger ausgeschlossen werden können. Ihre funktionelle Terminierung verursacht jedoch einen unspezifischen Adsorptionsbeitrag, so dass bei einer Erhöhung des Molekulargewichts spezifisch der Einfluss des EG-Gehaltes auf die Proteinadsorption studiert werden kann. Hierbei ergab sich, dass EG-Dichten von über 90 nm^{-2} erforderlich sind, um eine unspezifische Adsorption zu unterdrücken. Zum Vergleich solcher Systeme sollten daher PEG-Beschichtungen herangezogen werden, die ebenfalls einen Bestandteil aufweisen, der eine unspezifische Adsorption hervorruft und die somit den konkurrierenden Einfluss des EG-Gehaltes auf die Adsorption beschreiben können. Bei den 2 oben beschriebenen Literaturbeispielen ist dies der Fall; die immobilisierten PEG-Moleküle beinhalten einen PPO-Bestandteil bzw. eine Aminoterminierung, welche unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen hervorrufen.

Wie bereits beschrieben wird die mit zunehmendem Molekulargewicht des PEG ansteigende Proteinresistenz auf eine Ausdehnung ihrer Hydrathülle zurückgeführt.

In der Literatur werden unterschiedliche molekulare Modelle diskutiert, welche die temperaturabhängige molekulare Wechselwirkung zwischen PEG und Wasser beschreiben [37], [39], [242]. Diese führt dazu, dass ab einer Kettenlänge von $n \geq 48,6$ ($MW \geq 2138 \text{ g/mol}$) im Phasendiagramm des binären PEG/Wasser-Systems oberhalb einer bestimmten kritischen Temperatur eine Mischungslücke auftritt [242]. Diese Temperatur, bei welcher eine Phasentrennung auftritt, wird auch als *cloud point* bezeichnet. Bei einem Molekulargewicht von $MW = 1900 \text{ g/mol}$ liegt der *cloud point* bei einer Temperatur von 180°C [39]. Wird die Temperatur weiter erhöht, so führt die ideale Mischungsentropie ΔS_i schließlich dazu, dass die Mischungslücke geschlossen wird und wieder eine vollständige Mischbarkeit der beiden Komponenten (PEG und Wasser) resultiert.

Nach dem von Kjellander und Robertsson aufgestelltem thermodynamischen Modell [37] lässt sich das Verhalten von PEG in wässriger Lösung analog zu demjenigen hydrophober

Verbindungen, wie z.B. von Kohlenwasserstoffen und anderen nicht-polaren Molekülen beschreiben. Diese führen in wässriger Lösung zu einer verstärkten Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in der sie umgebenden Wasserschicht und somit zum Aufbau einer hoch geordneten, aus Wassermolekülen bestehenden Käfig-Struktur (hydrophober Effekt). Kjellander und Robertsson nehmen dabei an, dass sich die PEG-Moleküle in wässriger Lösung in einer helikalen trans-gauche-trans-Konformation befinden, die perfekt in ein hexagonales Wassergitter passt. Die Ausbildung einer solchen hoch geordneten Hydrathülle ist mit einer Enthalpie-Abnahme verbunden ($\Delta H < 0$), jedoch entropisch ungünstig ($\Delta S > 0$); bei niedrigeren Temperaturen nimmt die freie Energie insgesamt ab ($\Delta G < 0$), so dass der Prozess spontan abläuft. Wird die Temperatur jedoch erhöht, so gewinnt der Entropie-Term zunehmend an Bedeutung; das geordnete Wassernetzwerk zerfällt und die schwachen van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den PEG-Ketten verursachen eine Phasentrennung. Von Karlström [242] wurde ein weiteres Modell zur Deutung der temperaturabhängigen Wechselwirkungen zwischen PEG und Wasser aufgestellt. Nach diesem sind temperaturabhängige Konformationsänderungen der PEG-Struktur für das Auftreten der Mischungslücke verantwortlich. Auch er geht bei niedrigeren Temperaturen von einer trans-gauche-trans-Konformation aus; eine solche Orientierung, bei welcher der Sauerstoff eine gauche Orientierung um die C-C-Bindung einnimmt und eine trans-Konformation um die C-O-Bindung vorliegt, ist mit einem hohen Dipolmoment verbunden und führt daher zu einer verstärkten Wechselwirkung mit dem umgebenden Wassermolekülen. Wird die Temperatur jedoch erhöht, so werden Konformationen eingenommen, die ein geringeres Dipolmoment aufweisen. Damit verbunden ist eine Reduktion der sie umgebenden Hydrathülle, welche eine Aggregation der PEG-Moleküle ermöglicht und somit zu einer Phasentrennung führt.

Die Aspekte beider Theorien können auf die in dieser Arbeit präparierten PEG-Beschichtungen übertragen werden. Auch diese liegen, wie anhand der FT-IR-Spektren gezeigt werden konnte, in einer helikalen trans-gauche-trans-Konformation vor, so dass sowohl infolge des hohen Dipolmoments als auch aus geometrischen Gründen von einer effektiven Hydratisierung ausgegangen werden kann. Mit zunehmender Kettenlänge nimmt der helikale Anteil der Beschichtung zu und der amorphe Anteil folglich ab, da die PEG-Verbindungen eine ähnliche Polymerverteilung von $n \approx \pm 11$ aufweisen. Daher nimmt auch die Hydrathülle bei Zunahme der Kettenlänge erheblich zu und führt zu verstärkten Repulsionskräften gegenüber einer Adsorption von Proteinen.

Da die proteinresistenten Eigenschaften des PEG allgemein auf ihre einzigartigen Wechselwirkungen mit Wasser zurückgeführt werden, fällt bei Betrachtung der beschriebenen Interaktionen zwischen PEG und Wasser auf, dass eine Mischungslücke gerade bei einem Molekulargewicht ($MW \geq 2138$; $EG \geq 48,6$) einsetzt, ab dem auch die in dieser Arbeit präparierten PEG-Beschichtungen beginnen, eine effektive Proteinresistenz zu zeigen. Nach dem Modell

von Kjellander [37] hat die Hydrathülle ab diesem Molekulargewicht ein Ausmaß erreicht, das mit einer sehr niedrigen Systementropie verbunden ist und bei einer Temperaturerhöhung daher einen entropisch begründeten Zusammenbruch erleidet. Die mit dem Molekulargewicht ansteigende Hydrathülle hat wiederum ein größeres Ausschlussvolumen und somit eine zunehmende Proteinresistenz zur Folge.

Zusätzlich konnte auch bei PEG-Beschichtungen eine temperaturabhängige Proteinresistenz beobachtet werden, die nach den Modellen von Kjellander und Karlström auf Änderungen ihrer Wechselwirkungen mit Wasser zurückzuführen sind. In [243] konnte durch eine Änderung der Temperatur z.B. reversibel zwischen resistenten nicht nicht-resistenten Eigenschaften umgeschaltet werden; anhand von SFG-Messungen wurde nachgewiesen, dass die mit der Temperaturzunahme verbundene Proteinadsorption auf eine Konformationsänderung der EG-Ketten zurückzuführen ist.

2 Einfluss des Funktionsdichte auf die unspezifische Proteinadsorption

Anhand der in Abschnitt 1.2 und 1.3 beschriebenen Proteinbindungs- und Adsorptionsstudien konnte bereits gefolgert werden, dass die Proteinresistenz und somit auch die Bindungskapazität einer PEG-Beschichtung nicht nur von der Dichte der EG-Einheiten (n_{EG}/nm^2) abhängt, sondern auch durch die Art ihrer funktionellen Terminierung bestimmt wird.

So konnte für die Hydroxy-terminierten Verbindungen selbst bei einer mittleren EG-Anzahl von nur 13 Einheiten weder eine Fibrinogen- noch eine Blutplasma-Adsorption festgestellt werden, wohingegen die aminoterminierten Verbindungen selbst bei einer Kettenlänge von 40 Einheiten in beiden Fällen hohe Adsorptionsraten zeigten. Es wurde postuliert, dass dieses unterschiedliche Verhalten hauptsächlich auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen protonierten Aminogruppen der Oberfläche und den Proteinen zurückzuführen sei.

Ziel dieses Abschnittes ist es, den Einfluss der Oberflächenkonzentration an funktionellen Gruppen auf die Proteinresistenz der PEG-Oberflächen zu analysieren. Hierzu wurden unterschiedliche Bedeckungen der Verbindungen EG30COOH und EG31NH₂ auf Goldbedampften Si-Wafern eingestellt und die resultierenden Beschichtungen durch eine Fibrinogen-Behandlung hinsichtlich ihrer Proteinresistenz untersucht. Da mit zunehmendem Bedeckungsgrad ein Übergang von einer amorphen in eine gestreckte und helikale Konformation der PEG-Ketten vollzogen wird, kann über eine Variation des Bedeckungsgrades auf diese Weise somit auch eine unterschiedliche Oberflächendichte an funktionellen Gruppen eingestellt werden.

Auch die Hypothese einer elektrostatisch vermittelten Proteinadsorption im Fall der Aminoterminierung kann über eine Analyse der bei unterschiedlichen Bedeckungen resultierenden Adsorptionsraten überprüft werden; bei einer Zunahme der Oberflächenkonzentration an funktionellen Gruppen wäre in diesem Fall mit ansteigenden Adsorptionsraten zu rechnen.

Es muss jedoch beachtet werden, dass der Bedeckungsgrad die Wechselwirkung einer PEG-Beschichtung mit Proteinen nicht nur über die mit ihm zusammenhängende Oberflächendichte an funktionellen Gruppen bestimmt. Proteinresistenz erfordert zudem eine vollständige PEG-Bedeckung der jeweiligen Substratoberfläche, um eine unspezifische Adsorption auf dem betreffenden Träger zu verhindern. Ein solcher Einfluss könnte sich insbesondere bei der Verbindung EG30COOH bemerkbar machen. Da diese selbst im Fall einer hohen Oberflächendichte an COOH-Gruppen keine unspezifische Fibrinogen-Adsorption zeigt, müsste eine bei niedrigeren Bedeckungen eventuell auftretende Adsorption auf Wechselwirkungen der Proteine mit dem Träger zurückgeführt werden.

2.1 Aminoterminierte PEG-Beschichtungen

Es wurden unterschiedliche Bedeckungen des PEG-Thiols EG31NH₂ auf Gold-bedampften Si-Wafern eingestellt und die durch Behandlung der Oberflächen mit einer Fibrinogen-Lösung hervorgerufene unspezifische Adsorptionsrate ermittelt.

Der Adsorptionsprozess wurde hierzu nach verschiedenen Zeiten durch Entnahme der Substrate (Au-bedampfte Si-Wafer) aus der PEG-Thiol Lösung unterbrochen und die Schichtdicke der erhaltenen Monolagen ellipsometrisch bestimmt. Nach dem Fibrinogen-Kontakt wurden die Schichtdicken erneut bestimmt; vor und nach der Protein-Behandlung wurden außerdem XP-Spektren von den Oberflächen aufgenommen.

2.1.1 Ellipsometrie-Messungen

In der Tabelle IV.1.2-1 sind die nach den unterschiedlichen Einlegezeiten in der Thiollösung resultierenden Schichtdicken aufgeführt; durch Vergleich mit der für eine vollständig helikal geordnete EG31NH₂-Monolage theoretisch zu erwartenden Schichtdicke (99,44 Å; s. Abs. 1.2.1.2) konnte der jeweilige Bedeckungsgrad ermittelt werden.

Nach der Inkubation der Substrate in der Fibrinogen-Lösung wurde die Schichtdicke erneut bestimmt, so dass der auf die unspezifische Protein-Adsorption zurückzuführende Schichtdickenanstieg ermittelt werden konnte. Die in der Tabelle IV.1.2-1 angegebenen Adsorptionsraten beziehen sich auch hier auf die unspezifische Fibrinogen-Adsorption einer Hexadecanthiolmonolage auf Au.

<i>Filmbildungskinetik</i>			<i>Fibrinogen-Kontakt</i>	
<i>Adsorptionszeit / min</i>	<i>Schichtdicke / Å</i>	<i>Bedeckungsgrad / %</i>	<i>Schichtdickenanstieg / Å</i>	<i>Adsorptionsrate / %</i>
1	21,64	21,76	-1,18	-2,5
3	27,01	27,16	-0,35	-0,7
6	33,45	33,64	2,73	5,7
30	65,61	65,98	13,99	29,1
60	74,94	75,36	22,63	47,2
155	84,08	84,55	21,74	45,3
795	87,85	88,34	22,3	46,5

Tab. IV.1.2-1: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicke, Bedeckungsgrad und unspezifische Fibrinogen-Adsorption der nach den verschiedenen Einlegezeiten erhaltenen EG31NH₂-Monolagen.

Mit zunehmender Adsorptionszeit ist ein kontinuierlicher Schichtdickenanstieg verbunden; ein deutlicher Sprung von etwa 32 Å wird zwischen einer Einlegezeit von 6 und 30 Minuten festgestellt. Nach einem Zeitraum von etwa 6 Minuten setzt somit der Übergang von einer amorphen und ungeordneten PEG-Struktur in eine gestreckte und helikale Konformation der PEG-Ketten ein. Des Weiteren zeigt sich, dass mit ansteigendem Bedeckungsgrad, wie bereits vermutet, auch eine kontinuierliche Zunahme der Fibrinogen-Adsorption verbunden ist. Analog zur Zunahme des Bedeckungsgrades wird ein erheblicher Anstieg der unspezifischen Adsorptionsrate zwischen einer Einlegezeit von 6 und 30 min beobachtet; die Vermutung einer durch die protonierten Amino-Endgruppen vermittelten elektrostatischen Adsorption wird hierdurch somit bekräftigt, da der Oberflächenanteil dieser Gruppen mit zunehmender Bedeckung ebenfalls ansteigt.

In der Abbildung IV.1.2-1 ist die Filmbildungskinetik der Verbindung EG31NH₂ graphisch dargestellt; der initiale Filmbildungsprozess kann in einer logarithmischen Darstellung besser analysiert werden.

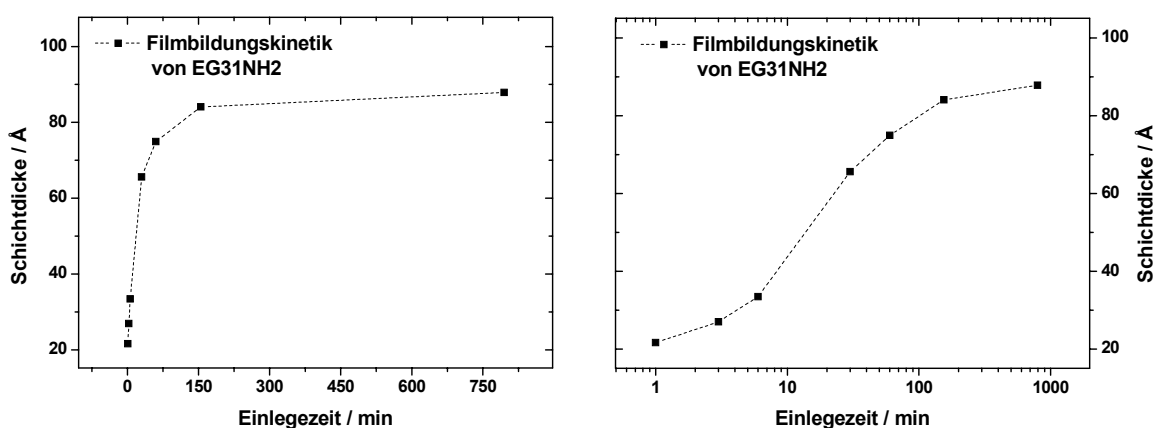


Abb. IV.1.2-1: Links: Abhängigkeit der Schichtdicke von auf Au-bedampften Si-Wafern ausgebildeter EG31NH₂-Monolagen von der Adsorptionszeit; rechts: logarithmische Darstellung.

Die Schichtdicken nehmen innerhalb der ersten Minuten nur geringfügig zu; nach einem Zeitraum von etwa 6 Minuten steigen sie jedoch sprunghaft an. Der erhaltene Verlauf zeigt somit die typischen Merkmale des bereits in der Literatur beschriebenen 2-stufigen Adsorptionsprozesses der polymeren Ethylenglykol-Thiole, bei dem zunächst globuläre Moleküle aus der Lösung adsorbiert werden und bei niedrigen Bedeckungsgraden zu einem amorph geordneten Polymerfilm führen, der anschließend unter einer Zunahme der Bedeckung einen Konformationsübergang in eine gestreckte und helikale Konformation der PEG-Ketten vollzieht. Letzter ist durch eine all-trans-Konformation des Alkanspacers mit einem Tilt-Winkel von 30° zur Oberflächennormalen und senkrecht angeordneter helikaler PEG-Ketten gekennzeichnet (theoretische Schichtdicke 99,4 Å).

Bezüglich der unspezifischen Fibrinogen-Adsorption wurde vermutet, dass diese hauptsächlich auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Endgruppen der Matrix und den adsorbierenden Proteinen beruht. Da der Oberflächenanteil der Aminogruppen mit zunehmendem Bedeckungsgrad ansteigt, sollte die unspezifische Adsorptionsrate einen ähnlichen Verlauf wie der von der Einlegezeit abhängige Bedeckungsgrad aufweisen. Dies wird durch die Abbildungen IV.1.2-2 bestätigt; in der linken Graphik ist sowohl der Bedeckungsgrad als auch die unspezifische Adsorptionsrate gegen die Einlegezeit in einer logarithmischen Form aufgetragen ist.

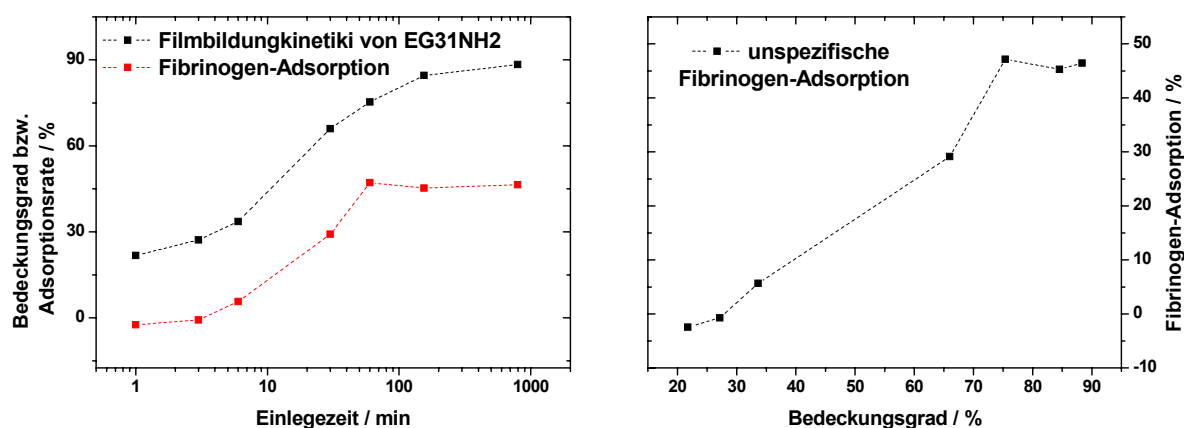


Abb. IV.1.2-2: Links: Bedeckungsgrad und unspezifische Fibrinogen-Adsorptionsrate der nach den verschiedenen Adsorptionszeiten erhaltenen EG31NH₂-Monolagen; rechts: Abhängigkeit der unspezifischen Adsorptionsrate vom Bedeckungsgrad der EG31NH₂-Beschichtungen.

Es ergibt sich tatsächlich ein sehr ähnlicher Verlauf, so dass von einer nahezu proportionalen Beziehung zwischen der Oberflächendichte an funktionellen Gruppen und der Fibrinogen-Adsorption ausgegangen werden kann. Dies wird durch die rechte Graphik der Abbildung IV.1.2-2 bestätigt, in der die unspezifische Adsorptionsrate gegen den Bedeckungsgrad aufgetragen ist und ein nahezu linearer Anstieg erhalten wird. Ab einem Bedeckungsgrad von etwa 70% wird eine maximale Adsorptionsrate erreicht.

Von den Oberflächen wurden außerdem vor und nach der Fibrinogen-Adsorption XP-Spektren aufgenommen.

2.1.2 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

In der Abbildung IV.I.2-3 sind die C1s- und O1s-Spektren dargestellt, welche von den nach verschiedenen Einlegezeiten erhaltenen PEG-Monolagen aufgenommen wurden.

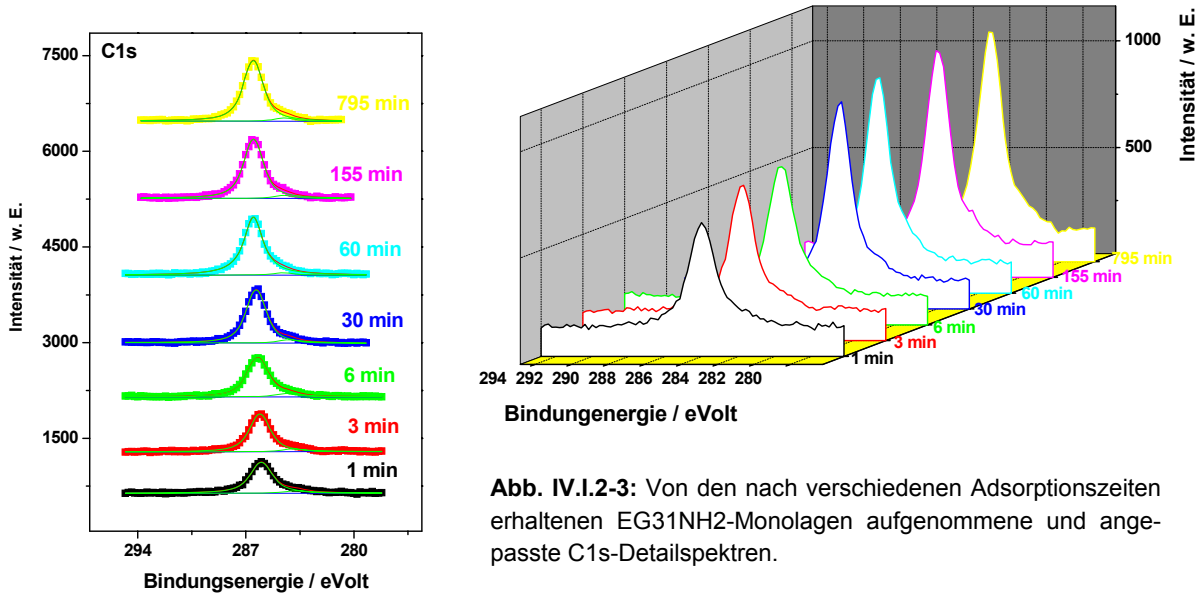


Abb. IV.I.2-3: Von den nach verschiedenen Adsorptionszeiten erhaltenen EG31NH₂-Monolagen aufgenommene und angepasste C1s-Detailspektren.

Die Kohlenstoffe des Alkanspacers werden bei 284,4 eV detektiert; die Ether-C1s-Atome bei 286,5 eV und die Ether-O1s-Atome entsprechen der Signallage bei 532,7 eV.

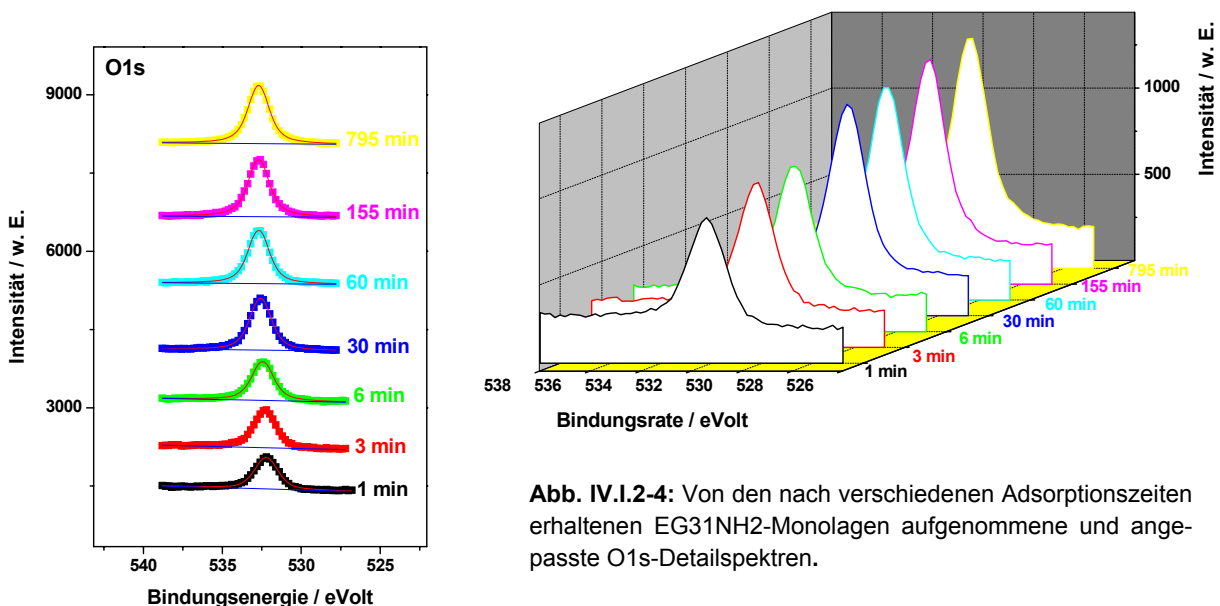


Abb. IV.I.2-4: Von den nach verschiedenen Adsorptionszeiten erhaltenen EG31NH₂-Monolagen aufgenommene und angepasste O1s-Detailspektren.

Mit zunehmender Adsorptionszeit ist ein deutlicher Anstieg der C1- und O1s-Intensität erkennbar, der auf die ansteigende PEG-Bedeckung der Oberfläche zurückgeführt werden

kann; mit dieser ist außerdem auch eine kontinuierliche Abnahme der Au4f-Substratintensität verbunden, deren Verlauf ebenfalls in der Abbildung IV.1.2-5 dargestellt ist.

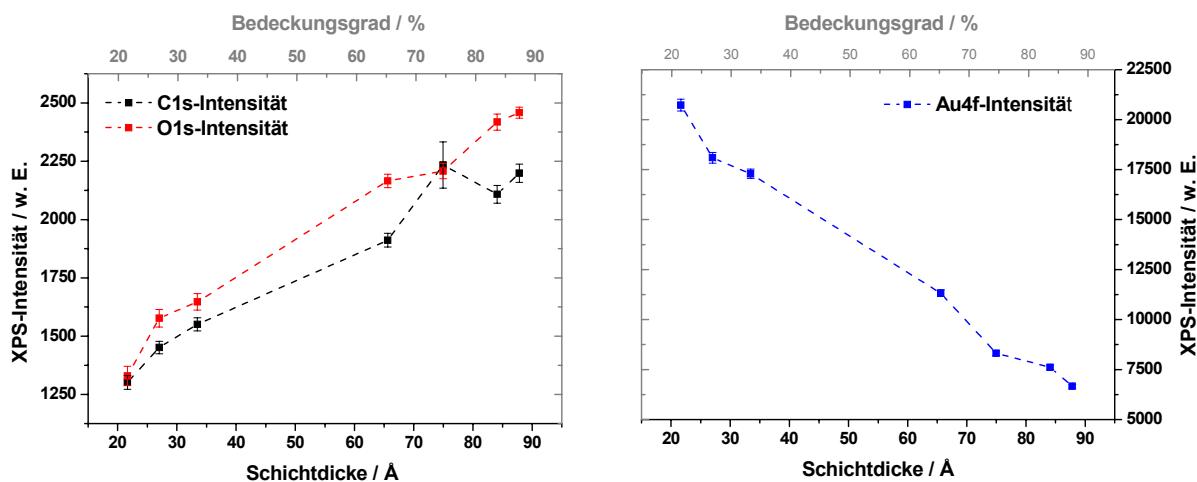


Abb. IV.1.2-5: Abhängigkeit der durch Anpassung der XP-Spektren erhaltenen gesamten C1s- und O1s-Intensität (links) sowie der gesamten Au4f-Intensität (rechts) von der Schichtdicke und dem Bedeckungsgrad der ausgebildeten EG31NH₂-Monolagen.

Die mit der Bedeckung zunehmende Ausrichtung der PEG-Ketten (Orientierung senkrecht zur Oberfläche) sollte auch mit einem Anstieg der N1s-Intensität verbunden sein, da der Anteil der an der Oberfläche gelegenen Amino-Endgruppen zunimmt.

Der Verlauf des bei etwa 400,3 eV detektierten N1s-Signals ist in der Abbildung IV.1.2-6 gezeigt.

Da sich der Stickstoff durch einen nur geringen Wirkungsquerschnitt auszeichnet und die funktionellen Endgruppen zum Teil in der Matrix vergraben und somit abgeschirmt sind, fallen die Signalintensitäten nur sehr gering aus, so dass die Integration dieser Signallage mit einem größeren Fehler verbunden ist. Ein mit zunehmender Adsorptionszeit verbundener Intensitätsanstieg ist jedoch zu erkennen; dieser ist in der Abbildung IV.1.2-6 in Abhängigkeit von der ellipsometrisch ermittelten Schichtdicke graphisch dargestellt.

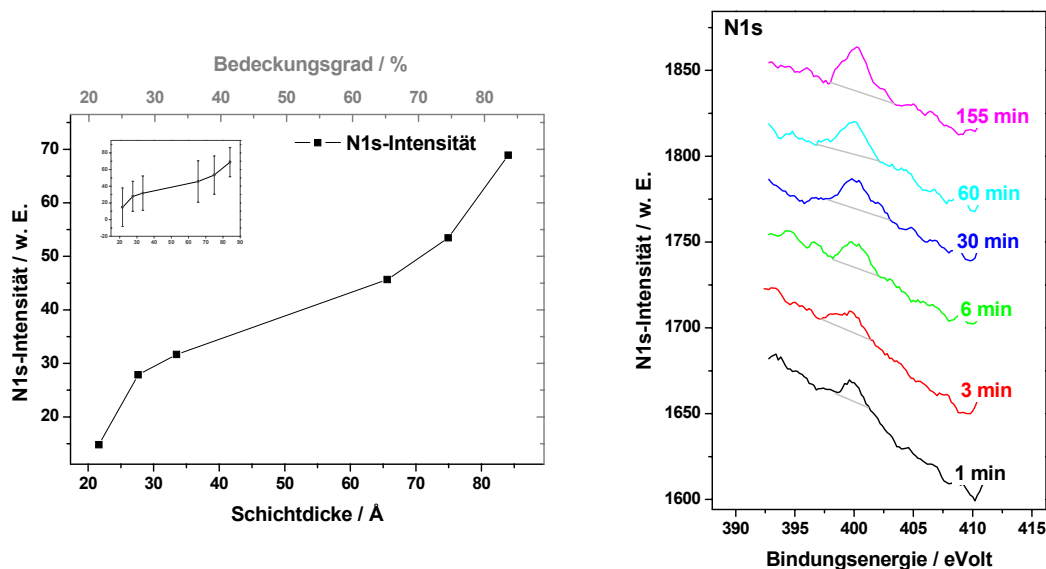


Abb. IV.1.2-6: Links: Abhängigkeit der durch Anpassung der XP-Spektren erhaltenen N1s-Intensität von der Schichtdicke und dem Bedeckungsgrad der ausgebildeten EG31NH₂-Monolagen. Rechts: nach den unterschiedlichen Adsorptionszeiten aufgenommene N1s-Detailspektren.

In der Tabelle IV.1.2-2 ist der durch die Anpassung der Spektren erhaltene Verlauf der Ether-C1s- und O1s- sowie der N1s-Intensität angegeben; außerdem ist das berechnete Ether-C1s/O1s-Verhältnis aufgeführt.

Adsorptionszeit / min	Ether-C1s-Intensität / w. E.	Ether-O1s-Intensität / w. E.	N1s-Intensität / w. E.	Ether-C1s/O1s-Verhältnis
1	1207,2	1329,0	14,80	2,27
3	1344,9	1577,0	27,87	2,13
6	1425,7	1646,9	31,65	2,16
30	1800,8	2165,6	45,65	2,07
60	2144,4	2207,9	53,45	2,42
155	2006,2	2417,8	68,89	2,07
795	2083,5	2458,4		2,11

Tab. IV.1.2-2: XP-Intensitäten der nach den unterschiedlichen Adsorptionszeiten erhaltenen EG31NH₂-Monolagen sowie das sich daraus ergebende Ether-C1s/O1s-Verhältnis.

Die ermittelten Ether-C1s/O1s-Verhältnisse liegen nahe des theoretisch zu erwartenden Sollwerts von 2,03.

Nach dem Kontakt der Oberflächen mit einer Fibrinogen-Lösung wurden ebenfalls XP-Spektren aufgenommen, so dass die unspezifische Proteinadsorption zusätzlich durch das Auftreten der proteintypischen Signallagen nachgewiesen werden konnte.

In der Abbildung IV.I.2-7 sind die nach der Fibrinogen-Behandlung der präparierten Monolagen (Adsorptionszeiten von 3, 6, 30, 155, 795 min) aufgenommenen C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren dargestellt.

Im Fall des C1s-Signals treten zusätzliche Protein-Signale bei 285,0 (C-N) und 288,4 (C=O) eV auf; in den O1s-Spektren ist ein weiteres Signal bei etwa 531,5 (C=O) eV erkennbar.

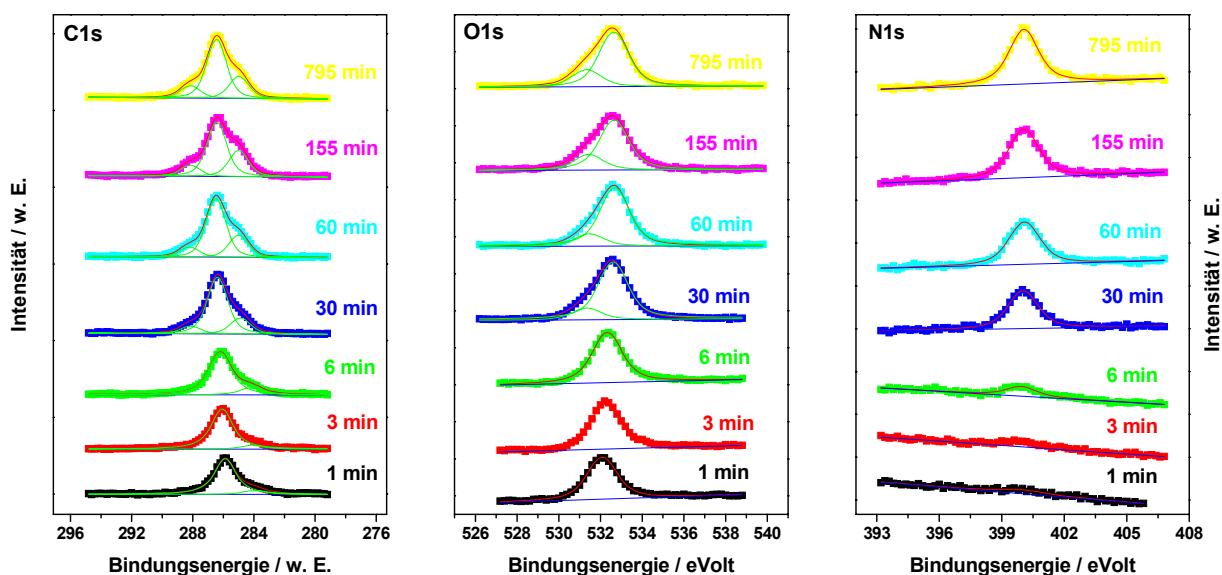


Abb. IV.I.2-7: Nach der Fibrinogen-Behandlung der nach den verschiedenen Adsorptionszeiten erhaltenen EG31NH₂-Monolagen aufgenommene C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren.

Mit zunehmendem Bedeckungsgrad steigt die Signalintensität der auf die Proteine zurückzuführenden C1s- und O1s-Signale an. Ab einer Bedeckung von etwa 66% (Adsorptionszeit von 30 min) sind die proteinspezifischen Signale deutlich zu erkennen; für diese Monolage wurde ellipsometrisch ein durch die Proteinadsorption hervorgerufener Schichtdickenanstieg von etwa 14 Å ermittelt. Die nach einer Adsorptionszeit von 6 min erhaltene Probe (Bedeckungsgrad 33,5 %) zeigte dagegen nur einen Anstieg von etwa 2,7 Å. Während in den C1s- und O1s-Spektren bei diesen Proben noch keine proteintypischen Signale zu erkennen sind, ist in den N1s-Spektren ein kleiner Intensitätsanstieg zu verzeichnen; dieser könnte jedoch teilweise auch auf einen Anstieg der an der Oberfläche gelegenen Aminoendgruppen zurückgeführt werden.

In der Tabelle IV.I.2-3 sind die Intensitäten der auf die Proteine zurückzuführenden C1s-, O1s- und N1s-Intensitäten sowie das durch die Spektrenanpassung (nach der Fibrinogen-Behandlung) erhaltene Ether-C1s/O1s-Verhältnis angegeben.

Adsorptions- zeit / min	Bedeckungs- grad / %	Protein-C1s- Intensität / w. E.	Protein-O1s- Intensität / w. E.	N1s- Intensität / w. E.	Ether- C1s/O1s- Verhältnis
1	21,76	0	0	59,4	2,23
3	27,16	0	0	65,5	2,24
6	33,64	0	0	84,1	2,18
30	65,98	616	356	306,9	2,16
60	75,36	770	367	346,9	2,07
155	84,55	930	480	394,2	2,24
795	88,34	841	494	451,3	2,27

Tab. IV.I.2-3: Die nach dem Fibrinogen-Kontakt der nach den unterschiedlichen Adsorptionszeiten erhaltenen EG31NH₂-Monolagen ermittelten und auf die adsorbierten Proteine zurückzuführenden XP-Intensitäten und das röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelte Ether-C1s/O1s-Verhältnis.

Die ermittelten Ether-C1s/O1s-Verhältnisse stimmen gut mit dem theoretisch zu erwartendem Sollwert (2,03) überein, was für die Gültigkeit der gezeigten Anpassungen und somit auch der ermittelten Protein-Intensitäten spricht. In den Abbildungen IV.I.2-8 ist der Verlauf dieser Signalintensitäten graphisch dargestellt.

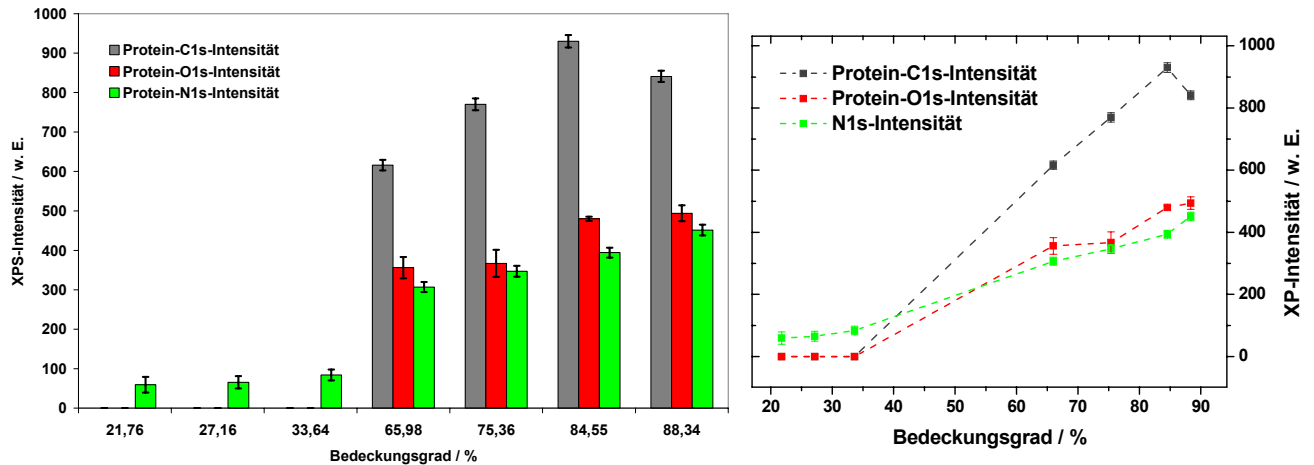


Abb. IV.1.2-8: Abhängigkeit der durch Anpassung der XP-Spektren erhaltenen und auf die Proteine zurückzuführenden C1s-, O1s- und N1s- Intensität vom Bedeckungsgrad der EG31NH2-Monolagen.

Mit zunehmendem Bedeckungsgrad ergibt sich auch anhand der Auswertung der XP-Spektren ein kontinuierlicher Anstieg der unspezifischen Proteinadsorption. Es wird vermutet, dass diese auf die mit dem Bedeckungsgrad zunehmende Oberflächendichte der Aminogruppen zurückzuführen ist, die in den XP-Spektren an einer ansteigenden N1s-Intensität zu erkennen ist.

In der linken Graphik der Abbildung IV.1.2-9 ist der Verlauf der N1s-Intensität (schwarz) sowie der unspezifischen Adsorptionsrate (blau) gegen den Bedeckungsgrad aufgetragen. Im Fall eines Zusammenhanges zwischen der Adsorptionsrate und der Oberflächendichte der Aminogruppen sollte sich hier ein ähnlicher Verlauf ergeben.

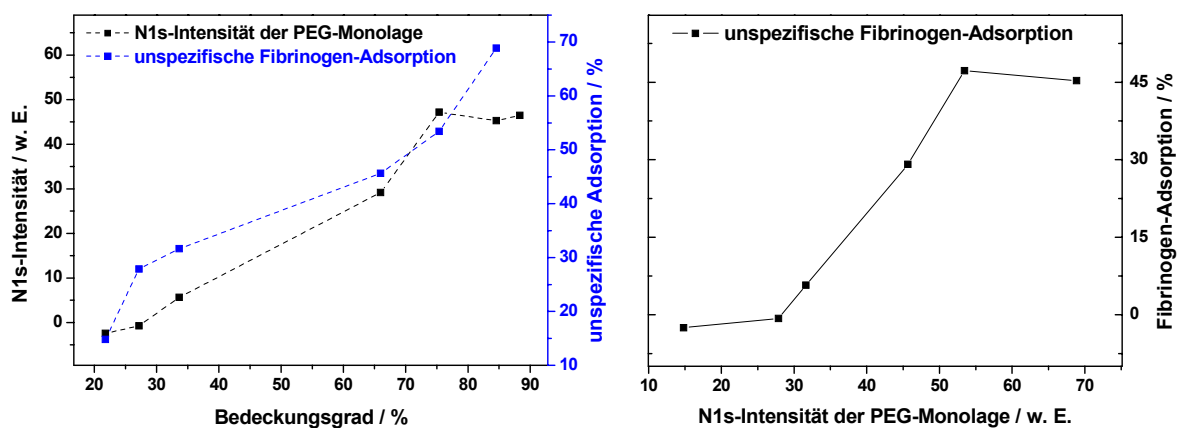


Abb. IV.1.2-9: Links: Abhängigkeit der N1s-Intensität (der unbehandelten PEG-Beschichtungen) und der unspezifischen Adsorptionsrate vom Bedeckungsgrad der EG31NH2-Monolagen. Rechts: Abhängigkeit der Fibrinogen-Adsorption von der N1s-Intensität der unbehandelten EG31NH2-Monolagen.

Der Verlauf beider Kurven zeigt tatsächlich eine Ähnlichkeit, so dass es nahe liegt, die ansteigenden Adsorptionsraten auf eine Wechselwirkung der Proteine mit den funktionellen Endgruppen der verwendeten Beschichtung zurückzuführen.

Die Abweichungen zwischen den Kurven können zum einen auf höhere Ungenauigkeiten in der Bestimmung der N1s-Intensitäten der verwendeten Basisfilme zurückgeführt werden, da diese insgesamt nur sehr gering ausfallen, so dass ihre Integration mit höheren Ungenauigkeiten verbunden ist.

Die rechte Graphik der Abbildung IV.1.2-9 zeigt die mit dem Anstieg der N1s-Intensität der verwendeten Basisfilme verbundene Zunahme der unspezifischen Fibrinogen-Adsorption. Ab einer N1s-Intensität von etwa 20 Einheiten (Bedeckungsgrad 33,6%; Adsorptionszeit 6 min) wird ein sprunghafter Anstieg der unspezifischen Adsorptionsrate beobachtet, der eine mit zunehmender Oberflächendichte an Aminogruppen ansteigende Proteinresistenz nachweist.

Stellvertretend für die carboxyterminierten PEG-Monolagen wurde die Verbindung EG30COOH, die eine ähnliche Kettenlänge wie das in den vorstehend beschriebenen Versuchen verwendete EG31NH₂ besitzt, hinsichtlich ihrer Bedeckungsgrad-abhängigen Protein-Adsorption untersucht.

2.2 Carboxy-terminierte PEG-Beschichtungen

Der Einfluss der über den Bedeckungsgrad kontrollierten Oberflächendichte an Carboxygruppen auf die Proteinresistenz der EG30COOH-terminierten Monolagen wurde auf analoge Weise wie in Abschnitt 2.1 für die aminotermierten PEG-Beschichtungen beschrieben analysiert. Hierzu wurden Au-bedampfte Si-Wafer für unterschiedliche Zeiten in die entsprechende PEG-Thiollösung eingelegt und anschließend ihre Resistenz gegenüber einer unspezifischen Proteinadsorption durch Behandlung mit einer konzentrierten Fibrinogen-Lösung ermittelt.

Die Proteinresistenz-Studien ergaben bereits, dass die Verbindung EG30COOH bei einem Bedeckungsgrad von etwa 82,4% und somit einer relativ hohen Oberflächendichte der Carboxygruppen keine unspezifische Adsorption zeigt. Es ist daher zu erwarten, dass bei einer weiteren Reduktion der Oberflächendichte dieser funktionellen Gruppen (durch eine Herabsetzung des Bedeckungsgrades) kein weiterer Effekt auftreten wird, sofern die PEG-Bedeckung ausreicht, um unspezifische Wechselwirkungen mit dem betreffenden Substrat zu unterdrücken.

2.2.1 Ellipsometrie-Messungen

Die Filmdicken der Substratbeschichtung wurden ellipsometrisch bestimmt. In der Tabelle IV.1.2-4 sind die nach den verschiedenen Adsorptionszeiten erhaltenen Basisfilm-Schichtdicken angegeben. Durch Vergleich mit der für eine vollständig helikal geordnete PEG-Monolage zu erwartenden Schichtdicke (96,9 Å für EG30COOH) konnte auch hier der Bedeckungsgrad ermittelt werden. Die Tabelle enthält außerdem den durch den Fibrinogen-Kontakt hervorgerufenen Schichtdickenanstieg sowie die auf die unspezifische Fibrinogen-Adsorption einer Hexadecanthiolmonolage bezogenen Adsorptionsraten.

<i>Filmbildungskinetik</i>			<i>Fibrinogen-Kontakt</i>	
<i>Adsorptionszeit / min</i>	<i>Schichtdicke / Å</i>	<i>Bedeckungsgrad / %</i>	<i>Schichtdickenanstieg / Å</i>	<i>Adsorptionsrate / %</i>
1	36,3	37,4	-4,26	-8,9
3	37,4	38,6	1,02	2,1
6	39,0	40,2	-2,53	-5,3
10	41,0	42,3	-0,50	-1,0
30	52,0	53,7	-0,73	-1,5
60	71,4	73,6	-2,6	-5,4
182	83,5	86,2	-0,54	-1,1
1098	91,21	94,1	-1,30	-2,7

Tab. IV.1.2-4: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicke, Bedeckungsgrad und unspezifische Fibrinogen-Adsorption der nach den verschiedenen Einlegezeiten erhaltenen EG30COOH-Monolagen.

Mit zunehmender Adsorptionszeit wird ein kontinuierlicher Schichtdickenanstieg festgestellt; im Vergleich zur Filmbildungskinetik des EG31NH₂ liegen die initialen Schichtdicken hier um durchschnittlich etwa 15 Å höher. Beide Moleküle besitzen jedoch eine fast identische Kettenlänge und somit auch einen sehr ähnlichen Flory-Radius; die unterschiedlichen Schichtdicken sind daher in dieser Hinsicht unverständlich und unter Umständen auf bei kurzen Einlegezeiten schlecht reproduzierbare Filmdicken zurückzuführen. Der zwischen den Adsorptionszeiten von 6 und 30 Minuten erhaltene Schichtdickenanstieg beträgt hier somit nur 13 Å (32 Å bei EG31NH₂). Die nach der maximalen Adsorptionszeit erhaltenen Schichtdicken sind jedoch sehr ähnlich. Für EG31NH₂ betrug diese nach einer Adsorptionszeit von 13 Stunden etwa 88 Å; für das EG30COOH ergab sich nach einer Zeit von 18 Stunden eine Schichtdicke von etwa 91 Å, so dass auch hier ein Übergang von einer amorphen und unge-

ordneten PEG-Struktur in eine gestreckte und helikale Konformation der PEG-Ketten vollzogen wird.

Im Gegensatz zur EG31NH₂- zeigt die EG30COOH-Beschichtung jedoch bei jeder der untersuchten Bedeckungen vollständige Proteinresistenz. Anstatt eines Anstiegs führt die Fibrinogen-Behandlung zu einer geringfügigen Schichtdicken-Abnahme; es wird vermutet, dass diese auf eine mit den Waschprozessen verbundene Ablösung der PEG-Matrix zurückgeführt werden kann.

In der Abbildung IV.1.2-10 ist die Filmbildungskinetik der Verbindung EG31NH₂ graphisch dargestellt. Der initiale Filmbildungsprozess lässt sich in einer logarithmischen Form besser analysieren; zum Vergleich ist außerdem die für das EG30COOH erhaltene Filmbildungskinetik mit eingetragen ist.

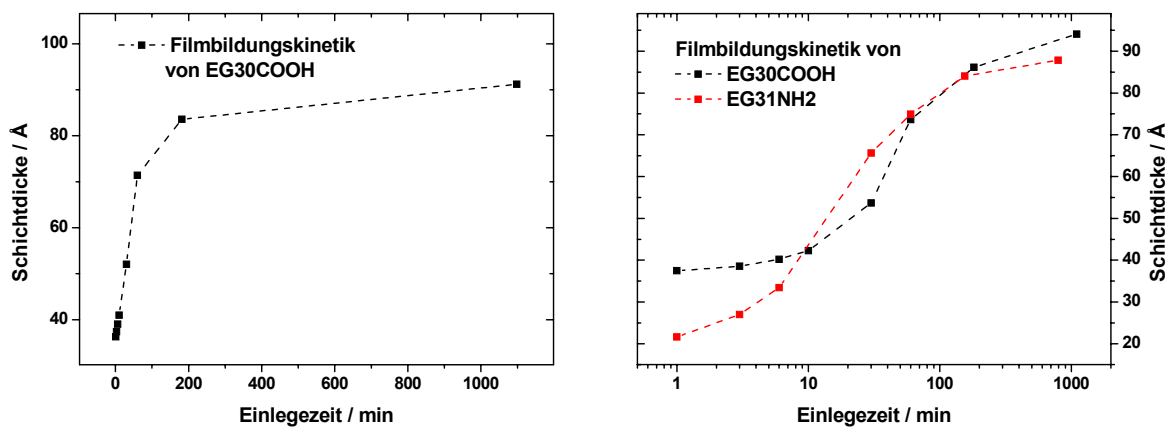


Abb. IV.1.2-10: Links: Abhängigkeit der Schichtdicke der EG30COOH-Monolagen von der Adsorptionszeit. Rechts: logarithmische Darstellung der von den PEG-Thiolen EG30COOH und EG31NH₂ erhaltenen Filmbildungskinetiken (Abhängigkeit der Schichtdicke von der Adsorptionszeit).

Für beide Verbindungen ergeben sich sehr ähnliche Filmbildungskinetiken; die Unterschiede sind hauptsächlich auf den anfänglichen Adsorptionsbereich beschränkt. Wie bereits erläutert, liegen die initialen Schichtdicken des EG30COOH um etwa 15 Å höher (bei etwa 38 Å) als diejenigen des EG31NH₂. Allerdings zeigen sich auch hier die typischen Merkmale eines 2-stufigen Adsorptionsprozesses, bei dem die Adsorption zunächst zu einem amorph geordnetem Polymerfilm führt, der einen allmählichen Übergang in eine helikale Konformation vollzieht. Dieser Prozess beginnt im Fall des EG30COOH jedoch leicht verzögert (nach einer Adsorptionszeit von etwa 10 Minuten) und zeigt dafür einen etwas steileren Verlauf als bei der Verbindung EG31NH₂.

In der Abbildung IV.1.2-11 ist sowohl der Bedeckungsgrad als auch die unspezifische Fibrinogen-Adsorptionsrate gegen die Einlegezeit in einer logarithmischen Form aufgetragen.

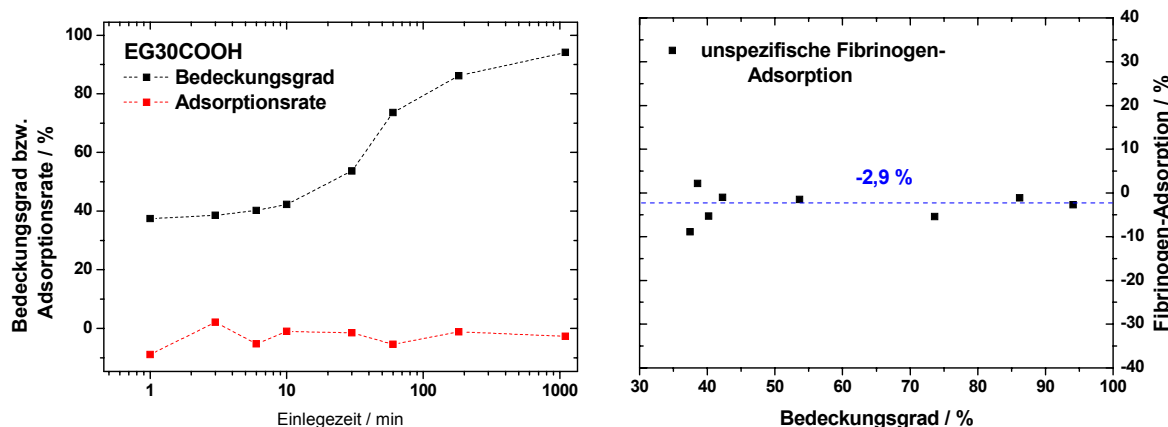


Abb. IV.1.2-11: Links: Bedeckungsgrad und unspezifische Fibrinogen-Adsorptionsrate der nach den verschiedenen Einlegezeiten erhaltenen EG3COOH-Monolagen. Rechts: Abhängigkeit der Fibrinogen-Adsorption vom Bedeckungsgrad der EG3COOH-Monolagen.

Im Fall eines Zusammenhanges zwischen dem Bedeckungsgrad und der unspezifischen Proteinadsorption sollten beide Kurven in dieser Darstellung einen ähnlichen Verlauf zeigen. Stattdessen wird für das EG3COOH jedoch eine nahezu konstante Adsorptionsrate von -2,9% festgestellt, während der Bedeckungsgrad mit der Adsorptionszeit hingegen kontinuierlich ansteigt. Es kann somit gefolgert werden, dass die Oberflächendichte der Carboxygruppen bei dieser Kettenlänge keinen merkbaren Einfluss auf die Proteinresistenz ausübt sowie bei den eingestellten Bedeckungen keine unspezifischen Wechselwirkungen mit dem verwendeten Träger auftreten.

2.3 Gesamtbetrachtung

Anhand der Proteinresistenz-Studien des Abschnitts 1.3 konnte bereits gezeigt werden, dass die EG31NH₂-Beschichtung im Fall einer vorwiegend helikalen Konformation eine relativ hohe unspezifische Fibrinogen-Adsorption aufweist, während die Verbindung EG3COOH hingegen proteinresistent ist. Neben der Kettenlänge, deren Einfluss auf die Proteinresistenz bereits anhand der Bindungs- und Adsorptionsstudien des Abschnitts 1.2 und 1.3 analysiert wurde, übt daher auch die Art der funktionellen Terminierung einen entscheidenden Einfluss auf Proteinresistenz der verwendeten Beschichtung aus.

In den vorstehend beschriebenen Versuchen wurde der Einfluss der über den Bedeckungsgrad kontrollierten Oberflächenkonzentration an funktionellen Endgruppen auf die Proteinresistenz der verwendeten Polyethylenglykolbeschichtungen untersucht. Hierzu wurden unterschiedliche Bedeckungen der Verbindungen EG3COOH und EG31NH₂ eingestellt und

die Beschichtungen durch Behandlung mit einer Fibrinogen-Lösung hinsichtlich ihrer Proteinresistenz untersucht.

Diese Versuche ergaben für die Verbindung EG31NH₂ eine mit dem Bedeckungsgrad ansteigende Proteinadsorption; dagegen zeigte die Verbindung EG30COOH bei keiner der untersuchten PEG-Bedeckungen einen unspezifischen Adsorptionsbeitrag.

Da mit der Zunahme des Bedeckungsgrades infolge der Streckung der PEG-Ketten eine ansteigende Oberflächenkonzentration an funktionellen Gruppen verbunden ist, können die zunehmenden Adsorptionsraten der aminoterminierten Verbindungen auf den Anstieg der Oberflächendichte an Aminogruppen zurückgeführt werden.

In den Abbildungen IV.1.2-12 ist die normierte Fibrinogenadsorption für die beiden COOH- und NH₂-terminierten PEG-Verbindungen in Abhängigkeit von der Oberflächendichte an funktionellen Gruppen dargestellt.

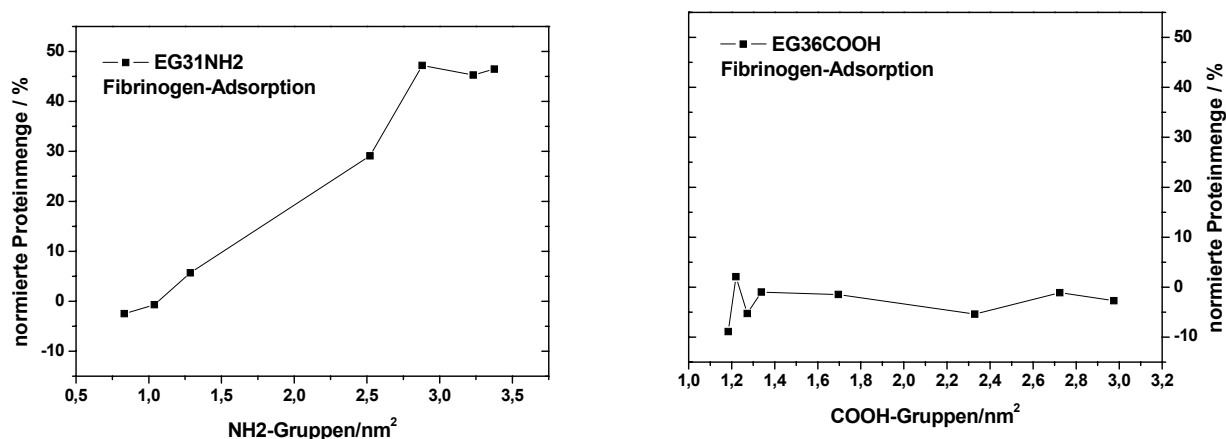


Abb. IV.1.2-12: Links: Abhängigkeit der Fibrinogen-Adsorption von der Oberflächendichte an NH₂-Gruppen (NH₂/cm²). Rechts: Abhängigkeit der Fibrinogen-Adsorption von der Oberflächendichte an COOH-Gruppen (COOH/cm²).

Die Verbindung EG31NH₂ zeigt einen mit der Oberflächenkonzentration der Aminogruppen nahezu proportionalen Anstieg der Proteinadsorption; dies konnte bereits anhand der XP-Messungen gezeigt werden, indem die unspezifisch adsorbierte Fibrinogen-Menge in Abhängigkeit von der N1s-Intensität des Basisfilms aufgetragen wurde (vgl. Abb. IV.1.2-9).

Es wird vermutet wird, dass die unspezifische Adsorption im Fall der Aminoterminierung hauptsächlich auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den in wässriger Lösung in protonierter Form vorliegenden Aminogruppen und den Proteinen zurückgeführt werden kann. Auch in [241] zeigten Allylamin-terminierte PET-Oberflächen sehr hohe Adsorptionsraten (1,26 µg Fibrinogen pro cm²), die jedoch nach einer Umsetzung der Aminogruppen mit Cyanurchlorid erheblich abnahmen (auf 0,84 µg/cm²). Da die Adsorptionsraten der aminoterminierten Oberflächen bei einer Zunahme der Ionenstärke außerdem kontinuierlich redu-

ziert werden konnten, wurden sie in [241] auf elektrostatische Wechselwirkungen mit protonierten Aminogruppen zurückgeführt.

Die hinsichtlich der Kettenlänge vergleichbare Verbindung EG30COOH verhält sich hingegen bei jeder der eingestellten Bedeckungen vollkommen proteinresistent. Da anhand der Proteinresistenzstudien bereits gezeigt werden konnte, dass EG30COOH selbst bei einer hohen Oberflächendichte an COOH-Gruppen keine unspezifische Adsorption aufweist, müssen die erzielten Bedeckungen zudem ausreichend sein, um Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und dem festen Träger zu unterbinden.

Durch Vergleich des hydrodynamischen Volumens R_g [30], [244]

$$R_g = 0,181 \cdot N^{0,58} \quad [\text{nm}] \quad (99)$$

mit dem Abstand zwischen den Ankerpunkten benachbarter Polymerketten D [239], [240]

$$D = \left(\frac{4}{\pi} \cdot \Sigma \right)^{\frac{1}{2}} \quad [\text{nm}] \quad (100)$$

kann über den Parameter $D/2R_g$ nach Abschnitt 2.2.2 des Kapitels II.I ermittelt werden, ob unfunktionalisierte Substratbereiche vorliegen. Hierbei bezeichnet Σ die Dichte der PEG-Ketten pro nm^2 , welche nach [238]

$$\Sigma = \frac{MW \cdot 10^{22}}{\rho \cdot d \cdot N_A} \quad [\text{nm}^{-2}] \quad (101)$$

berechnet werden kann.

Gilt $D/2R_g < 1$, so tritt eine Überlappung der Polymerketten auf und es resultiert eine vollständige Bedeckung der Oberfläche.

Selbst bei den niedrigsten in der Filmbildungskinetik erzielten Schichtdicken (36,3 Å) liegt dieser Wert für EG30COOH erheblich unter dem Schwellwert von 1 (0,36), so dass von einer vollständigen PEG-Bedeckung ausgegangen werden kann. Dies gilt auch für die Verbindung EG31NH₂, für welche dieser Parameter bei der niedrigsten Schichtdicke von 21,6 Å etwa 0,47 beträgt. Demnach kann in den beschriebenen Experimenten eine Protein-Adsorption auf unfunktionalisierten Teilbereichen des festen Trägers ausgeschlossen werden.

Zur Optimierung der Proteinresistenz anhand der Oberflächendichte an funktionellen Gruppen ist deren Variation über den Bedeckungsgrad jedoch eine weniger geeignete Methode, sofern man auch an einer ausreichenden Rezeptor-Funktionalisierung interessiert ist. Ursache ist, dass sich die PEG-Matrix bei niedrigen Bedeckungen in einer amorphen und ungeordneten Struktur befindet, in welcher die Funktionalitäten vergraben und für eine Immobilisierung von Rezeptormolekülen somit nur schwer zugänglich sind. Die beschriebenen Versuche können daher nicht als eine Optimierung der Bindungsrate verstanden werden, son-

den geben ausschließlich Auskunft über den Einfluss der Oberflächenkonzentration an funktionellen Gruppen auf die Proteinresistenz.

Ein geeigneterer Weg wäre eine Adsorption aus binären Mischungen, deren zweite Komponente ein unfunktionalisiertes PEG-Thiol vergleichbarer Kettenlänge darstellt. Allerdings muss auch bei diesem Ansatz noch analysiert werden, ob die betreffende Funktionsdichte eine ausreichende Rezeptor-Funktionalisierung erlaubt.

3 Integration von Peptid-Assays

Neben einer Integration von Antikörpern wurden die aminotermienden PEG-Matrizen auch zu einer Integration von Peptidepitopen verwendet. Unter anderem wurde die Verbindung EG31NH₂ benutzt, für welche in den Antikörper-Bindungsstudien bereits hohe Kopplungsraten festgestellt wurden und die in diesem Rezeptor-funktionalisierten Zustand keine un-spezifische Adsorption zeigte.

3.1 EG31NH₂-terminierte Oberflächen

In der Abbildung IV.I.3-1 sind die zur Integration der Peptidassay durchgeführten Funktionalisierungsschritte schematisch dargestellt.

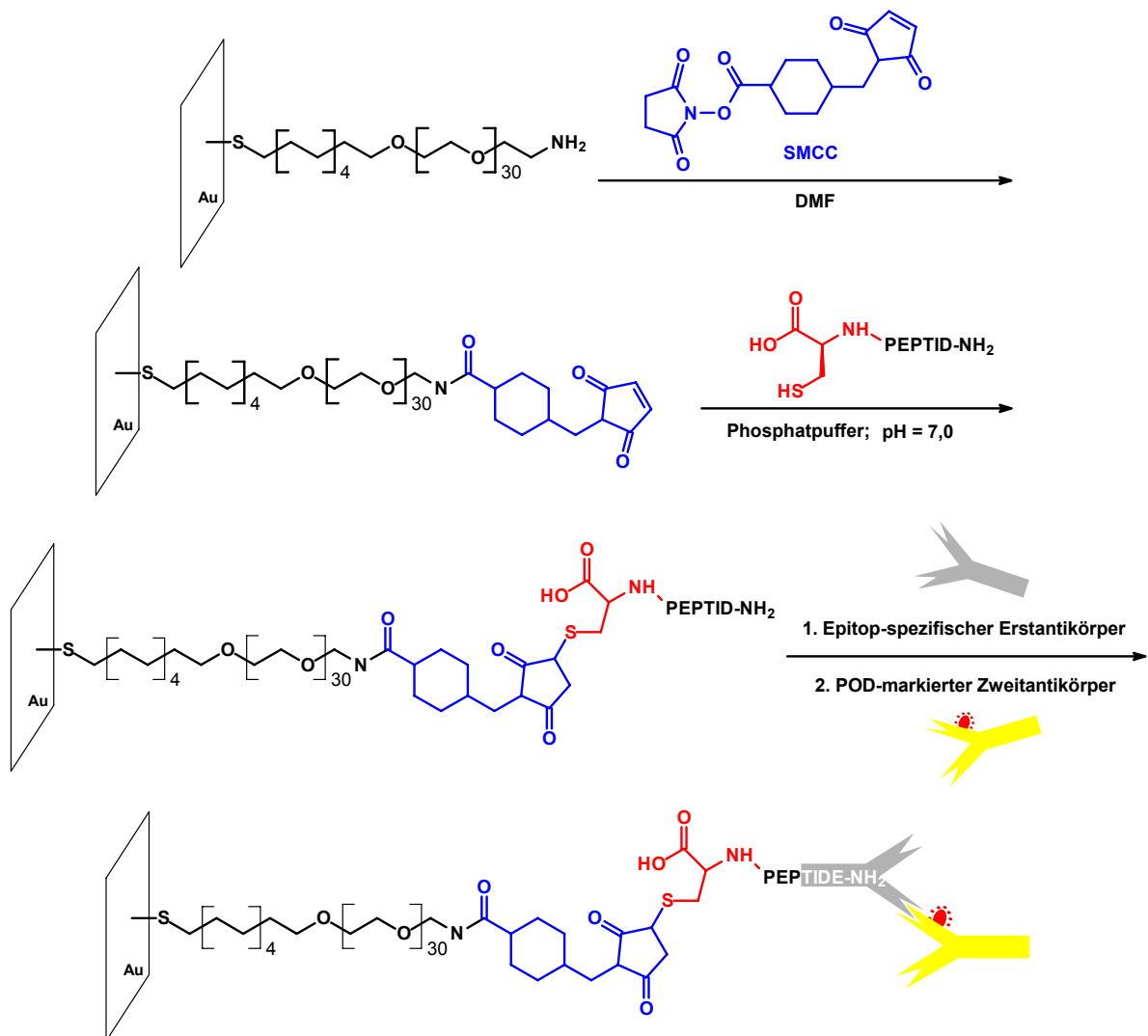


Abb. IV.I.3-1: Schematische Darstellung der zur Integration von Peptidepitopen genutzten Reaktionsschritte sowie der folgenden Umsetzung mit dem epitop-spezifischen und dem markierten Zweitantikörper.

Das PEG-Thiol EG31NH₂ wurde unter Ausbildung selbst-ordnender Monolagen auf Au-be-dampften Si-Wafern adsorbiert. Die anschließende Einführung des Linkermoleküls SMCC ermöglicht die kovalente Bindung von Peptidsequenzen mit carboxyterminalem Cysteinrest durch Addition der freien Thiolgruppe an die Maleimido-Funktion dieses Linkers. Es wurden zwei unterschiedliche Peptidsequenzen verwendet; bei der als Epitop 2 bezeichneten Sequenz handelt es sich um ein Dekapeptid mit folgender Aminosäuresequenz:



Dieses Peptidepitop wird auch als HA-Epitop bezeichnet. Die unter der Bezeichnung Epitop 5 verwendete Peptidsequenz stellt ein Nonapeptid folgender Sequenz dar:



es wird auch als Flag-Epitop bezeichnet.

Beide Peptidsequenzen können durch bestimmte Antikörper spezifisch erkannt werden. Im Fall des Epitops 2 ist dies der anti-HA-Antikörper; für das Epitop 5 der anti-Flag-Antikörper; die verwendeten Epitop-spezifischen Erstantikörper entstammen beide der Maus. Um das Messsignal zu verstärken, wurde mit einem markierten Zweitantikörper (anti-Maus-IgG) umgesetzt, der wiederum den immobilisierten Erstantikörper bindet. Bei den verwendeten Zweitantikörpern handelt sich um POD-markierte Konjugate, so dass dieser Bindungsschritt mittels eines Festphasen ELISAs nachgewiesen und quantifiziert werden konnte.

Die in der Abbildung IV.1.3-1 gezeigten Umsetzungsschritte wurden mittels FT-IR- und XP-Messungen analysiert; die Schichtdicken der Adsorbatlagen wurden ellipsometrisch bestimmt.

3.1.1 FT-IR-Messungen

In den Abbildungen IV.I.3-2 und -3 sind die FT-IR-Spektren gezeigt, welche nach der Funktionalisierung der Oberflächen mit dem PEG-Thiol EG31NH₂, der Einführung des Linkers SMCC sowie der Integration der Peptidepitope und der Umsetzung mit den Antikörpern aufgenommen wurden.

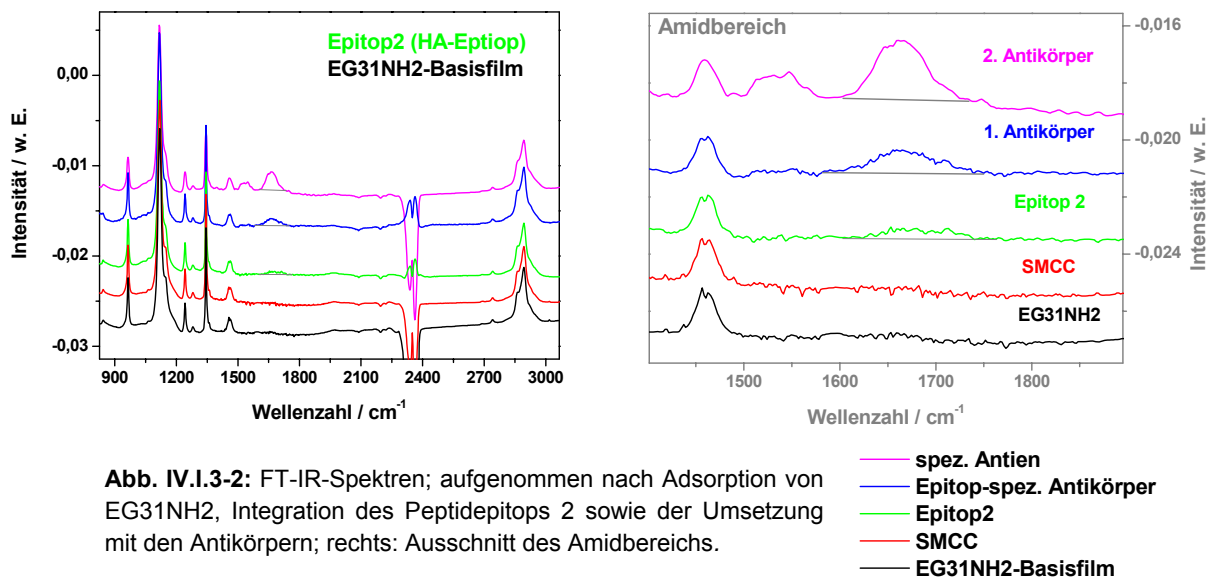


Abb. IV.I.3-2: FT-IR-Spektren; aufgenommen nach Adsorption von EG31NH₂, Integration des Peptidepitops 2 sowie der Umsetzung mit den Antikörpern; rechts: Ausschnitt des Amidbereichs.

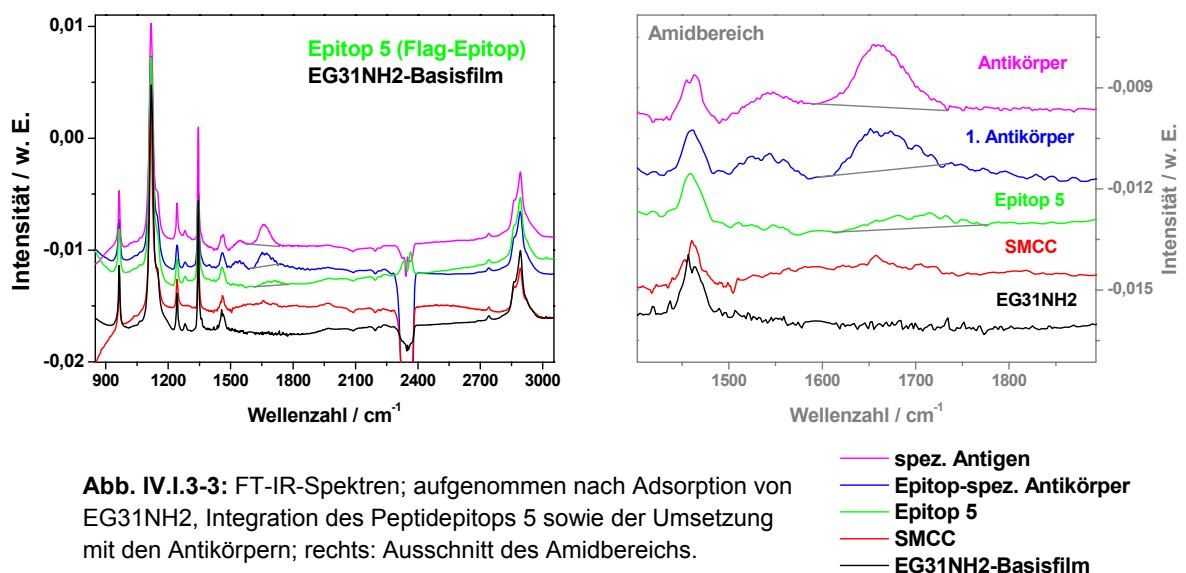


Abb. IV.I.3-3: FT-IR-Spektren; aufgenommen nach Adsorption von EG31NH₂, Integration des Peptidepitops 5 sowie der Umsetzung mit den Antikörpern; rechts: Ausschnitt des Amidbereichs.

In den FT-IR-Spektren sind die für eine kristalline PEG-Modifikation charakteristischen Schwingungsmoden deutlich zu erkennen (s. Abschnitt 1.2.1.1). Der Fingerprint-Bereich ist durch die starke und schmale Resonanz der COC-Streckschwingung bei 1118 cm⁻¹ und die CH₂-wagging-mode bei 1345 cm⁻¹ gekennzeichnet. Im CH-Streckschwingbereich ist außerdem eine starke Absorptionslinie bei 2890 cm⁻¹ erkennbar, die der symmetrischen Streck-

schwingung der CH₂-Einheiten zuzuordnen ist. Es kann daher von einer gestreckten und vorwiegend helikalen Konformation der PEG-Ketten ausgegangen werden, was durch die relativ hohen, ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken zusätzlich bestätigt wird.

Die Einführung des Linkermoleküls SMCC ist mit keiner merklichen Veränderung in den FT-IR-Spektren verbunden. Nach der kovalenten Fixierung der Peptidepitope treten jedoch bei etwa 1540 und 1660 cm⁻¹ die auf die C=O-Schwingung der Amidfunktion zurückzuführenden Amid-I- und -II-Banden auf. Nach der Umsetzung mit den Antikörpern steigt die Intensität dieser Absorptionslinien erheblich an. Zur Quantifizierung dieser Bio-Funktionalisierungen wurde die Amid-I-Bande unter Anwendung eines linearen Untergrundabzuges integriert. In der Abbildung IV.I.3-4 ist der auf diese Weise erhaltene Intensitätsverlauf graphisch dargestellt.

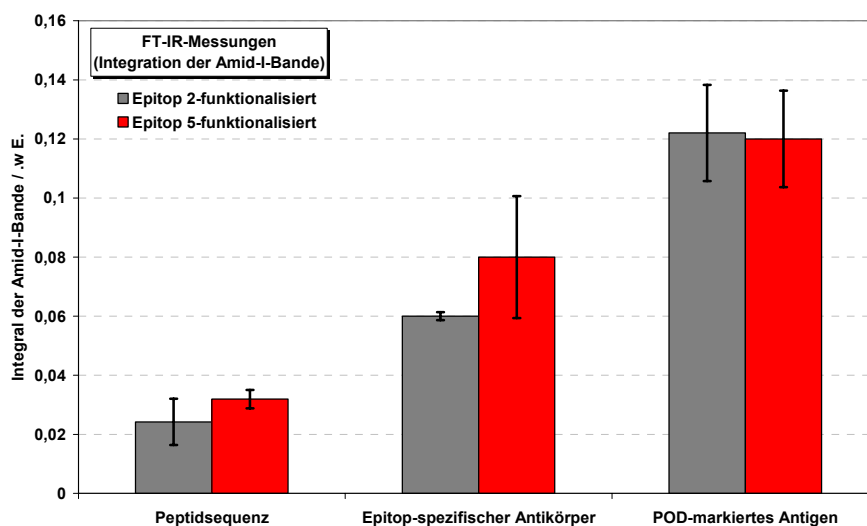


Abb. IV.I.3-4:

Intensitätsverlauf der Amid-I-Bande für die in den Peptidassays unter Verwendung von Epitop2 und Epitop5 durchgeführten Kopplungsreaktionen (Bindung des Peptidepitops, Umsetzung mit dem Epitop-spezifischen und dem POD-markierten Zweitantikörper).

Sowohl bei Verwendung von Epitop 2 als auch von Epitop 5 ist in den einzelnen Erkennungsschritten ein kontinuierlicher Intensitätsanstieg der Amid-I-Bande zu verzeichnen, so dass von den in der Abbildung IV.I.3-1 dargestellten Umsetzungen ausgegangen werden kann. Die Integration des Flag-Epitops (Peptidepitops 5) und die anschließende Umsetzung mit dem Epitop5-spezifischen Erstantikörper führen zu einem etwas höheren Anstieg der Amid-I-Intensität als im Fall des HA-Epitops.

3.1.2 Ellipsometrie-Messungen

Die Schichtdicke der Adsorbatlagen wurde ellipsometrisch bestimmt. Die Schichtdicke der nach der Adsorption des PEG-Thiols EG31NH₂ erhaltenen Monolagen betrug durchschnittlich etwa 89,9 Å. Durch Bezug auf der für einen vollständig helikal geordneten PEG-Film zu erwartenden Schichtdicke (99,7 Å), dessen Bedeckungsgrad zu 100% gesetzt wird, ergibt sich somit ein Bedeckungsgrad von 90,1%. Aufgrund dieser hohen Belegungsdichte kann von einer gestreckten Anordnung der PEG-Ketten und einer vorwiegend kristallinen PEG-Modifikation ausgegangen werden; dies konnte bereits anhand der in den FT-IR-Spektren auftretenden Schwingungsmoden gezeigt werden.

In der Tabelle IV.I.3-1 sind die für die beiden Kopplungsreihen (Verwendung von Epitop 2 und 5) erhaltenen Schichtdicken angegeben.

<i>Umsetzungsstufe</i>	<i>Epitop2-funktio- nalisiert</i>	<i>Epitop5- funktionalisiert</i>
EG31NH₂	88,49	90,15
SMCC-Linker	91,74	92,33
Peptidsequenz	94,54	96,23
Epitop-spezifischer Antikörper	101,04	103,73
POD-markierter Zweitantikörper	110,54	110,73

Tab. IV.I.3-1: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken der unter Verwendung von Epitop2 und 5 in den Peptidassays durchgeführten Umsetzungsschritte.

Der mit den einzelnen Umsetzungsschritten verbundene Schichtdickenanstieg ist in der Abbildung IV.I.3-5 schematisch dargestellt.

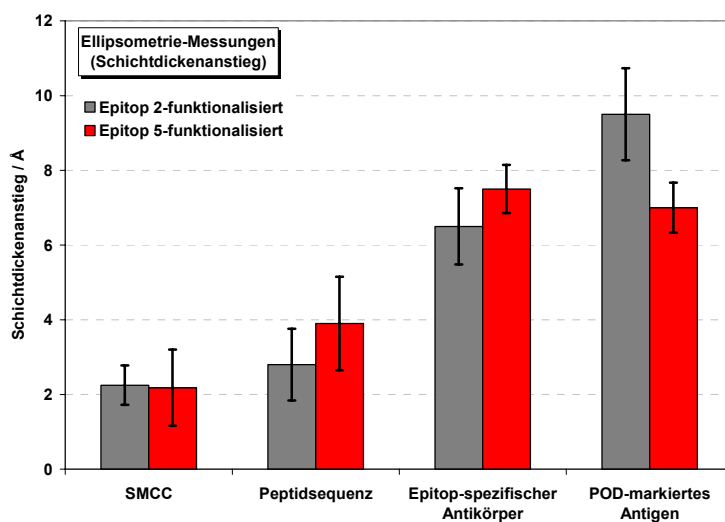


Abb. IV.I.3-5: Verlauf der ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken für die in den Peptidassays unter Verwendung von Epitop2 und Epitop5 durchgeführten Kopplungsreaktionen (Bindung des Peptidepitops, Umsetzung mit dem Epitop-spezifischen und dem POD-markierten Zweitantikörper).

Die Einführung des Linkermoleküls ist mit einem mittleren Schichtdickenanstieg von etwa 2,2 Å verbunden.

Die Bindung der Epitope führt zu einem mittleren Schichtdickenanstieg von etwa 3,4 Å; nach Umsetzung mit dem ersten Antikörper steigt die Schichtdicke um durchschnittlich 7,0 und nach dem Zweitantikörper um weitere 8,3 Å an. Verglichen mit der Immobilisierung der verhältnismäßig viel größeren IgG-Moleküle (Molekulargewicht von Epitop2 = 1221 g/mol und von Epitop5 = 1132 g/mol; Molgewicht eines IgG-Moleküls = 150 – 170.000 g/mol) führt die Bindung der Peptidepitope somit zu einem sehr hohen Schichtdickenanstieg. Die Bindungsrate der Peptide liegt demnach sehr viel höher als diejenige der Antikörper, was hauptsächlich auf die zwei folgenden Sachverhalte zurückgeführt werden kann. Zum einen ist die unterschiedliche Art der Bindung zu berücksichtigen; die Peptidepitope werden kovalent fixiert und ihre Bindung ist im Gegensatz zu derer der Antikörper auf keinerlei Spezifität zueinander passender Komplementär-Regionen angewiesen. Weiterhin ist zu beachten, dass die Umsetzungen an einer Polymermatrix mit einer amorphen Oberflächenstruktur erfolgen, so dass die Zugänglichkeit der in der Matrix eingebetteten Peptidrezeptoren für die makromolekularen Antikörper wesentlich beeinträchtigt ist. Die geringeren Umsetzungsraten der Antikörper sind daher zum einen auf die Spezifität dieses Bindungsprozesses und die sterischen Anforderungen der Kopplungsreaktion zurückzuführen.

Die Effektivität der beschriebenen Biofunktionalisierungen konnte zudem durch die Verwendung Peroxidase-markierter Zweitantikörper mittels eines Festphasen ELISAs ermittelt werden.

3.1.3 Enzymkinetische ELISA-Messungen

In der Abbildung IV.1.3-6 ist der zeitabhängige Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS dargestellt, welcher nach der Behandlung der Epitop2- und Epi-top5-funktionalisierten Oberflächen mit dem jeweiligen POD-markierten Antikörper erhalten wurde.

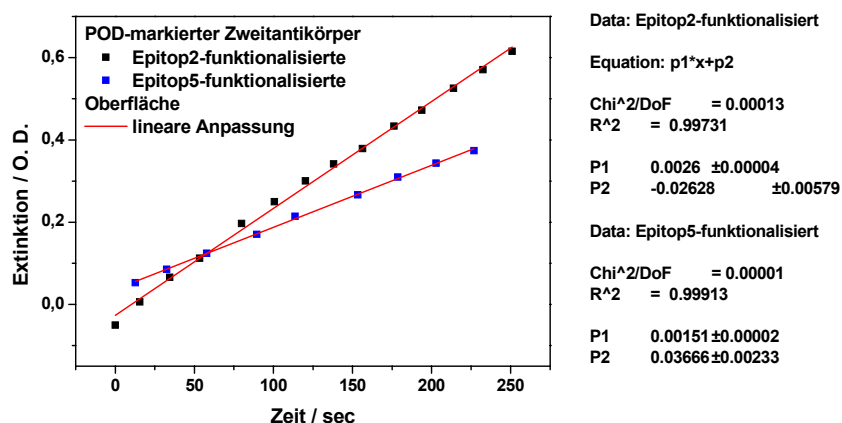


Abb. IV.1.3-6:

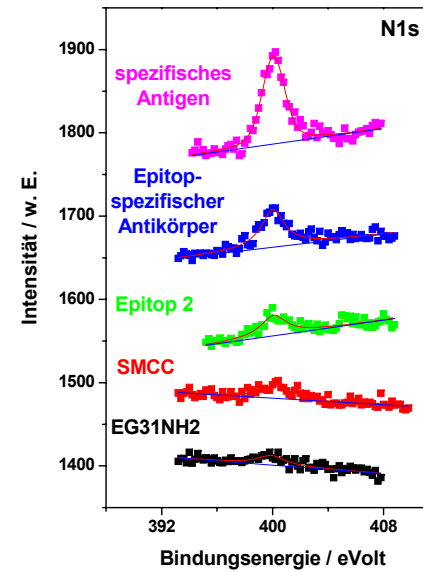
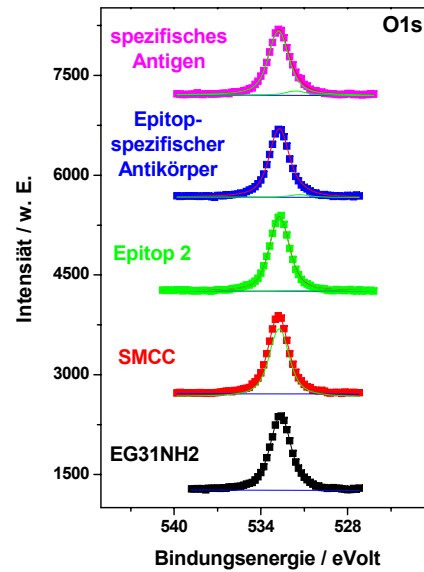
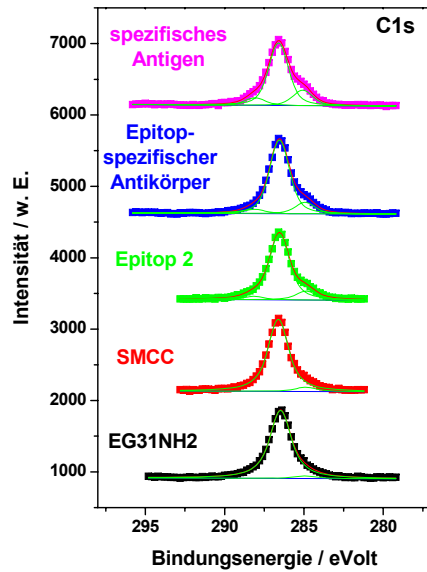
Nach Bindung des POD-markierten Zweitantikörpers an die Epi-top2- und 5-funktionalisierten Oberflächen durchgeführte ELISA-Messungen; UV/Vis-spektroskopisch detektierter Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS.

In beiden Fällen ist ein deutlicher Konzentrationsanstieg zu erkennen, so dass von spezifischer Bindung der markierten Antigene an die Rezeptor-funktionalisierten Oberflächen ausgegangen werden kann. Für die Bindung an Epi-top2 wurde auf diese Weise eine Antikörper-Massenbelegung von 26,2 ng/cm² ermittelt; für Epi-top5 beträgt die Massenbelegung des Zweitantikörpers durchschnittlich 16,9 ng/cm². Diese Werte stimmen qualitativ mit den anhand der Ellipsometrie- und FT-IR-Messungen erhaltenen Ergebnissen überein, die ebenfalls für eine Epi-top-2-funktionalisierte Oberfläche eine höhere Zweitantikörper-Bindungsrate ergaben.

Die einzelnen Umsetzungsschritte wurden außerdem röntgenphotoelektronenspektroskopisch charakterisiert.

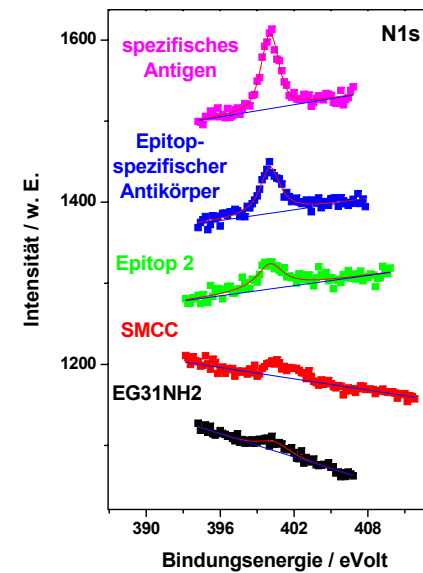
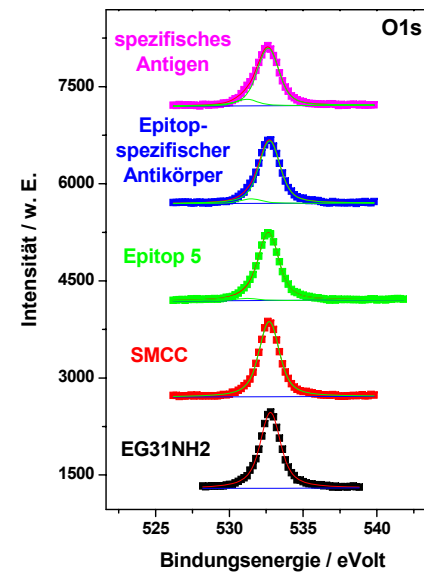
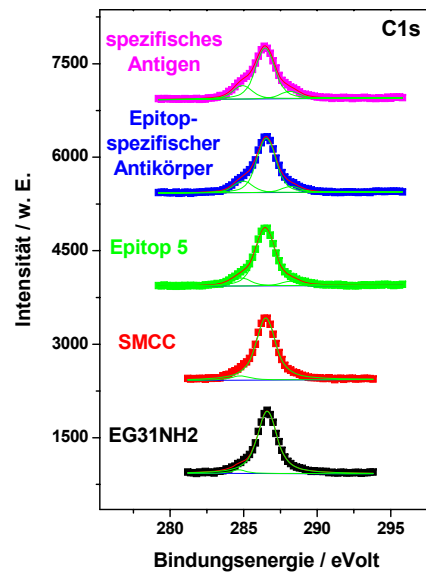
3.1.4 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

In den Abbildungen IV.1.3-7 und -8 sind die C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren dargestellt, welche von den an einer Epi-top2- und Epi-top5-funktionalisierten PEG-Matrix erhaltenen Kopplungsstufen (s. Abb. IV.1.3-1) aufgenommen wurden.



Peptidepitop 2 HOOC-C-AYDPVDYPY-NH₂

Abb. IV.I.3-7:
C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren der in den Peptidassays unter Verwendung von Epitop2 durchgeführten Kopplungsreaktionen.



Peptidepitop 5 HOOC-C-KDDDDKYD-NH₂

Abb. IV.I.3-8:
C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren der in den Peptidassays unter Verwendung von Epitop5 durchgeführten Kopplungsreaktionen.

Nach der Beschichtung der Oberflächen mit dem PEG-Thiol EG31NH₂ treten im C1s-Bereich Signale bei 284,4 und 286,5 eV auf, die den Kohlenstoffen des Alkanspacers und den Ether-C1s-Atomen zugeordnet werden können. Die Ether-Sauerstoffatome führen zu einer Signallage bei 532,7 eV. In den N1s-Detailspektren ist ebenfalls ein schwaches Signal bei etwa 400,3 eV zu erkennen, das auf die Aminoendgruppen des verwendeten Basisfilms zurückzuführen ist. Die schwache Intensität dieser Resonanz ist zum einen auf den geringen Wirkungsquerschnitt des Stickstoffs zurückzuführen; zudem befinden sich die funktionellen Endgruppen nicht direkt an der Oberfläche, sondern sind teilweise in der amorphen Oberflächenstruktur der PEG-Matrix vergraben und somit abgeschirmt.

Die Einführung des Linkermoleküls SMCC führt zu einer Zunahme der Alkylintensität. Bei der unter Verwendung von Epitop 2 durchgeführten Messreihe wurde ein Anstieg von etwa 47 Einheiten auf eine Intensität von insgesamt 134 Einheiten festgestellt; in der für Epitop 5 durchgeführten Kopplungsreihe betrug der Anstieg ebenfalls etwa 49 Einheiten.

Die Bindung der Peptide und Antikörper führt wie beschrieben zum Auftreten zusätzlicher Signallagen in den C1s- und O1s-Spektren und ist mit einer Zunahme der N1s-Intensität verbunden, so dass diese Bindungsprozesse qualitativ auch anhand ihrer XP-Spektren analysiert werden können.

Nach der Bindung der Peptidepitope sind bereits die auf die C-N und C=O-gebundenen Kohlenstoffe zurückzuführenden XP-Signale bei 285,1 und 287,8 eV erkennbar. In den O1s-Detailspektren tritt ebenfalls eine Schulter bei etwa 531,7 eV auf, die den C=O-gebundenen Sauerstoffatomen zuzuordnen ist; ein kleiner Anstieg der N1s-Intensität ist nach diesem Schritt ebenfalls zu verzeichnen. Die Bindung des Epitop-spezifischen und des POD-markierten Zweitantikörpers führt zu einem weiteren Anstieg dieser proteintypischen Signallagen.

In der Abbildung IV.1.3-9 ist der für die einzelnen Umsetzungsschritte erhaltene Verlauf der N1s-Intensität graphisch dargestellt.

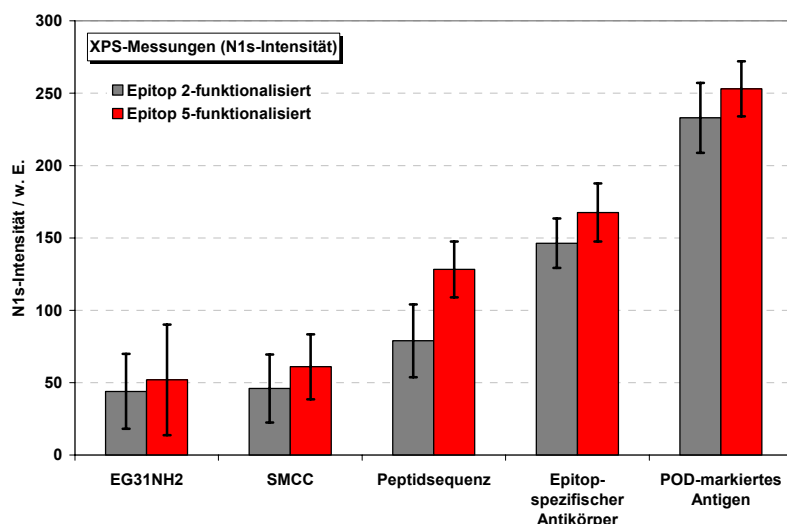


Abb. IV.1.3-9: Verlauf der N1s-Intensität für die in den Peptidassays unter Verwendung von Epitop2 und Epitop5 durchgeführten Kopplungsreaktionen (Bindung des Peptidepitops, Umsetzung mit dem Epitopspezifischen und dem POD-markierten Zweitantikörper).

Dieser zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem anhand der Ellipsometrie-Messungen erhaltenen Bindungsverlauf (vgl. Abb. IV.1.3-5). Bereits nach der Einführung der Peptidepitope ist in beiden Kopplungsreihen ein Anstieg der N1s-Intensität erkennbar. Verglichen mit dem nach Einführung der makromolekularen Antikörper erhaltenen N1s-Anstieg fällt dieser sehr groß aus. Analog zu den Ellipsometrie-Messungen kann daher auch hier gefolgert werden, dass die Umsatzrate der Peptidepitope wesentlich höher liegt als diejenige der Antikörper. Mögliche Ursachen für die abweichenden Bindungsraten sind zum einen die unterschiedliche Art der Immobilisierung (biomolekularer Erkennungsschritt anstatt einer kovalenten Fixierung) als auch die mit diesem Schritt verbundenen sterischen Ansprüche.

Die Auswertung des auf die Proteine zurückzuführenden Intensitätsverlaufs der Kohlenstoff- und Sauerstoffsignale führt jedoch zu größeren Abweichungen von dem anhand der anderen Analysemethoden erhaltenen Bindungsverlauf. Es wird vermutet, dass dies vor allem auf mit der Spektrenanpassung verbundene Ungenauigkeiten zurückgeführt werden kann, die besonders im Bereich niedrigerer Bindungsraten ausgeprägter sind.

Im Fall des N1s-Signals ist eine Anpassung mehrerer Signallagen zur Eliminierung von Beiträgen des Basisfilms jedoch nicht erforderlich. Obwohl der Verlauf der Signalintensität infolge der schichtdickenabhängigen Signalabschwächung nicht quantitativ interpretiert werden kann und die Aminoterminierung des verwendeten Basisfilms bereits einen inhärenten N1s-Beitrag leistet, zeigt dieser jedoch eine gute Übereinstimmung mit dem anhand der FT-IR- und Ellipsometrie-Messungen erhaltenen Bindungsverlauf.

3.2 Fazit zur Integration von Peptid-Assays

Anhand der vorstehend beschriebenen Versuche konnte gezeigt werden, dass die hinsichtlich ihrer Proteinresistenz bereits eingehend untersuchten aminoterminierten PEG-Beschichtungen neben einer Funktionalisierung mit Antikörpern auch zu einer Integration von Peptidassays eingesetzt werden können.

Für die verwendeten Peptidsequenzen konnten an einer EG31NH₂-funktionalisierten Oberfläche hohe Kopplungsraten erzielt werden; mittels unterschiedlicher Analysemethoden (FT-IR-, XPS-Spektroskopie, Ellipsometrie, ELISA) wurde zudem unabhängig voneinander gezeigt, dass die in die PEG-Matrix integrierten Peptidepitope auch spezifisch durch die jeweiligen Antikörper erkannt und gebunden werden. Die im Vergleich zu der Peptidbindung niedrigere Kopplungsrate der Antikörper kann zum einen auf die unterschiedliche Art der Fixierung (biomolekulare Erkennung von Komplementärregionen) und die für eine Bindung dieser Makromoleküle an einer Polymermatrix auftretenden sterischen Hinderungen zurückgeführt werden.

Um die Aussagekraft der mittels der unterschiedlichen Analysemethoden erhaltenen Ergebnisse besser beurteilen zu können, wurde der für die einzelnen Umsetzungen ermittelte Anstieg (XPS: Anstieg der N1s-Intensität; Ellipsometrie: Schichtdickenanstieg; FT-IR: Intensitätsanstieg der Amid-I-Bande) auf den für den Zweitantikörper ermittelten Betrag normiert. Die erhaltenen Ergebnisse sind für beide Kopplungsreihen in den Diagrammen der Abbildung IV.I.3-10 dargestellt.

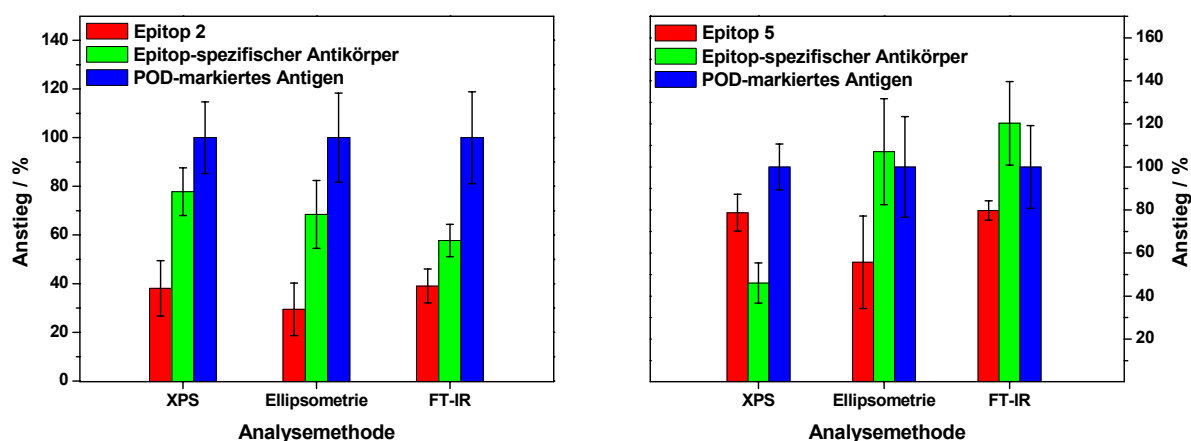


Abb. IV.I.3-10: Vergleich des mittels der verschiedenen Analyse-Methoden (XPS, Ellipsometrie, FT-IR) erhaltenen Bindungsverlaufs für die in den Peptidassays unter Verwendung von Epitop2 (links) und Epitop5 (rechts) durchgeführten Kopplungsreaktionen.

Für die unter Verwendung von Epitop2 durchgeführte Kopplungsreihe wird eine sehr gute Übereinstimmung der mittels der unterschiedlichen Methoden erhaltenen Bindungsverläufe festgestellt; insbesondere die anhand der FT-IR- und Ellipsometrie-Messungen erhaltenen Ergebnisse stimmen sehr gut überein. Die maximale prozentuale Abweichung zwischen den Ergebnissen der einzelnen Analysemethoden beträgt in dieser normierten Darstellung etwa 20%.

Für die an einer Epitop5-funktionalisierten Oberfläche durchgeführten Umsetzungen werden jedoch größere Abweichungen im Fall der XP-basierenden Werte festgestellt (Maximal-Abweichung 74%). Eine gute Übereinstimmung besteht jedoch auch hier zwischen den anhand der FT-IR- und Ellipsometrie-Messungen erhaltenen Werten; die Maximalabweichung der mittels dieser beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse beträgt nur 24%.

Insgesamt kann daher gefolgert werden, dass die beschriebenen aminoterminalen PEG-Beschichtungen eine geeignete Matrix zur Immobilisierung von Rezeptoren für immundiagnostische Anwendungen darstellen.

Sowohl die Fixierung der Epitope als auch deren Erkennung durch die Antikörper konnte mittels unterschiedlicher Methoden nachgewiesen werden. Infolge der Proteinresistenz der verwendeten PEG-Beschichtung (s. Abschnitt 1.2.2) ist weiterhin gesichert, dass keine un-

spezifische Adsorption stattfindet und die detektierten Bindungsprozesse eindeutig auf biospezifische Umsetzungen zurückgeführt werden können.

Zur Charakterisierung und Quantifizierung dieser Umsetzungen kann wie beschrieben die FT-IR-Spektroskopie und eine ellipsometrische Schichtdickenbestimmung eingesetzt werden; die maximale Abweichung der mittels dieser beiden Methoden erhaltenen Ergebnisse liegt bei etwa 20 – 25%; eine qualitative Interpretation der Bindungsprozesse kann ebenfalls anhand von Röntgenphotoelektronenspektren erfolgen.

4 Einfluss des gelösten Gases in der Adsorptionslösung auf die Filmbildungskinetik

Um den Einfluss des Gaszusatzes in der Adsorptionslösung sowie der Kettenlänge der PEG-thiole auf die Geschwindigkeit des Ordnungsprozesses der PEG-Ketten zu analysieren, wurden ihre Filmbildungskinetiken durch eine ellipsometrische Schichtdickenbestimmung bei Adsorption aus Lösungen, die mit unterschiedlichen Gasen gesättigt wurden, analysiert.

4.1 Bisheriger Kenntnisstand

Von Jörg Fick wurden bereits Studien zum Einfluss der gelösten Gasart auf die Filmbildungskinetik Polyethylenglykol-terminierter Alkanthiole durchgeführt [228]. Hierbei wurde ein OH-terminiertes PEG-Thiol mit einer mittleren Kettenlänge von 41 Einheiten verwendet und der Filmbildungsprozess bei Adsorption aus einer N₂- und O₂-gesättigten Thiol-Lösung nach verschiedenen Zeiten unterbrochen, um die Schichtdicke der erhaltenen PEG-Monolagen ellipsometrisch bestimmen zu können. Die Thiol-Lösung wurde hierzu zunächst im leichten Vakuum entgast und anschließend mit dem jeweiligen Gas gesättigt.

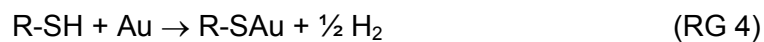
Im Fall einer N₂-gesättigten Adsorptionslösung konnte hierbei kein Übergang der initial gebildeten amorphen PEG-Monolagen in eine gestreckte und helikale Konformation beobachtet werden. Selbst nach einer Adsorptionszeit von mehreren Tagen blieben die Schichtdicken nahezu konstant bei einer Dicke von etwa 30 Å, was einem Bedeckungsgrad von etwa 24% entspricht.

Im Gegensatz dazu wurde für eine O₂-gesättigte Lösung im Vergleich zu einer unter Raumluft gelagerten Adsorptionslösung eine Beschleunigung dieses Konformationsüberganges festgestellt; allerdings ergaben sich in beiden Fällen dieselben Endsichtdicken, die einem Bedeckungsgrad von etwa 81% entsprechen.

Diese Beobachtungen wurden thermodynamisch interpretiert, wobei angenommen wurde, dass dem Sauerstoff innerhalb des Reaktionsmechanismus der Adsorption eine entscheidende Rolle zukommt. Im Gegensatz zur Ausbildung quasi-kristalliner Alkanthiolmonolagen (bei Kettenlängen von etwa 18 C-Einheiten) ist der Übergang der wesentlich längeren und polymeren EG-Ketten von einer amorphen in eine kristalline PEG-Modifikation mit einer erheblich größeren Entropie-Abnahme verbunden. Hierfür muss demnach durch den Adsorptionsprozess ein genügend hoher Enthalpiebetrag zur Verfügung gestellt werden, damit die freie Energie des Systems bei diesem Prozess insgesamt abnimmt und der Selbstordnungsprozess stattfinden kann:

$$\Delta G = \Delta H - \Delta S \quad (102)$$

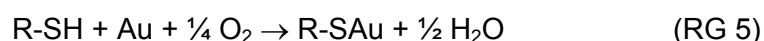
Zwar wird der Mechanismus der Ausbildung von selbst-ordnenden Alkanthiolmonolagen auf Goldoberflächen schon seit mehr als 20 Jahren mit unterschiedlichen Methoden untersucht, der Reaktionsablauf konnte bislang jedoch immer noch nicht bewiesen werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass als reaktive Spezies ein Thiolat gebildet wird, das eine relativ starke Gold-Schwefel-Bindung mit einer Bindungsenergie von etwa 168 kJ/mol ausbildet. Angenommen wird hierbei die folgende Reaktion



Die weitere Reaktion des naszierenden Wasserstoffs konnte jedoch ebenfalls noch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Nach Schlenoff et al. beträgt die freie Gibbs Energie bei einer Adsorption von Alkanthiolen nur etwa -23 kJ/mol, da die Ausbildung einer kristallinen Struktur mit einer hohen Entropieabnahme verbunden ist. Für den Ordnungsprozess der langkettigen PEG-Thiole ist jedoch mit einer noch wesentlich höheren Entropieabnahme zu rechnen. Daher wäre zu erwarten, dass die im Fall der Reaktion (RG 4) freigesetzte Enthalpie hier nicht mehr ausreicht, um den Konformationsübergang in eine kristalline PEG-Modifikation zu vollziehen. Die Beobachtung eines in Abhängigkeit von der Art des Gaszusatzes einsetzenden Konformationsübergangs wurde dahingehend interpretiert, dass in beiden Fällen (N_2 - bzw. O_2 -Sättigung) unterschiedliche Adsorptionsmechanismen ablaufen, deren Enthalpiebeträge sich derart unterscheiden, dass nur der im Fall der O_2 -Sättigung freigesetzte Betrag ausreicht, um den Ordnungsprozess zu ermöglichen.

Für den unter Sauerstoff-Atmosphäre ablaufenden Adsorptionsprozess wurde von Fick et al. der folgende Reaktionsmechanismus vorgeschlagen:



Die Bildung des Wassers ist mit einem zusätzlichen Enthalpiebetrag von 143 kJ/mol verbunden, der für den Konformationswechsel eingesetzt werden kann. Unter N_2 -Sättigung kann dagegen nur der in (RG 4) dargestellte Reaktionsweg beschriftet werden, dessen Enthalpiebetrag jedoch nicht ausreicht, um einen Übergang in eine kristalline PEG-Modifikation zu vollziehen.

Nach dieser von Fick et al. dargestellten thermodynamischen Betrachtung sollte bei der aus einer N_2 -gesättigten Lösung stattfindenden Adsorption gegebenenfalls auch die mittlere Kettenlänge der PEG-Thiole einen Einfluss auf den erhaltenen Bedeckungsgrad ausüben, da pro EG-Einheit für den Übergang von einer amorphen in eine helikale Konformation eine bestimmte Entropieabnahme zu veranschlagen ist, die dazu führt, dass die Entropieabnahme des Systems mit zunehmender Kettenlänge kontinuierlich ansteigt. Die mit der mittleren EG-Anzahl verbundene Entropieabnahme bewirkt daher gegebenenfalls ab einer gewis-

sen Kettenlänge, dass die bei der unter N_2 -Sättigung ablaufenden Reaktion (RG 4) freigesetzte Enthalpie nicht mehr ausreicht, um unter einer Erhöhung des Bedeckungsgrades einen Übergang in eine helikale Konformation zu vollziehen.

Zur Klärung dieses Sachverhaltes wurden die in einer N_2 - und O_2 -gesättigten Adsorptionslösung resultierenden Filmbildungskinetiken der in dieser Arbeit synthetisierten PEG-Thiole EG17NH₂, EG31NH₂, EG40NH₂ und EG36COOH durch eine ellipsometrische Schichtdickenbestimmung ermittelt.

4.1.1 Ellipsometrie-Messungen

Es wurden 1mM Lösungen der PEG-Thiole in DMF verwendet, die vor der Sättigung mit dem entsprechenden Gas (N_2 oder O_2) zunächst für einige Minuten im leichten Vakuum entgast wurden. Anschließend wurden Au-bedampfte Si-Wafer für unterschiedliche Zeiten in diesen Lösungen eingelegt, wobei die Öffnung der Gefäße stets im Gegenstrom des jeweiligen Gases erfolgte.

In der Abbildung IV.I.4-1 sind für die Verbindungen EG17NH₂, EG31NH₂, EG40NH₂ und EG36COOH die bei einer Adsorption aus einer N_2 - und O_2 -gesättigten Lösung erhaltenen Filmbildungskinetiken getrennt gezeigt. Die nach den verschiedenen Adsorptionszeiten erhaltenen Schichtdicken sind in den Tabellen IV.I.4-1 und IV.I.4-2 aufgeführt. Durch Vergleich mit der für einen vollständig helikal geordneten PEG-Film zu erwartenden Schichtdicke, dessen Bedeckungsgrad 100% beträgt, konnte die Bedeckung der präparierten PEG-Monolagen ermittelt werden; die erhaltenen Werte sind ebenfalls in den Tabellen aufgeführt.

EG17NH2			EG31NH2			EG40NH2			EG36COOH		
Zeit / min	Schichtdicke / Å	Bedeckung %	Zeit / min	Schichtdicke / Å	Bedeckung / %	Zeit / min	Schichtdicke / Å	Bedeckung / %	Zeit / min	Schichtdicke / Å	Bedeckung / %
1	20,0	32,8	1	25,6	25,7	1	21,1	16,9	1	36,3	31,9
3	26,3	43,2	3	28,7	28,8	3	32,1	25,7	3	41,8	36,8
6	31,4	51,7	6	37,2	37,3	6	38,8	31,1	6	37,4	32,9
30	36,9	60,6	30	57,3	57,4	30	48,4	38,8	10	41,0	36,1
60	40,6	66,7	59	59,5	59,7	60	49,8	39,9	30	52,0	45,8
170	44,2	72,3	182	69,9	70,1	170	64,8	52,0	60	71,4	62,8
300	45,3	74,6	308	77,3	77,5	,289	71,2	57,1	182	83,5	73,5
911	50,7	83,4	826	79,6	79,8	901	81,4	65,2	1098	91,2	80,3

Tab. IV.1.4-1: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken und der Bedeckungsgrad der bei Adsorption der Verbindungen EG17NH2, EG31NH2, EG40NH2 und EG36COOH aus einer N₂-gesättigten Thiol-Lösung erhaltenen PEG-Beschichtungen.

EG17NH2			EG31NH2			EG40NH2			EG36COOH		
Zeit / min	Schichtdicke / Å	Bedeckung %	Zeit / min	Schichtdicke / Å	Bedeckung / %	Zeit / min	Schichtdicke / Å	Bedeckung / %	Zeit / min	Schichtdicke / Å	Bedeckung / %
1	18,6	30,5	1	21,6	21,7	1	24,3	19,5	1	32,8	28,9
3	25,5	41,9	3	27,0	27,1	3	32,6	26,2	3	42,7	37,6
6	30,8	50,6	6	33,5	33,5	6	51,8	41,5	6	57,0	50,2
30	35,0	57,6	30	65,6	65,8	30	64,8	52,0	11	61,3	54,0
60	38,9	63,9	60	74,9	75,2	60	74,0	59,3	30	79,6	70,1
170	44,8	73,6	155	84,1	84,3	180	76,9	61,6	60	85,3	75,1
803	51,0	83,8	795	87,9	88,1	346	80,2	64,3	217	90,9	80,0
						914	89,3	71,6	965	92,8	81,7

Tab. IV.1.4-2: Ellipsometrisch bestimmte Schichtdicken und der Bedeckungsgrad der bei Adsorption der Verbindungen EG17NH2, EG31NH2, EG40NH2 und EG36COOH aus einer O₂-gesättigten Thiol-Lösung erhaltenen PEG-Beschichtungen.

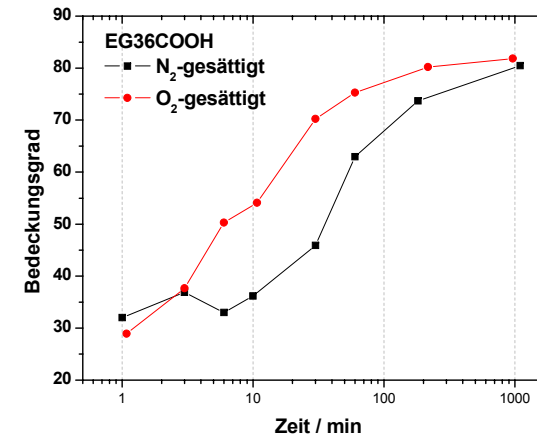
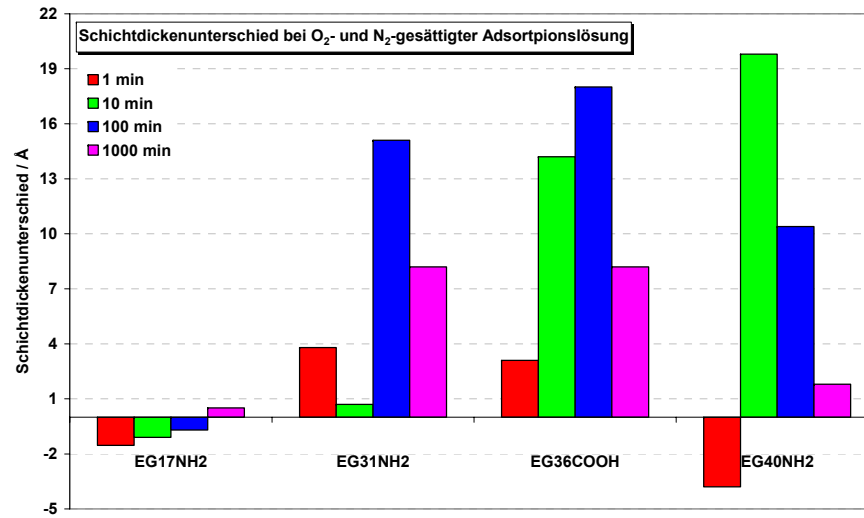
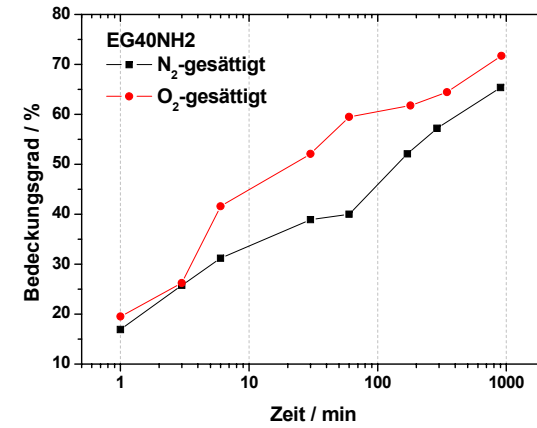
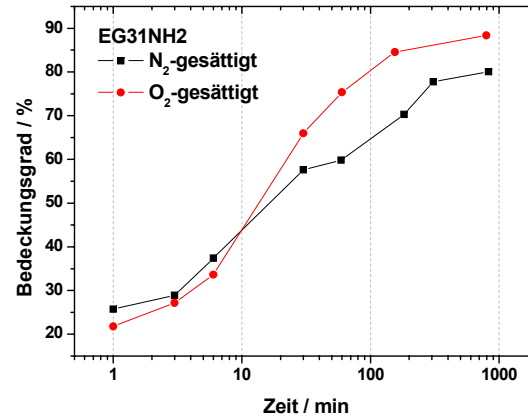
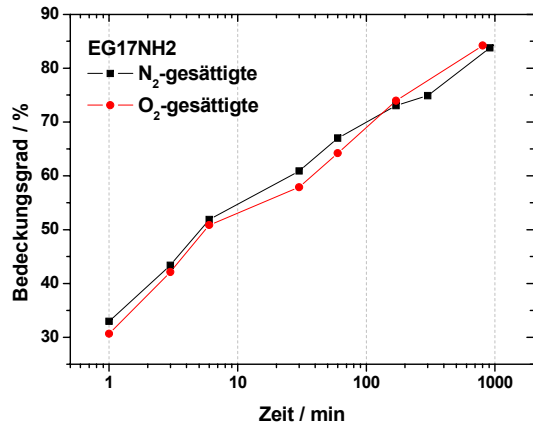


Abb. IV.1.4-1: Die von den Verbindungen EG17NH₂, EG31NH₂, EG40NH₂ und EG36COOH bei Adsorption aus einer N₂- und O₂-gesättigten PEG-Thiol-Lösung erhaltenen Filmbildungskinetiken (Abhängigkeit der ellipsometrisch bestimmten Schichtdicke von der Adsorptionszeit); Balkendiagramm: nach den unterschiedlichen Einlegezeiten bei einer Adsorption aus N₂- und O₂-gesättigter Lösung bestehende Schichtdickenunterschiede.

Anhand der Filmbildungskinetiken ist, wie in Abschnitt 4.1 bereits postuliert wurde, ein Einfluss des Gasgehaltes sowie der mittleren EG-Anzahl der Adsorptionslösung auf den Filmbildungsprozess zu erkennen.

Bei einer mittleren Kettenlänge von 17 Einheiten wird keine Auswirkung des Gasgehaltes auf den Adsorptionsprozess festgestellt; beide Adsorptionskurven (O_2 - bzw. N_2 -Sättigung) zeigen hier einen sehr ähnlichen Verlauf.

Für EG31NH₂ wird jedoch im Gegensatz zu der unter O_2 -Sättigung erhaltenen Filmbildungskinetik im Fall der N_2 -Sättigung eine Verzögerung in der letzten Phase des Ordnungsprozesses beobachtet. Der anfängliche Adsorptionsverlauf ist hier jedoch sehr ähnlich; deutliche Unterschiede zwischen beiden Kurven treten erst ab einer Zeit von etwa 30 Minuten auf. Der initiale Filmbildungsprozess verläuft daher nahezu identisch; der fortschreitende Ordnungsprozess (Entropieeffekt) scheint allerdings im Fall der N_2 -Sättigung gehemmt zu sein und läuft im Gegensatz zu demjenigen unter O_2 -Sättigung leicht verzögert ab. Nach einer Adsorptionszeit von etwa 800 min beträgt die erreichte Schichtdicke unter N_2 -Sättigung etwa 80 Å und bei O_2 -Sättigung etwa 88 Å. Da die N_2 -Kurve jedoch noch nicht in die Sättigung übergegangen ist, ist zu vermuten, dass nach einer längeren Adsorptionszeit dieselben Endschichtdicken resultieren werden.

Bei einer mittleren Kettenlänge von etwa 40 EG-Einheiten treten dieselben Unterschiede zwischen beiden Adsorptionskurven auf. Der anfängliche Filmbildungsprozess und somit die Ausbildung der amorphen PEG-Monolage verlaufen auch hier nahezu identisch. Nach einer Adsorptionszeit von etwa 3 Minuten resultiert in beiden Fällen eine Schichtdicke von etwa 32 Å. Deutliche Schichtdickenunterschiede treten hier im Vergleich zu dem kürzerkettigen EG31NH₂ jedoch bereits bei einer Adsorptionszeit von etwa 6 Minuten auf. Allerdings findet auch unter N_2 -Sättigung ein Übergang in eine helikale Konformation statt, der sich im Gegensatz zu der unter O_2 -Sättigung vollziehenden Adsorption durch eine Verzögerung auszeichnet. Nach einer Adsorptionszeit von etwa 900 min beträgt die Schichtdicke unter N_2 -Sättigung etwa 80 Å und unter O_2 -Sättigung etwa 88 Å. Die N_2 -Kurve befindet sich nach dieser Zeit jedoch noch nicht in der Sättigung, so dass auch hier zu vermuten ist, dass beide Adsorptionskurven nach einer bestimmten Zeit dieselben Endschichtdicken erreichen.

Die für den Adsorptionsprozess der Verbindung EG36COOH erhaltene Adsorptionskurve ist derer der Verbindung EG40NH₂ sehr ähnlich. Bis hin zu einer Adsorptionszeit von etwa 3 Minuten zeigen beide Kurven nur geringfügige Unterschiede; die Schichtdicke beträgt nach dieser Zeit etwa 42 Å. Der weitere Ordnungsprozess verläuft unter N_2 -Sättigung jedoch auch hier im Vergleich zu dem unter O_2 -Sättigung ablaufenden verzögert ab, wobei allerdings auch hier dieselben Endschichtdicken erreicht werden.

In der unteren linken Graphik der Abbildung IV.1.4-1 sind diese Ergebnisse zusammengefasst; es sind die bei den unterschiedlichen Adsorptionszeiten für die verschiedenen Ketten-

längen der eingesetzten PEG-Thiole bei der Adsorption aus einer N_2 - und O_2 -gesättigten Lösung resultierenden Schichtdickenunterschiede graphisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass mit ansteigender Kettenlänge der maximale Unterschied zwischen den beiden Adsorptionskurven zunimmt und sich seine Position zunehmend in Richtung niedrigerer Adsorptionszeiten verschiebt. Unabhängig von der Kettenlänge nähern sich die beiden Kurven bei Zunahme der Adsorptionszeit jedoch wieder einander an, so dass die Differenzbeträge nach Durchlauf eines Maximums wieder abnehmen.

4.2 Gesamtbetrachtung

Zusammenfassend kann anhand der vorstehenden Ergebnisse festgestellt werden, dass unter N_2 -Sättigung zwar eine mit der Kettenlänge zunehmende Verzögerung des Selbstordnungsprozesses resultiert, jedoch (nahezu) dieselben Endschichtdicken wie bei der unter O_2 -Sättigung durchgeführten Adsorption erhalten werden. Selbst bei einer Kettenlänge von 40 (EG40NH₂) und 36 (EG36COOH) EG-Einheiten trat unter N_2 -Sättigung ein Übergang von einer amorphen in eine kristalline PEG-Modifikation ein; von Fick et. al konnte hingegen für ein entsprechend langes Hydroxy-terminiertes PEG-Thiol (mittlere Kettenlänge von etwa 41 EG-Einheiten) ein solcher Übergang selbst nach einer Adsorptionszeit von mehreren Tagen nicht beobachtet werden [228]. Die Ursache dieser abweichenden Beobachtungen bleibt hier offen, da dieses unterschiedliche Verhalten schwerlich auf die funktionellen Endgruppen zurückgeführt werden kann, die jedoch den einzigen Unterschied in den untersuchten Systemen ausmacht.

Die hier im Fall der N_2 -Sättigung mit zunehmender Kettenlänge der adsorbierten PEG-Thiole beobachtete Verzögerung des Selbstordnungsprozesses spricht jedoch für die von ihm geäußerte Annahme unterschiedlicher Reaktionsmechanismen für den Fall einer aus N_2 - und O_2 -gesättigten Lösung stattfindenden Adsorption. Allerdings liegt der im Fall der N_2 -Sättigung freigesetzte Enthalpiebetrag auch hier entgegen der von Fick geäußerten These noch hoch genug, so dass bei einer mittleren Kettenlänge von 40 EG-Einheiten ein Übergang in eine helikale PEG-Konformation vollzogen werden kann.

IV.II LSPR-aktive Nanopartikeloberflächen

1 Verwendetes System

1.1 Theoretische Grundlagen der Herstellung

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Sensoroberflächen handelt es sich um Kompositensysteme, die aus oberflächen-adsorbierten Core-Shell-Partikeln bestehen.

Die Partikel wurden vor ihrer Metallumhüllung zunächst über elektrostatische Kräfte vermittelt auf dem festen Träger adsorbiert. Auf diese Weise konnte von der mit diesem Prozess verbundenen (hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften) vorteilhaften Ausbildung von Kontaktpunkten profitiert werden (s. Kapitel II.II Abschnitt 4.3). Hierzu wurden die Goldoberflächen zunächst mit einem Carboxylat-terminiertem Thiol unter Ausbildung selbstordnender Monolagen funktionalisiert und anschließend mit einer Suspension Polyethylenimin-(PEI) gecoateter SiO₂-Nanopartikel (Durchmesser 400 nm) behandelt. Durch Verwendung des Polyelektrolyten PEI konnte weiterhin ihre kolloidale Stabilität über die Mechanismen der sterischen Stabilisierung und der Ladungsstabilisierung gesichert werden (s. Kap. II.II Abs. 4.1.2).

Die elektrostatischen Wechselwirkungen bestehen hier zwischen den negativen Oberflächenladungen des beschichteten Trägers und den protonierten Imingruppen der funktionalisierten Nanopartikel. Folgend wurden die adsorbierten und durch den Polyelektrolyten PEI positiv geladenen Nanopartikel unter Anwendung der LBL-Technik mit Citrat-stabilisierten Goldkolloiden (Durchmesser ca. 4 nm) behandelt. Dieser Schritt wird hier als *seeding* bezeichnet und führt laut rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen zu Goldbedeckungen von etwa 30%. Der anschließende *Plating-Schritt*, die Behandlung der Oberflächen mit einer Au(III)-haltigen Reduktionslösung hat jedoch die Ausbildung einer nahezu geschlossenen Goldschale und somit eine Ausbildung von Core-Shell-Partikeln zur Folge.

Die hergestellten Schichten weisen somit eine Trilayer-Struktur auf; sie bestehen aus einer metallisierten Trägerschicht (1) und einer Lage dielektrischer SiO₂-Nanopartikel (2), welche wiederum mit einer sie umhüllenden oberen Metallschicht beschichtet sind (3).

1.2 Charakteristische optische Eigenschaften

Aufgrund ihres aus 3 Lagen bestehenden Aufbaus zeichnen sich die Nanopartikeloberflächen hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften durch besondere Wechselwirkungen aus. Es wird vermutet, dass in diesen Systemen eine kombinierte Anregung von sowohl lokalisierten als auch propagierenden Plasmaschwingungen auftritt. Durch die mit dem Vor-Adsorptionsprozeß verbundenen hohen Bedeckungen befinden sich die Core-Shell-Partikel zum Teil in einem elektrisch leitenden Zustand, so dass nicht nur in der unteren Metallschicht des Trägers, sondern auch in der oberen Metalllage der Partikel propagierende Plasmaschwingungen angeregt werden können. Diese treten in Wechselwirkung mit den lokalisierten Plasmonen der Partikel und führen nicht nur zu höheren Extinktionswerten des reflektierten Lichts, sondern auch zu einer wesentlichen Sensitivitätssteigerung bezüglich Änderungen des umgebenden Brechungsindex. Auf Au-bedampften Polystyrolplatten adsorbierte und Gold-umhüllte 350 nm Polystyrolpartikel zeigten z.B. bei einer Adsorption von Oktadekanthiol eine Resonanzverschiebung von etwa 55 nm [147]; dieser Betrag übertrifft die Sensitivität konventioneller SPR-Sensoren (BIAcore-Systeme) um das etwa 5-fache.

Die hohen Extinktionswerte von etwa 2 Einheiten optischer Dichte (O.D.) bewirken zudem eine wesentliche Steigerung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses.

Insgesamt wurde mit diesen Oberflächen daher nicht nur ein wesentlich sensitiveres Sensorsystem zur Detektion biomolekularer Wechselwirkungen entwickelt; zusätzlich sind auch wesentliche Voraussetzungen für eine mögliche Miniaturisierung und Parallelisierung gegeben, die im Fall konventioneller SPR-Vorrichtungen bedingt durch die geringe laterale Auflösung und die komplexere Art der Detektion immer noch bislang nicht gelöste technische Herausforderungen darstellen. Infolge der lokalisierten Natur der beobachteten Resonanzen kann im Prinzip jeder Partikel als ein kleiner Nanosensor verstanden werden; die laterale Auflösung dieser Methode liegt somit im Fall isolierter Partikel in der Größenordnung der Abschwächungslänge des anregenden und zur Detektion genutzten evaneszenten Feldes. Bei einer strukturierten Adsorption auf der Oberfläche wird die Auflösung hingegen durch die Dimensionen der Partikel-Cluster bestimmt. Weitere Vorteile hinsichtlich einer solchen Richtung sind weiterhin das hohe S/R-Verhältnis und die einfache und zudem kostengünstige Art der Detektion – die Aufnahme von in Reflexionsgeometrie gemessener Extinktionsspektren anstatt komplizierter optischer Bauten (Detektion einer Winkeländerung in konventionellen SPR-Einheiten). Somit sollte ein Einsatz zur Wirkstoffsuche im Hochdurchsatz-Verfahren ohne weiteres möglich sein.

Die Extinktionsspektren zeigen insgesamt 3 verschiedene lokalisierte SPR-Resonanzen im sichtbaren bzw. nahen Infrarot-Bereich: bei ca. 300, 400 und 600 nm. Diese können auf verschiedene, im Partikel angeregte Multipolschwingungen zurückgeführt werden (s.

Kap. II.II, Abs. 2) und zeichnen sich jeweils durch unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Änderungen des umgebenden Mediums aus.

Die Resonanzlage bei etwa 400 nm zeigt sowohl hohe Verschiebungs-Beträge als auch hohe Extinktionswerte (1 OD). Zudem ist die Halbwertsbreite dieser Resonanz sehr gering, womit eine genaue (infolge geringer Fehlerbreite) Bestimmung des Extinktionsmaximums verbunden ist.

Die Verschiebungen der bei etwa 300 nm auftretenden Resonanz fallen dagegen um etwa 60% geringer aus. Zudem liegt die optische Dichte bei nur $\sim 0,5$ OD und in Richtung niedriger Wellenlängen liegt dieser Extinktionspeak auf einem breiten Untergrund und kann daher nur als Schulter detektiert werden.

Die Resonanz bei etwa 600 nm zeigt zwar ebenfalls recht hohe optische Dichten (1 OD) und besitzt zudem die höchste sensorische Sensitivität, ihre Halbwertsbreiten sind jedoch sehr groß und in Richtung höherer Wellenlängen kann sie nur als breiter Ausläufer detektiert werden. Hiermit verbunden ist eine ungenaue Bestimmung der Resonanzlage und daher auch der Verschiebungsbeträge.

Aus diesen Gründen wurde die Resonanzlage bei etwa 400 nm auftretenden LSP-Resonanz zur quantitativen Interpretation herangezogen. Alle in dieser Arbeit angegebenen quantitativen Aussagen beziehen sich daher auf diese Resonanzlage. Die Bestimmung der Extinktionsmaxima erfolgte optisch (per Auge) und nicht durch eine Anpassung der Spektren.

Angemerkt sei hier, dass die Verschiebung der Resonanzlage in einigen Fällen nicht nur durch Aufnahme von Extinktionsspektren festgestellt werden konnte, sondern sich auch in einer Änderung ihrer Färbung äußerte, die mit bloßem Auge zu beobachten war. So konnten die in dieser Arbeit photochemisch erzeugten Muster (Größenordnung 0,5 - 1 mm) nicht nur mittels LSRP-Imaging (bzw. der Aufnahme von Extinktionsspektren) und typisch immundiagnostisch genutzter labeling-Verfahren (z.B. Fluoreszenzmarkierung) visualisiert werden, sondern waren schon mit bloßem Auge erkennbar, obwohl die Verschiebung der Resonanzlage nur wenige nm betrug (5 - 10 nm). Durch Adsorptionsprozesse hervorgerufene Verschiebungen in Richtung niedriger Wellenzahlen verursachen hierbei eine Dunkel-Färbung.

2 Bestimmung von Eichwertfaktoren zur quantitativen Detektion

Die LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen zeigen bei Adsorption von Molekülen eine Verschiebung ihrer Oberflächenplasmonenresonanz in den längerwelligen Bereich und ermöglichen somit eine markierungsfreie Detektion von Bindungsereignissen.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob diese Systeme, deren optische Eigenschaften sich durch eine Kombination von lokalisierten und propagierenden Plasmaschwingungen auszeichnen, analog zur konventionellen SPR-Spektroskopie (s. Kap. II.II Abs. 1) ebenfalls auch quantitative Detektionen ermöglichen.

Es wurde daher versucht, einen eventuellen quantitativen Zusammenhang zwischen der vorhandenen Massenbelegung und der induzierten Verschiebung der Oberflächenplasmonen-Resonanz festzustellen. Anhand geeigneter Eichmessungen konnten auf diese Weise Sensitivitätsfaktoren für die Sensoroberflächen bestimmt werden, welche es ermöglichen aus der beobachteten Verschiebung direkt auf die vorliegende Massenbelegung und Schichtdicke der Adsorbatlage zu schließen.

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Experimente demonstrieren den erfolgreichen Einsatz dieser Sensoroberflächen in der biomedizinischen Diagnostik. Über eine geeignete Beschichtung der Oberflächen mit einer funktionalisierten und proteinresistenten PEG-Matrix wurden sowohl Antikörper- als auch Peptidrezeptoren in die Schichten integriert. Anhand der Verschiebung der LSP-Resonanz konnte der Erkennungsschritt mit dem spezifischen Antigen nicht nur eindeutig nachgewiesen, sondern mittels der zuvor bestimmten Eichwertfaktoren auch quantifiziert werden.

Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung im High-Throughput-Screening wurden des weiteren Versuche hinsichtlich einer Miniaturisierung und Parallelisierung dieser Immuno-Assays durchgeführt. Hierzu wurden Peptidarrays in die Oberflächen integriert und strukturierte Oberflächenfunktionalisierungen erzeugt, deren qualitative und quantitative Auslese mittels LSPR-Imaging vorgenommen wurde; bei dieser Methode kann das Funktionalisierungs- und Bindungsmuster bildlich dargestellt werden.

2.1 Zielsetzung und Methoden

Es sollte anhand geeigneter Eichmessungen überprüft werden, ob die entwickelten Sensoroberflächen analog zur konventionellen SPR-Spektroskopie neben einer markierungsfreien ebenfalls auch eine quantitative Detektion von Bindungsereignissen zulassen.

Hierzu wurden Alkanthiole unterschiedlicher Kettenlängen (C4 - C18) sowie zur Analyse der Sensorantwort im Bereich höherer Massenbelegungen Oligo- und Polyethylenglykolphiole mit unterschiedlicher Anzahl an mittleren Ethylenglykoleinheiten (EG3 – EG36) auf den Nanopartikeloberflächen adsorbiert und die durch die Adsorption hervorgerufene Verschiebung der Oberflächenplasmonen-Resonanz bestimmt.

Zur quantitativen Auswertung wurden die Schichtdicken und somit der Bedeckungsgrad dieser funktionalisierten Oberflächen mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie über die Abschwächung des Substratsignals (Au) bestimmt.

Mit Hilfe des bekannten Platzbedarfs pro Alkanthiolkette ($21,4 \text{ \AA}^2$ für $\theta = 1$) konnte weiterhin die Massenbelegung (ng/cm^2) der präparierten Monolagen bestimmt werden.

Auf diese Weise wurden Eichwertfaktoren in Bezug auf Schichtdicke (Einheit $\text{\AA}/\text{nm}$) und Massenbelegung (Einheit $\text{ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{nm})$) erhalten, mit denen anhand der beobachteten Verschiebung der LSP-Resonanz direkt auf die Schichtdicke und Belegungsdichte der adsorbierten Spezies geschlossen werden kann.

2.1.1 Bestimmung des Bedeckungsgrades θ adsorbierter Alkanthiol-Monolagen

Für vollständig geordnete Alkanthiolmonolagen ist bekannt, dass die Schichtdicke linear mit der Anzahl der CH_2 -Einheiten ansteigt (lt. Lit. $1,23 \text{ \AA}$ pro CH_2 -Einheit) [245]

$$d = k \cdot (\text{Anzahl C-Atome}) = 1,23 \cdot (\text{Anzahl C-Atome}) \text{ [\AA]} \quad (103)$$

so dass über einen Vergleich von beobachteter und theoretisch zu erwartender Schichtdicke der Bedeckungsgrad ermittelt werden kann.

Die tatsächliche Schichtdicke d der Adsorbatlage wurde anhand röntgenphotoelektronenspektroskopischer Messungen nach der Gleichung

$$I_i(d) = I_{i,0} \cdot \exp\left(-\frac{d_i}{\lambda_i \cdot \cos \beta}\right) \quad (104)$$

bestimmt (i = Substratom, hier Au; λ = Abschwächungslänge, für Au = $36,8$; β = Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Analysatorachse, hier 0°).

Hierzu wurden die Absolutintensitäten der Au4f-Substratsignale mit (I_{Au}) und ohne ($I_{Au,0}$) adsorbierter Monolage ermittelt.

Zur Bestimmung der Au4f-Intensität ohne adsorbierter Monolage ($I_{Au,0}$) wurden die adsorbierten Monolagen durch eine UV-Bestrahlung oxidativ entfernt; die Au-S-Bindung wird hierbei durch Oxidation der Schwefel-Kopfgruppe gelöst; ebenso bewirkt das sich bildende Ozon einen oxidativen Abbau der Ethylenglykol- und Methyleneinheiten.

2.1.2 Bestimmung des Bedeckungsgrades θ adsorbierter PEG-Monolagen

Für die adsorbierten Polyethylenglykole wurde ebenfalls der auf vollständig geordnete Alkanthiolmonolagen bezogene Bedeckungsgrad ermittelt. Dies ist möglich, da das Au4f-Substratsignal durch C- und O-Atome etwa gleich stark abgeschwächt wird [245]. Hierzu wurde zunächst die vorliegende Schichtdicke nach Gleichung (104) anhand der Abschwächung des Au4f-Signals bestimmt. Auf Grundlage von Gleichung (103) wurde anschließend festgestellt, welcher vollständig geordnete Alkanthiolfilm (bzw. Anzahl an CH_2 -Einheiten; Abkürzung ACA) zu einer identischen Abschwächung des Au4f-Signals geführt hätte. Dies entspricht der Ermittlung einer Anzahl effektiver C-Atome (Abkürzung ECA; $\text{ECA} = \theta \cdot \text{ACA}$) nach der Gleichung

$$\text{ECA} = \frac{\lambda_{Au}}{k} \cdot \ln \frac{I_{Au,0}}{I_{Au}(d)} = \theta \cdot \text{ACA} \quad (105)$$

Der Bedeckungsgrad (bezogen auf vollständig geordnete Alkanthiolmonolagen) konnte anschließend über einen Vergleich mit der tatsächlichen Anzahl im Molekül enthaltener C- und O-Atomen berechnet werden.

Die Bestimmung der Au4f-Substratintensität ohne adsorbierter Monolage erfolgte auch hier über ihre Desorption durch UV-Bestrahlung in O_2 -Atmosphäre.

2.1.3 Bestimmung des Schichtdickenbeitrags k adsorbierter Alkanthiole

Die Bestimmung des Schichtdickenbeitrags k , welcher pro C-Einheit im Fall vollständig geordneter Alkanthiolmonolagen in Gleichung (103) anzusetzen ist, erfolgte durch Adsorption langkettiger Alkanthiole (C9, C12, C16, C18) auf Au-bedampften Si-Wafern und anschließender Ermittlung der durch den Adsorptionsprozess verursachten Substratabschwächung anhand von XPS-Messungen nach der Gleichung

$$\ln \frac{I_{Au,0}}{I_{Au}(d)} = \frac{k}{\lambda_{Au}} \cdot \theta \cdot \text{ACA} \quad (106)$$

(ACA = Anzahl C-Atome, θ = Bedeckungsgrad).

In diesem Fall wird von einer vollständigen Bedeckung ausgegangen und somit $\theta = 1$ gesetzt.

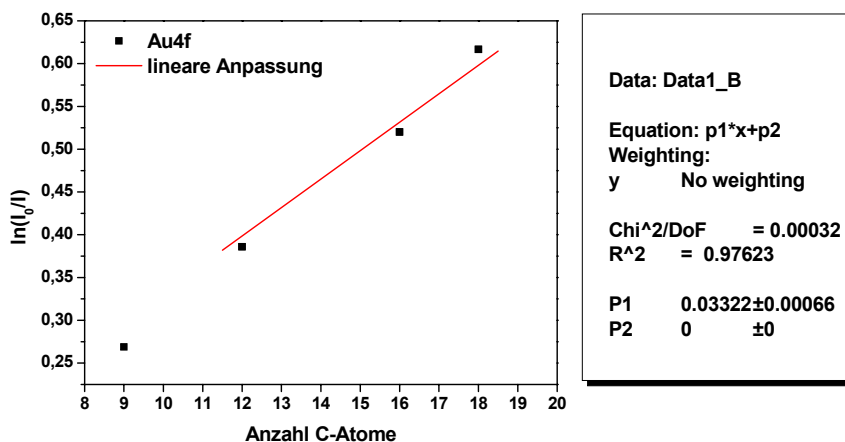


Abb. IV.II.2-1: Bestimmung des Schichtdickenbeitrags k adsorbierter Alkanthiole.

Die Anpassung der Daten erfolgte hier nur unter Berücksichtigung von C12, C16 und C18, da bei einer niedrigeren Anzahl an C-Einheiten aufgrund abnehmender van der Waals-Wechselwirkungen nicht mehr von einer all-trans-Konformation ausgegangen werden kann und gauche-Defekte die Bedeckung herabsetzen.

Eine lineare Anpassung der Daten nach Gleichung (103) führt zu einem Beitrag von $1,22 \text{ \AA}$ pro CH_2 -Einheit, der sehr gut mit dem Literaturwert von $1,23 \text{ \AA}$ übereinstimmt.

2.1.4 Charakterisierung der Nanopartikeloberflächen

2.1.4.1 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) der präparierten Nanopartikeloberflächen zeigten, dass durch die beschriebene Präparation keine vollständige Umhüllung der Si-Partikel mit Au-Kolloiden erzielt werden konnte. Anstatt einer geschlossenen Goldschale sind die Si-Partikel teilweise nur mit einem unvollständigen Netzwerk aus Au-Bahnen bedeckt. Der Bedeckungsgrad der Oberfläche mit den Si-Nanopartikeln beträgt etwa 55%.

In den XPS-Spektren zeigte sich dieses unvollständige Gold-Coating durch das Auftreten des $\text{Si}2p$ -Signals bei ca. 102 eV .

Aufgrund dieser nicht-leitenden Bereiche ist bei der Röntgenphotoelektronenspektroskopie mit einer Aufladung der Probe zu rechnen, welche zu einer Aufspaltung aller detektierten Signale um einen einheitlichen Betrag in Richtung

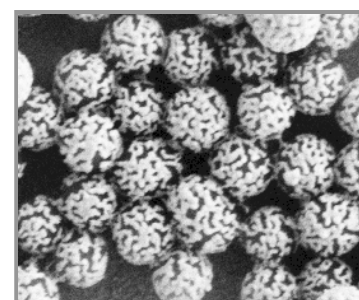


Abb. IV.II.2-2: REM-Aufnahmen der Nanopartikeloberflächen bei einer Vergrößerung von 15K.

höherer Bindungsenergie führt. Die aufgespaltenen Signale weisen infolge inhomogener Probenaufladung teilweise sehr große Halbwertsbreiten auf.

Die Signale der detektierten Spezies wurden daher als Dubletts angepasst; ihre durch Anpassung der Spektren ermittelten Aufspaltungsbeiträge lagen in ähnlicher Größenordnung.

Die zur oxidativen Desorption der Monolagen durchgeführte UV-Bestrahlung führte über den Austritt von Photoelektronen zu einer weiteren Aufladung der Proben; der Betrag der Ladungsaufspaltung steigt daher nach der UV-Behandlung von etwa 1-2 eV bis auf maximal 6 eV an.

Die nach der Bestrahlung aufgenommenen XP-Spektren (s. Abb. IV.II.2-3) zeigen jedoch keinen weiteren Anstieg der Si2p- Intensität, mit welcher im Falle einer Au-Ablösung zu rechnen wäre.

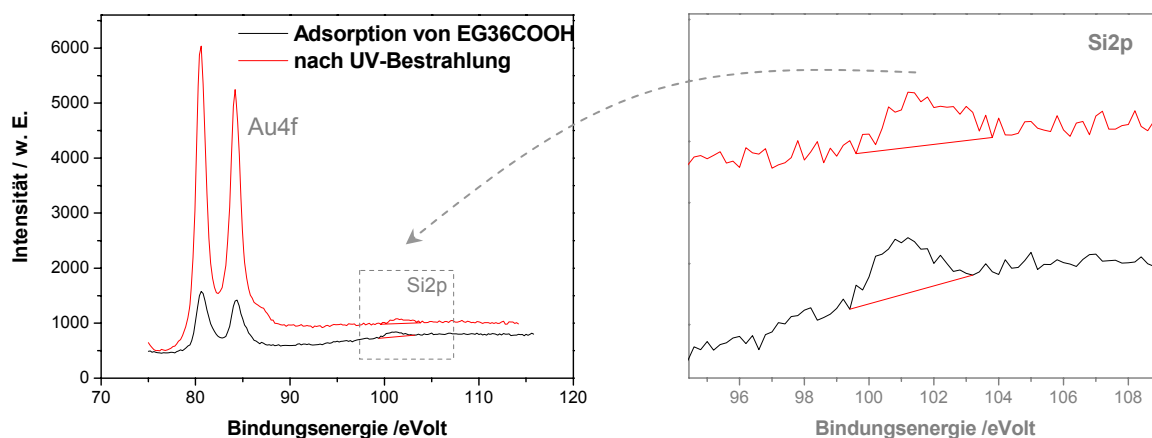


Abb. IV.II.2-3: Au4f- und Si2p-Detailspektren der Nanopartikeloberflächen; nach Adsorption von EG36COOH (schwarz) und einer 1-stündigen UV-Bestrahlung (rot).

Zusätzlich wird ein starker Anstieg der Au4f-Substratintensität beobachtet, welcher auf einen effektiven Abbau der Adsorbatlage zurückzuführen ist.

Die Methode der oxidativen Desorption stellt daher einen sensitiveren und effektiven Weg zur Ablösung adsorbierter Monolagen dar und ist nicht mit einem Au-Abtrag verbunden.

Zur Bestimmung der Schichtdicken nach Gleichung (104) wurde stets die gesamte Au4f-Signalintensität inklusive der Aufspaltungsbeiträge angesetzt.

Aufgrund der unvollständigen Bedeckung der Oberfläche mit den Si-Nanopartikeln ($\theta = 55\%$) adsorbieren die Thiole auf 2 chemisch unterschiedlichen Bereichen: den Au-gecoateten Si-Partikeln und dem Au-bedampften Glasuntergrund. Die Position des leitenden Untergrunds fällt im XP-Spektrum jedoch mit derer des leitenden Partikelbeitrag zusammen, so dass zwischen der Adsorption auf den leitenden Bereichen der Partikel und dem Untergrund nicht unterschieden werden kann.

2.1.4.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Von den Nanopartikeloberflächen wurden ebenfalls rasterelektronenmikroskopische Bilder vor und nach der UV-Bestrahlung aufgenommen. In der Abbildung IV.II.2-4 und -5 sind REM-Bilder gezeigt, welche von den unfunktionierten Oberflächen aufgenommen wurden.

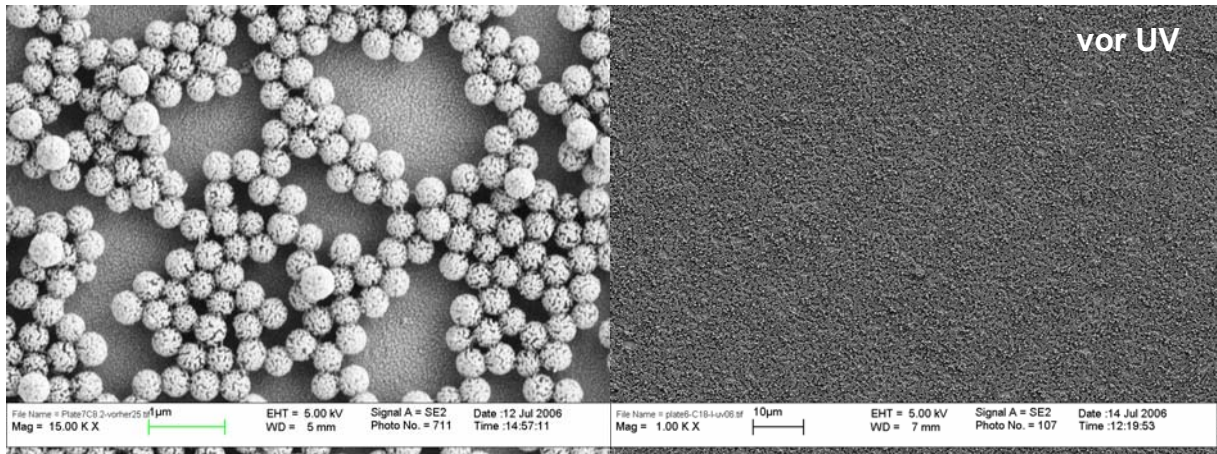


Abb. IV.II.2-4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unfunktionierten Nanopartikeloberflächen bei einer Vergrößerung von 15 K (links) und 1 K (rechts).

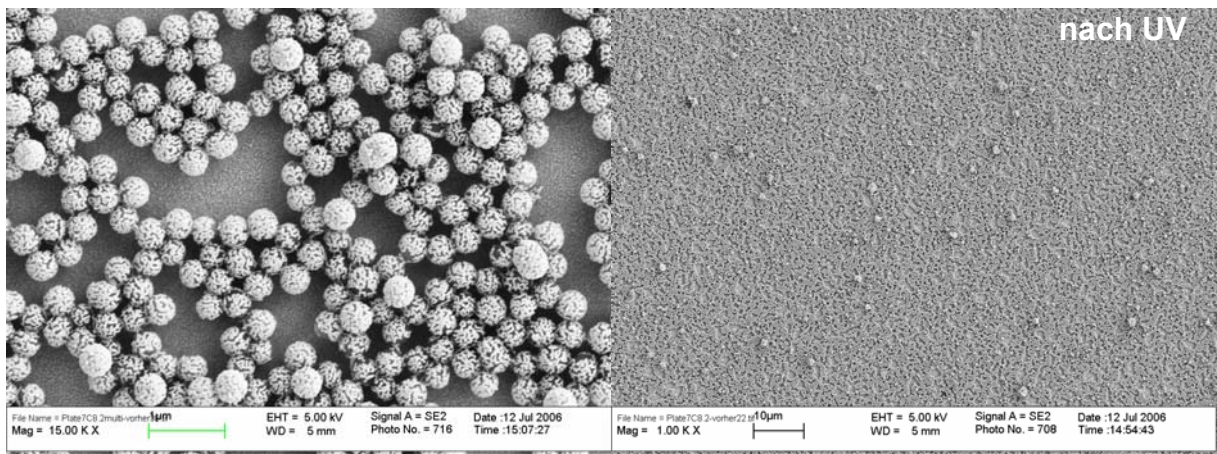


Abb. IV.II.2-5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Nanopartikeloberflächen nach einer 1-stündigen UV-Bestrahlung bei einer Vergrößerung von 15 K (links) und 1 K (rechts).

Anhand der REM-Bilder konnten keine Auswirkungen der UV-Bestrahlung auf die Beschaffenheit der Oberfläche festgestellt werden; insbesondere der Bedeckungsgrad und die Goldumhüllung der Nanopartikel zeigten keine mit diesem Prozess verbundenen Veränderungen.

Die Aufnahmen bestätigen somit die bereits in Abschnitt 2.1.4.1 gezogene Schlussfolgerung, dass die UV-Bestrahlung eine sensitivere Methode zum Abbau adsorbierter Monolagen darstellt.

2.2 Eichwertbestimmung durch Adsorption von Alkanthiolen

2.2.1 LSPR-Messungen

Es wurden Alkanthiole verschiedener Kettenlängen auf den Nanopartikeloberflächen adsorbiert und LSPR-Spektren jeweils vor und nach der Thiol-Adsorption aufgenommen. Anschließend wurde die durch die Adsorption hervorgerufene Verschiebung der bei ca. 400 nm auftretenden Oberflächenplasmonenresonanz ermittelt.

In der Tabelle IV.II.2-1 sind die verwendeten Alkanthiole und ihre Abkürzung aufgeführt.

<i>Alkanthiol</i>	<i>Strukturformel</i>	<i>Abkürzung</i>
Butanthiol	HS-(CH ₂) ₃ -CH ₃	C4
Dekanthiol	HS-(CH ₂) ₉ -CH ₃	C10
Dodekanthiol	HS-(CH ₂) ₁₁ -CH ₃	C12
Tetradekanthiol	HS-(CH ₂) ₁₃ -CH ₃	C14
Hexadekanthiol	HS-(CH ₂) ₁₅ -CH ₃	C16
Oktadekanthiol	HS-(CH ₂) ₁₇ -CH ₃	C18

Tab. IV.II.2-1: Liste der verwendeten Alkanthiole; Strukturformel und Abkürzung.

Die Abbildungen IV.II.2-6 bis -9 zeigen für jede adsorbierte Spezies beispielhaft einige der jeweils vor und nach der Adsorption aufgenommenen LSPR-Extinktionsspektren.

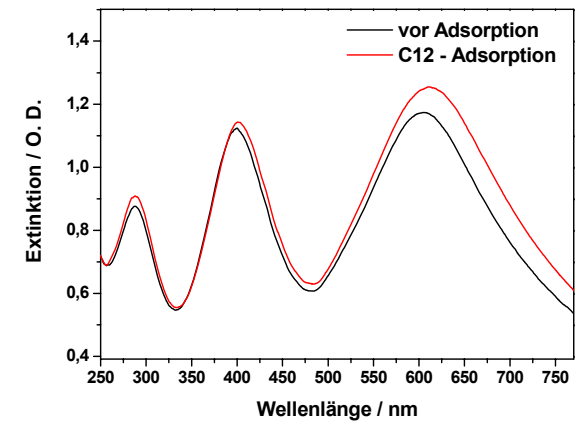
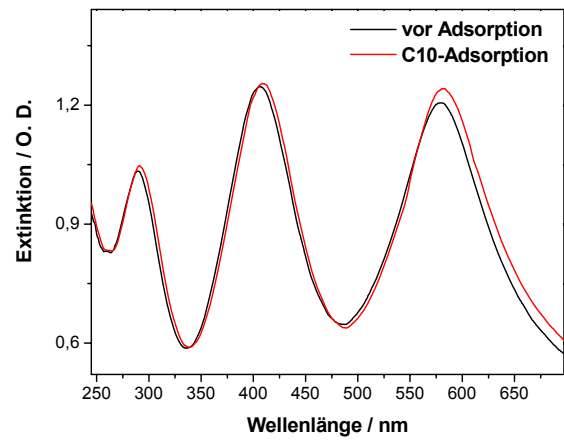
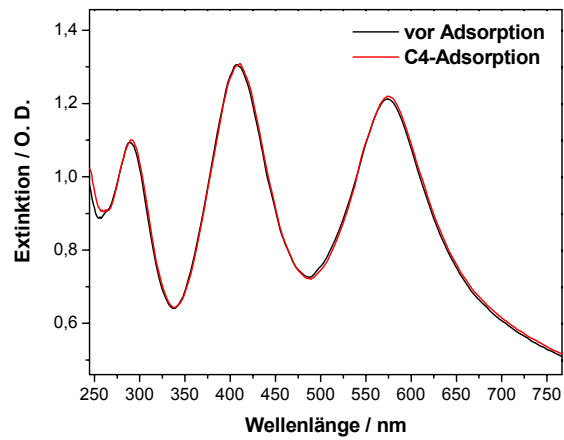


Abb. IV.II.2-6: Übersichts-LSPR-Spektren; aufgenommen vor (schwarz) und nach Adsorption (rot) von Butanthiol C4 (links), Dekanthiol C10 (Mitte) und Dodekanthiol C12 (rechts).

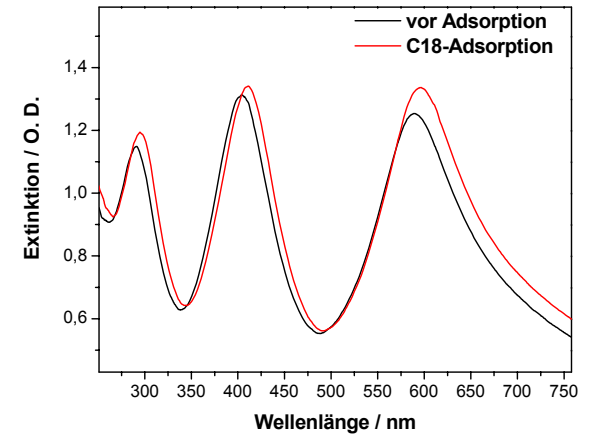
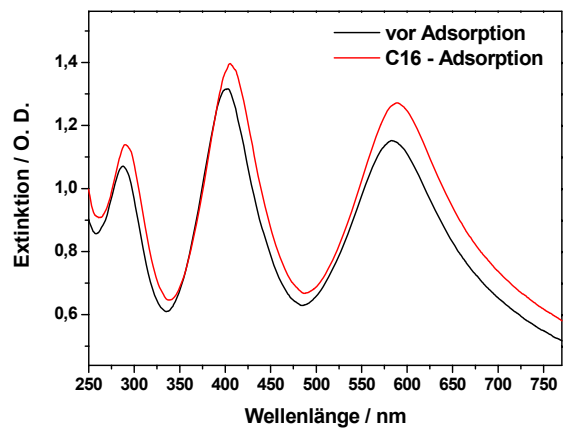
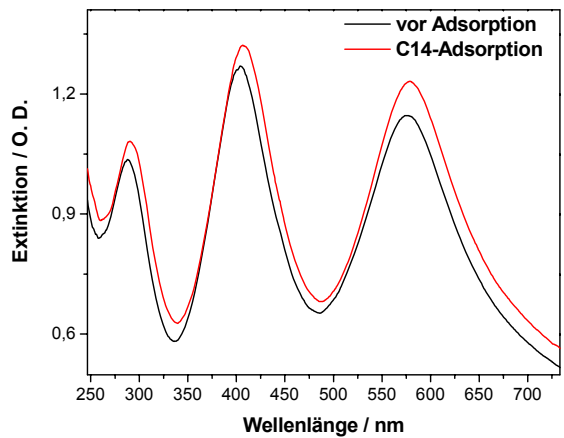


Abb. IV.II.2-7: Übersichts-LSPR-Spektren; augenommen vor (schwarz) und nach Adsorption (rot) von Tetradekanthiol C14 (links), Hexadekanthiol C16 (Mitte) und Oktadekanthiol C18 (rechts).

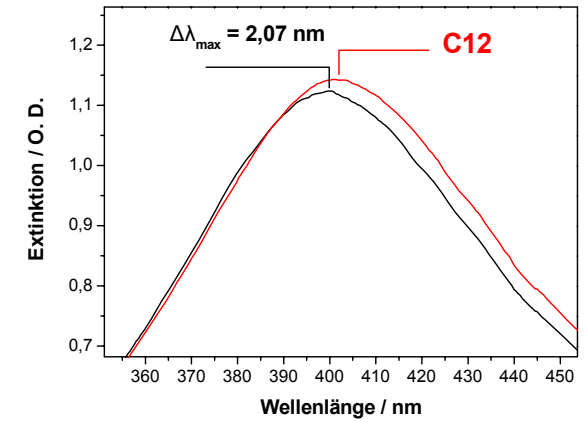
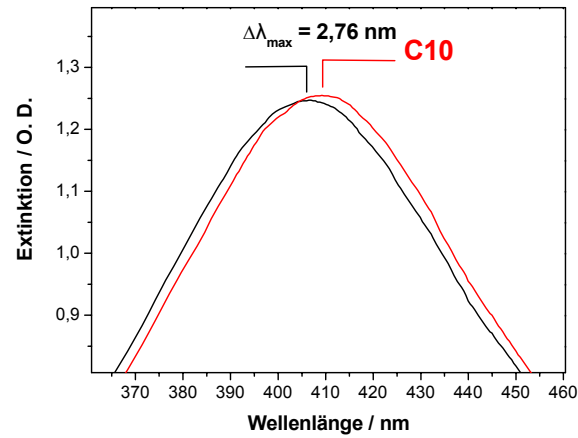
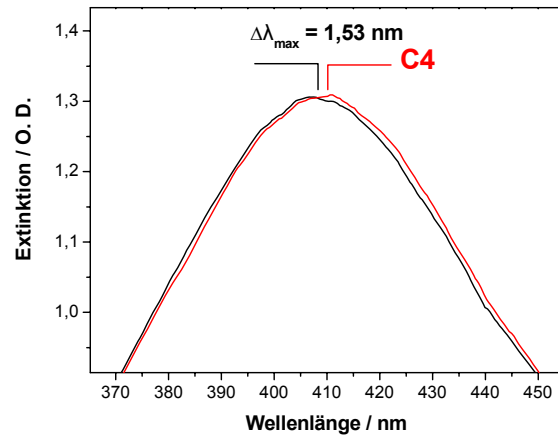


Abb. IV.II.2-8: Oberflächenplasmonenresonanz bei ca. 400 nm, aufgenommen vor (schwarz) und nach Adsorption (rot) von Butanthiol C4 (links), Dekanthiol C10 (Mitte) und Dodekanthiol C12 (rechts).

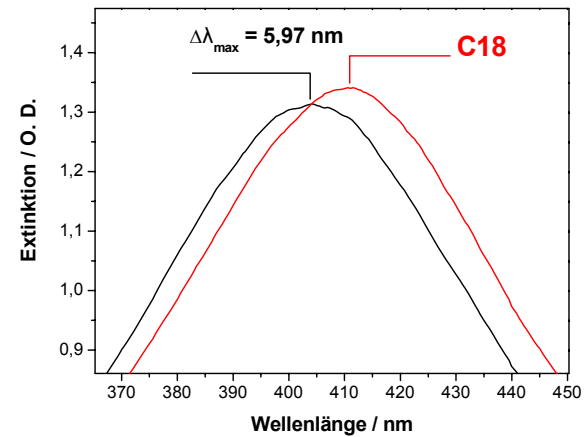
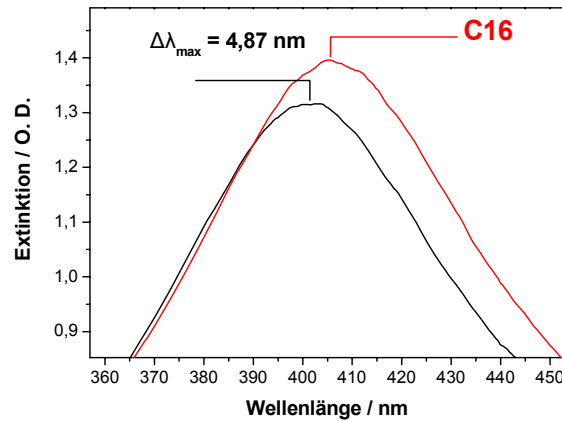
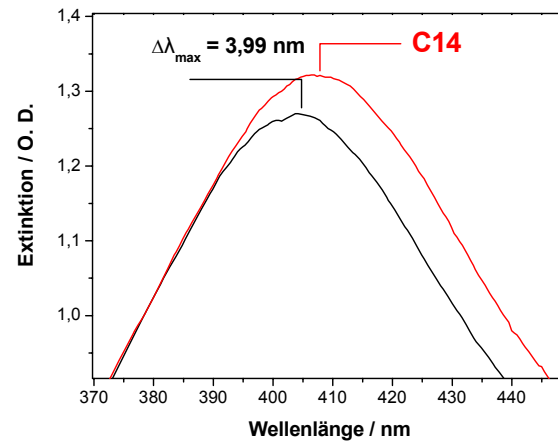


Abb. IV.II.2-9: Oberflächenplasmonenresonanz; aufgenommen bei ca. 400 nm vor (schwarz) und nach Adsorption (rot) von Tetradekanthiol C14 (links), Hexadecanthiol C16 (Mitte) und Oktadecanthiol C18 (rechts).

Für jede adsorbierte Verbindung wurden LSPR-Spektren von 6 bis maximal 12 verschiedenen Proben gemessen und die jeweilige Verschiebung der bei etwa 400 nm auftretenden Oberflächenplasmonenresonanz bestimmt. In der Tabelle IV.II.2-2 sind die auf diese Weise berechneten mittleren Verschiebungen $\Delta\lambda_{\max}$ sowie die zugehörigen Standardabweichungen (SD) angegeben. In der rechten Spalte ist weiterhin der sich pro C-Einheit ergebende Verschiebungsbetrag aufgeführt (Division des Verschiebungsbetrages durch die Anzahl der C-Einheiten des adsorbierten Alkanthiols).

Alkanthiol	$\Delta\lambda_{\max}$ (400 nm) / nm	SD / nm	$\Delta\lambda_{\max} / \text{CH}_2$ / nm
C4	1,53	0,24	0,38
C10	2,76	0,51	0,28
C12	2,07	0,25	0,17
C14	3,99	0,76	0,29
C16	4,87	1,00	0,3
C18	5,97	0,41	0,33

Tab. IV.II.2-2: Mittlere LSPR-Verschiebung, zugehörige Standardabweichung und LSPR-Verschiebungsbetrag pro C-Einheit.

Mit zunehmender Kettenlänge der adsorbierten Thiole ist ein Anstieg der Resonanzverschiebung verbunden (s. Abb.IV.II.2-10).

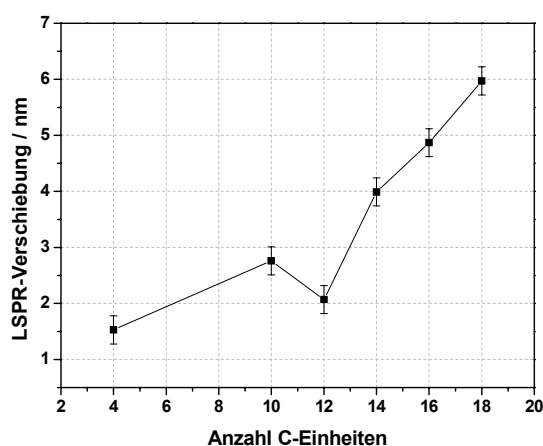


Abb. IV.II.2-10: LSPR-Verschiebung bei Adsorption von Alkanthiolen unterschiedlicher Kettenlänge.

Die weitgehende Einheitlichkeit der sich pro C-Einheit ergebenden Verschiebungsbeträge (rechte Spalte der Tab. IV.II.2-2) deutete weiterhin darauf, dass sich die Sensoroberflächen

in dem betrachteten Bereich von Massenbelegungen durch eine lineare Reaktion in Bezug auf die aktuelle Belegung auszeichnen. Es bestand daher die Vermutung, dass sich die LSPR-aktiven Oberflächen – analog zur konventionellen SPR-Spektroskopie im Bereich niedriger Massenbelegungen – durch einen linearen Antwortbereich auszeichnen.

Ein verlässlicher Eichfaktor kann auf Basis dieser Daten jedoch nicht angegeben werden, da der tatsächlich vorliegende Bedeckungsgrad der Adsorbatspezies unberücksichtigt bleibt. Insbesondere im Fall der kurzkettingen Alkanthiole (< C16) sind aufgrund abnehmender van der Waals-Wechselwirkungen und auftretender gauche-Defekte niedrigere Bedeckungsgrade als für die längerkettingen Alkanthiole zu erwarten.

Zur Bestimmung eines Sensitivitätsfaktors wurde daher der Bedeckungsgrad der funktionalisierten Sensoroberflächen anhand von XPS-Messungen bestimmt.

2.2.2 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Zur Kontrolle des Adsorptionsprozesses sowie zur Bestimmung des Bedeckungsgrades wurden XP-Spektren von den funktionalisierten Oberflächen aufgenommen.

Wie bereits erläutert, mussten aufgrund von Aufladungseffekten die detektierten Signale als Dubletts angepasst werden.

Im Fall des Au4f-Signals kommen die Signale, welche leitendem Probenuntergrund entsprechen bei 83,6 (Au4f_{7/2}) und 87,3 eV (Au4f_{5/2}); diese Positionen stimmen mit denen überein, welche bei XPS-Messungen auf Au-bedampften Si-Wafern gemessen wurden und entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten für Au4f-Oberflächenzustände planarer Goldoberflächen.

Beim C1s-Alkyl-Signal kommt der Anteil, welcher auf leitendem Probenuntergrund adsorbiert ist bei 284,3 eV; auch dieser Wert entspricht der bei der Adsorption von Alkanthiolen auf Au-bedampften Si-Wafern festgestellten Signallage.

Die Abbildung IV.II.2-11 zeigt in einer Gesamtübersicht C1s-Detailspektren von jeder adsorbierten Alkanthiolverbindung.

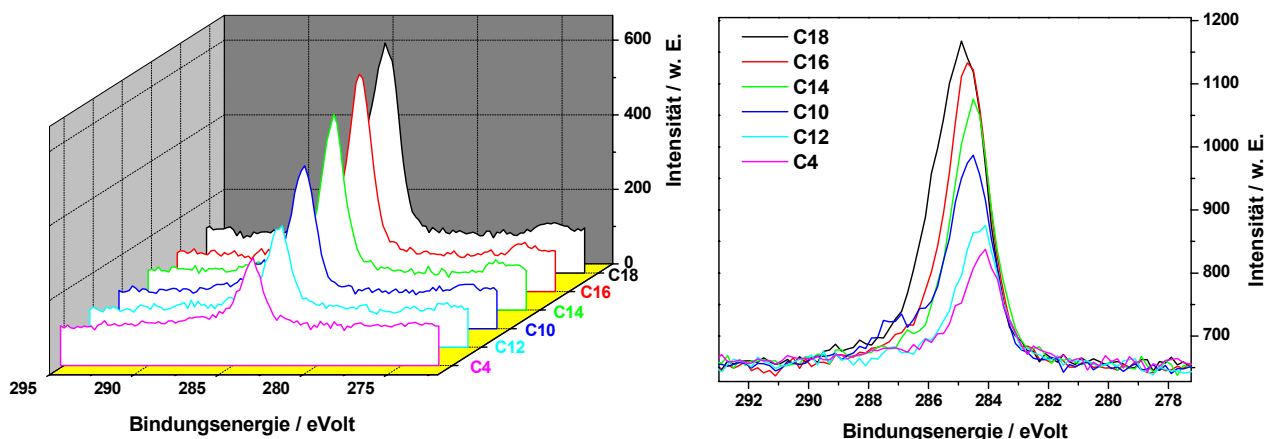


Abb. IV.II.2-11: C1s-Detailspektren; aufgenommen nach Funktionalisierung der Nanopartikel-Oberflächen mit den Alkanthiolen C4, C10, C14 und C18.

Mit zunehmender Kettenlänge wird erwartungsgemäß ein Anstieg der C1s-Alkyl-Intensität beobachtet, welcher zugleich einen effektiven Adsorptionsprozess der adsorbierten Thiole nachweist.

Zur quantitativen Auswertung wurden die jeweiligen Signale als Dubletts angepasst und integriert. Infolge inhomogener Aufladung sind für die Aufspaltungsbeiträge größere Halbwertsbreiten als für den auf leitendem Probenuntergrund sitzenden Anteil zu erwarten; dies wurde bei der Anpassung berücksichtigt, indem dieser Anteil mit eigenen charakteristischen Halbwertsbreite (HWB) angepasst wurde.

Die anhand der Au4f-Anpassung für den aufgeladenen Anteil ermittelte HWB wurde anschließend bei der Anpassung des C1s-Alkyl-Signals für dessen aufgeladenen Anteil fest vorgegeben, so dass für beide Signale identische Aufspaltungsbeträge resultieren.

Im Fall des Au4f-Signals wurde das sich aus der Spin-Bahn-Kopplung ergebende Intensitätsverhältnis (3:4) sowie der Spin-Bahn-Aufspaltungsbetrag für den aufgeladenen Signalbeitrag beim Anpassungsprozess ebenfalls fest vorgegeben.

Die Abbildungen IV.II.2-12 bis -17 zeigen für jede adsorbierte Alkanthiolverbindung einige der angepassten Au4f- und C1s-Detailspektren.

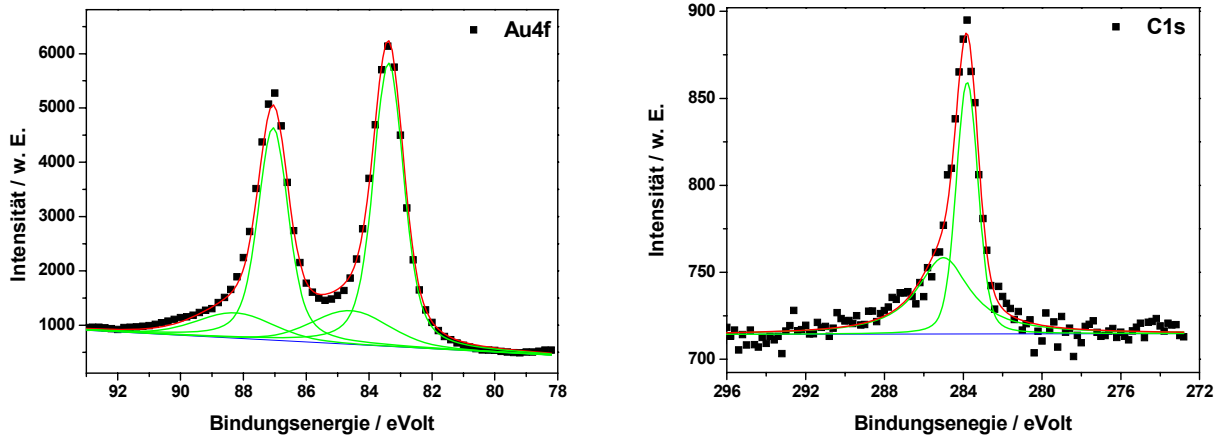


Abb. IV.II.2-12: Angepasste Au4f- (links) und C1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von Butanthiol (C4).

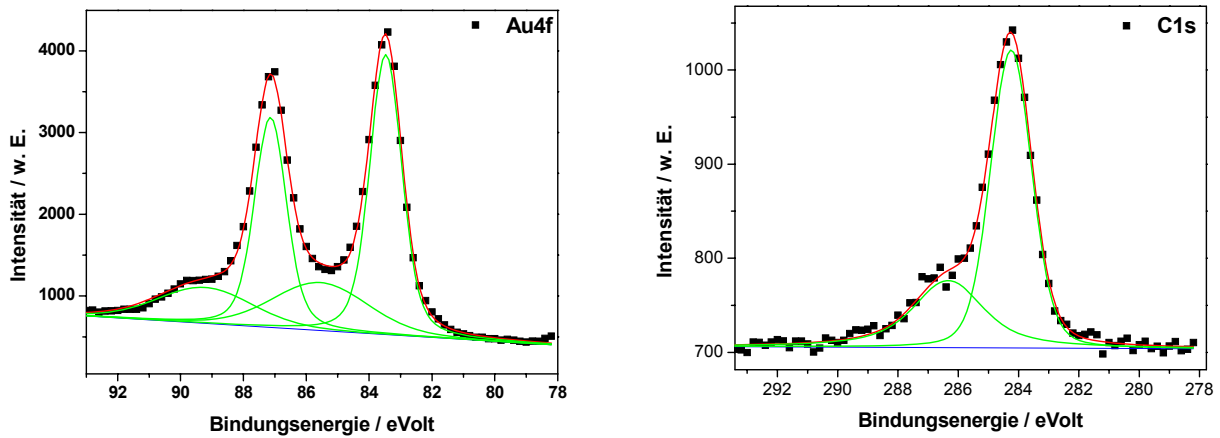


Abb. IV.II.2-13: Angepasste Au4f- (links) und C1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von Dekanethiol (C10).

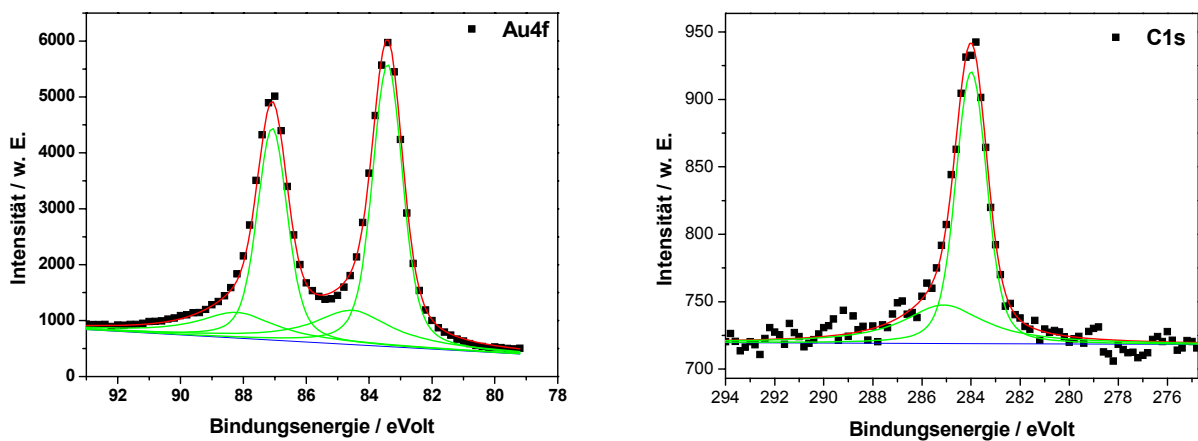


Abb. IV.II.2-14: Angepasste Au4f- (links) und C1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von Dodekanthiol (C12).

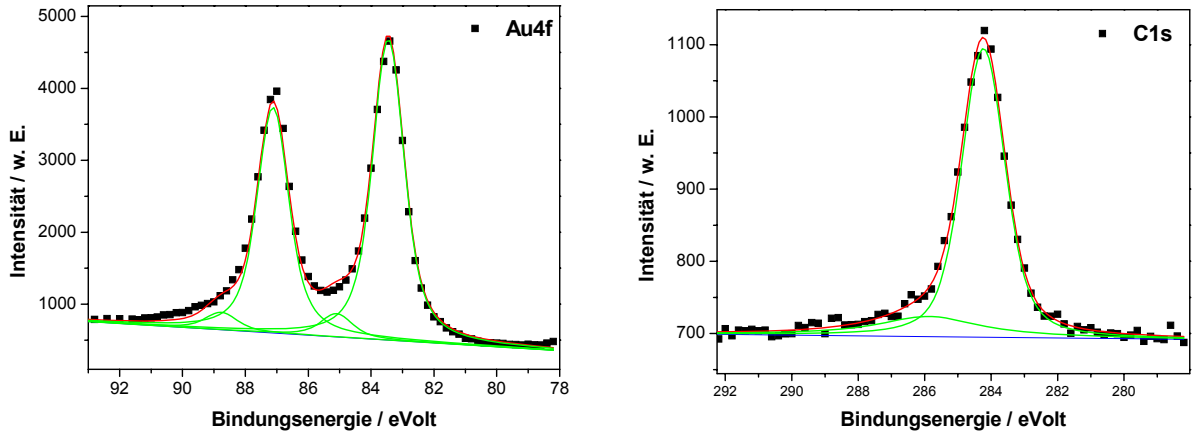


Abb. IV.II.2-15: Angepasste Au4f- (links) und C1s- (rechts) Detailspektren, aufgenommen nach Adsorption von Tetradekanthiol (C14).

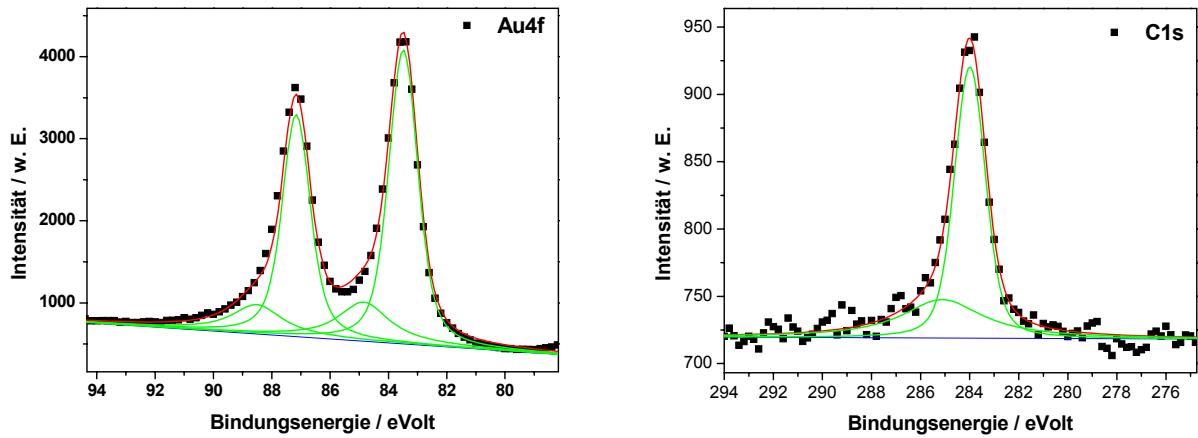


Abb. IV.II.2-16: Angepasste Au4f- (links) und C1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von Hexadecanthiol (C16).

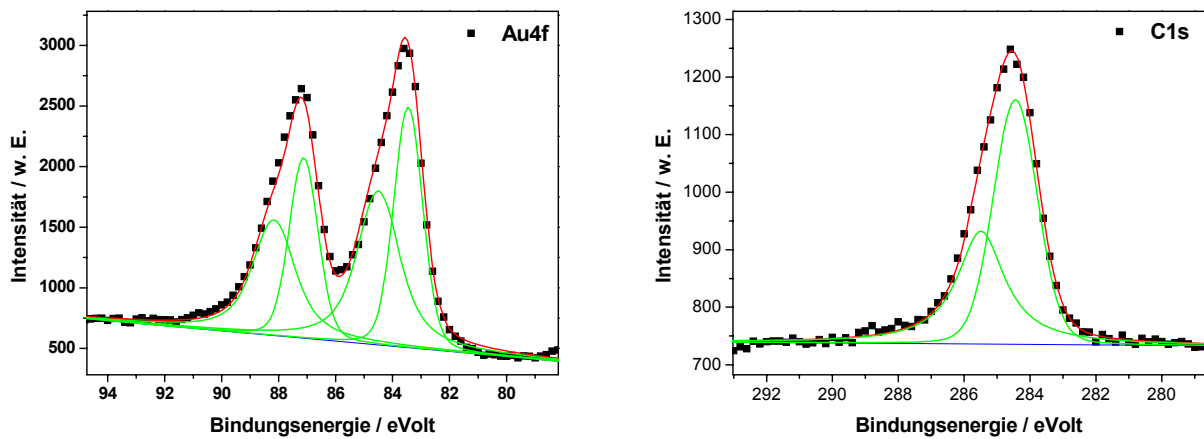


Abb. IV.II.2-17: Angepasste Au4f- (links) und C1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von Oktadecanthiol (C18).

Eine quantitative Auswertung der Daten erfolgte über die ermittelte Abschwächung der Substratlage (Au) nach Gleichung (105). Hierbei wurde die gesamte Au4f-Intensität (inklusive des Aufspaltungsbeitrags) angesetzt. Wie bereits dargestellt, ist es nicht möglich separierte Bedeckungen für die Partikel und die Substratoberfläche (Au-bedampfter Glasträger) zu ermitteln, da die Position des leitenden Untergrunds (Au) mit derer des leitenden Au-Partikelbeitrags im Röntgenphotoelektronenspektrum zusammenfällt.

Der sich auf diese Weise für den Beitrag $\theta \cdot \text{ACA}$ (= Bedeckungsgrad \cdot Anzahl C-Atome) ergebende Wert stellt eine effektive C-Atomanzahl dar (ECA), anhand derer wiederum nach Gleichung (103) die Schichtdicke der betrachteten Adsorbatlage bestimmt werden kann.

Von jeder präparierten Nanopartikeloberfläche wurden an 2 bis maximal 4 verschiedenen Stellen jeweils mit und ohne adsorbierter Monolage XP-Spektren aufgenommen und die sich ergebenden Daten miteinander verrechnet.

Hierbei zeigte sich, dass die Au4f-Intensität sehr probenspezifisch ausfiel; es wird vermutet, dass dies auf ein unterschiedlich effektives Gold-Coating der Nanopartikel zurückzuführen ist. Zur Bestimmung des Bedeckungsgrades ist es daher erforderlich, jeweils Spektren vom selben Proben spot miteinander zu verrechnen.

Die Tabelle IV.II.2-3 gibt für jede Alkanthiolverbindung die berechnete Anzahl effektiver C-Atome (ECA) sowie die gesamte C1s-Intensität (inklusive Aufspaltungsbeitrag) und den Betrag der Ladungsaufspaltung an. Die zwei rechten Spalten enthalten außerdem die entsprechenden Werte, welche bei einer Adsorption der angegebenen Alkanthiole auf Au-bedampften Si-Wafern ermittelt wurden.

<i>Thiol</i>	<i>Nanopartikeloberfläche</i>			<i>Si-Wafer</i>	
	<i>Effektive Anzahl C-Atome</i>	<i>Gesamte C1s-Intensität</i>	<i>Aufladungsaufspaltung /eVolt</i>	<i>Effektive Anzahl C-Atome</i>	<i>Gesamte C1s-Intensität</i>
C4	2,9	443,8	1,21		
C9				8,1	764,1
C10	6,9	863,1	2,09		
C12	4,9	543,4	1,13	11,6	910,7
C14	10,8	939,7	1,65		
C16	12,5	1092,6	1,35	15,6	1190,5
C18	17,0	1283,1	1,05	18,4	1379,5

Tab. IV.II.2-3: Effektive Anzahl an C-Atomen, gesamte C1s-Intensität und Aufladungsaufspaltung bei einer Adsorption auf Nanopartikeloberflächen und auf Au-bedampften Si-Wafern.

Da es sich bei den ECA-Zahlen um (auf den Bedeckungsgrad) normierte Werte handelt, ermöglichen sie einen direkten Vergleich von auf verschiedenen Oberflächen ermittelter und mit ihnen korrelierenden Werten, wie z.B. der gesamten C1s-Intensität.

In der Abbildung IV.II.2-18 ist der Zusammenhang zwischen der gesamten C1s-Intensität und der effektiven Anzahl an C-Atomen sowohl für die auf Nanopartikeloberflächen (schwarze Punkte) als auch auf Au-bedampften Si-Wafern (rote Punkte) erhaltenen Werte dargestellt.

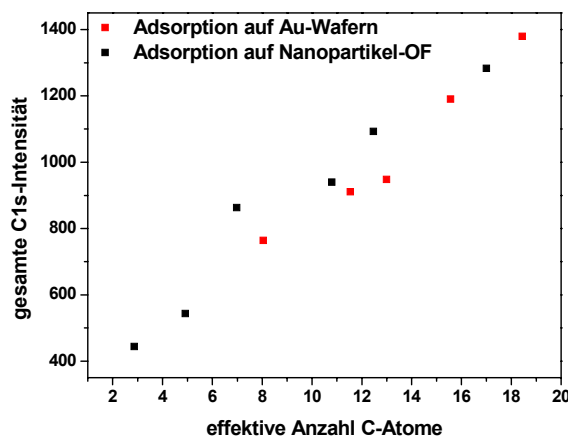


Abb. IV.II.2-18: Verlauf der C1s-Intensität bei einer Adsorption von Alkanthiolen auf Au-bedampften Si-Wafern (rot) und auf den Nanoparkeloerflächen (schwarz).

Es ist zu erkennen, dass beide Datenreihen in einem sehr engen Bereich liegen und demselben Trend folgen. Dies bestätigt die für die funktionalisierten Nanopartikeloberflächen ermittelten Bedeckungen und zeigt, dass die Röntgenphotoelektronenspektroskopie in der geschilderten Weise auch zur Bestimmung von Schichtdicken komplizierterer Substrate, wie der hier beschriebenen funktionalisierten Nanopartikel-Oberflächen angewendet werden kann.

Die in Abb. IV.II.2-18 aufgetragenen Daten werden durch die Gleichung

$$\begin{aligned}
 I_i &= \sigma_i \cdot N_i \cdot \lambda(E_i) \cdot T(E_i) \cdot \left\{ 1 - \exp\left(\frac{d_i}{\lambda_i} \cdot \cos \beta\right) \right\} \\
 \Rightarrow I_{C_{1s}} &= \sigma_{C_{1s}} \cdot N_{C_{1s}} \cdot \lambda(E_{C_{1s}}) \cdot T(E_{C_{1s}}) \cdot \left\{ 1 - \exp\left(\frac{1,23}{\lambda_{C_{1s}}} \cdot ECA\right) \right\}
 \end{aligned}
 \tag{107}$$

beschrieben⁵. Die XPS-Spektren zeigen weiterhin, dass die Bestrahlung der Oberflächen mit UV-Licht in O₂-Atmosphäre tatsächlich zu einer effektiven oxidativen Desorption adsorbierter Monolagen führt. Das C1s-Alkyl-Signal verschwindet nach der Bestrahlung und die Intensität

⁵ Zur Definition der einzelnen Größen siehe Kapitel II.III, Abschnitt 1.

des Au4f-Substratsignals steigt deutlich an. Der Betrag der Ladungsaufspaltung nimmt jedoch auf Werte von bis zu 6 eVolt zu; dies wurde auf den mit diesem Prozess verbundenen Austritt von Photoelektronen zurückgeführt.

Die Abb. IV.II.2-19 zeigt Au4f- und C1s-Detailspektren der Oberflächen, aufgenommen jeweils mit und nach anschließender oxidativer Ablösung einer adsorbierten C18-Monolage.

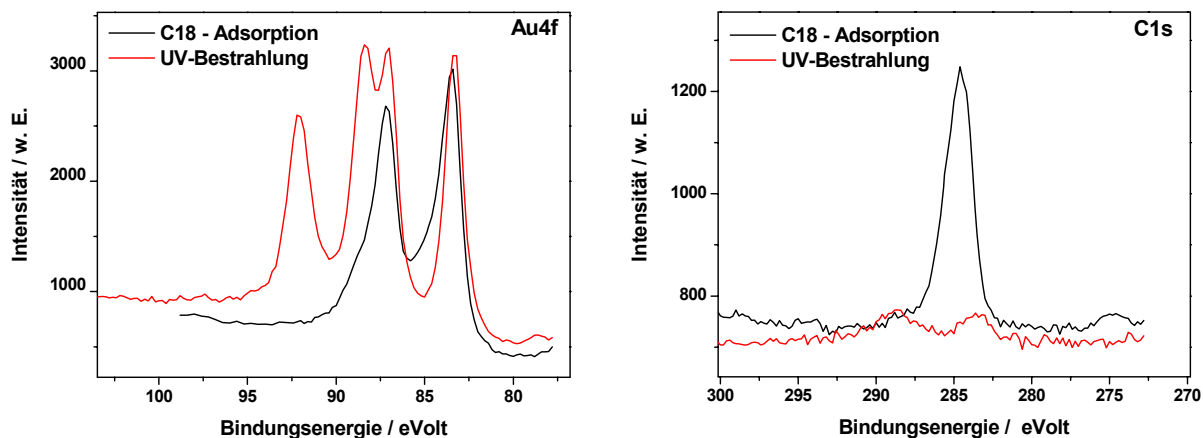


Abb. IV.II.2-19: Au4f- (links) und C1s-Detailspektren (rechts), aufgenommen nach Adsorption von C18 und einer anschließenden, 1-stündigen UV-Bestrahlung der Nanopartikeloberflächen.

Eine Bestimmung der Schichtdicken erfolgte nach Gleichung (104). Für jede adsorbierte Spezies wurden XPS-Spektren jeweils vor und nach der UV-Bestrahlung an 2 bis max. 4 verschiedenen Stelle einer präparierten Oberfläche aufgenommen, so dass 4 (2^2) bis max. 16 (4^2) Schichtdicken pro Platte bestimmt und zur anschließenden Mittelwertbildung verwendet werden konnten. In der Tabelle IV.II.2-4 sind die resultierenden Schichtdicken und ihre jeweilige Standardabweichung angegeben. Die zwei rechten Spalten geben die jeweils vor und nach der UV-Bestrahlung aus der Anpassung der Spektren erhaltene Ladungsaufspaltung an.

<i>Thiol</i>	<i>Schichtdicke</i> $d_{ist}/\text{\AA}$	<i>SD</i> $/\text{\AA}$	<i>Ladungsaufspaltung</i> <i>vor UV / eVolt</i>	<i>Ladungsaufspaltung</i> <i>nach UV / eVolt</i>
C4	3,52	0,32	1,21	5,86
C10	8,58	2,86	2,09	5,57
C12	6,04	1,81	1,13	5,20
C14	13,27	1,55	1,65	5,91
C16	15,33	1,27	1,35	3,67
C18	20,91	2,10	1,05	3,81

Tab. IV.II.2-4: Mittlere Schichtdicke und zugehörige Standardabweichung; Ladungsaufspaltung vor und nach der UV-Bestrahlung.

Die ermittelten Schichtdicken (d_{ist}) wurden anschließend verwendet, um den auf vollständig geordnete Alkanthiolmonolagen ($\theta = 1$; s. Gleichung (103)) bezogenen Bedeckungsgrad nach der Gleichung

$$\theta = \frac{d_{ist}}{d_{\theta=1}} \quad (108)$$

zu berechnen.

Der prozentuale Bedeckungsgrad wurde anschließend verwendet, um auf Grundlage der beobachteten LSPR-Verschiebung eine theoretische Verschiebung für den Fall vollständig geordneter Monolagen ($\theta = 1$) nach

$$\Delta\lambda_{\theta=1} = \frac{\Delta\lambda_{max}}{\theta} \quad (109)$$

zu ermitteln.

In der Tabelle IV.II.2-5 sind auf diese Weise erhaltenen Parameter aufgeführt.

<i>Thiol</i>	<i>XPS-Messungen</i>			<i>(L)SPR-Messungen</i>	
	<i>Schichtdicke</i> $d_{ist} / \text{Å}$	<i>Schichtdicke</i> $d_{\theta=1} / \text{Å}$	<i>Bedeckungs-</i> <i>grad</i> θ	<i>Verschiebung</i> $\Delta\lambda_{max} / \text{nm}$	<i>Verschiebung</i> $\Delta\lambda_{\theta=1} / \text{nm}$
C4	3,52	4,92	0,72	1,53	2,14
C10	8,58	12,30	0,70	2,76	3,96
C12	6,04	14,76	0,41	2,07	5,06
C14	13,27	17,22	0,77	3,99	5,18
C16	15,33	19,68	0,78	4,87	6,25
C18	20,91	22,15	0,94	5,97	6,32

Tab. IV.II.2-5: Röntgenphotoelektronenspektroskopische Bestimmung des Bedeckungsgrades θ ; beobachtete $\Delta\lambda_{max}$ und auf den Bedeckungsgrad normierte $\Delta\lambda_{\theta=1}$ LSPR-Verschiebung.

Eine Auftragung dieser auf den Bedeckungsgrad normierten theoretischen LSPR-Verschiebung ($\Delta\lambda_{\theta=1}$) gegen die Anzahl der C-Einheiten der adsorbierten Alkanthiole bestätigt die Vermutung eines linearen Zusammenhangs zwischen Massenbelegung und Sensorantwort. Zum Vergleich sind in der Abb. IV.II.2-20 ebenfalls die bereits in Abbildung IV.II.2-10 dargestellten nicht-normierten (L)SPR-Verschiebungen mit aufgetragen.

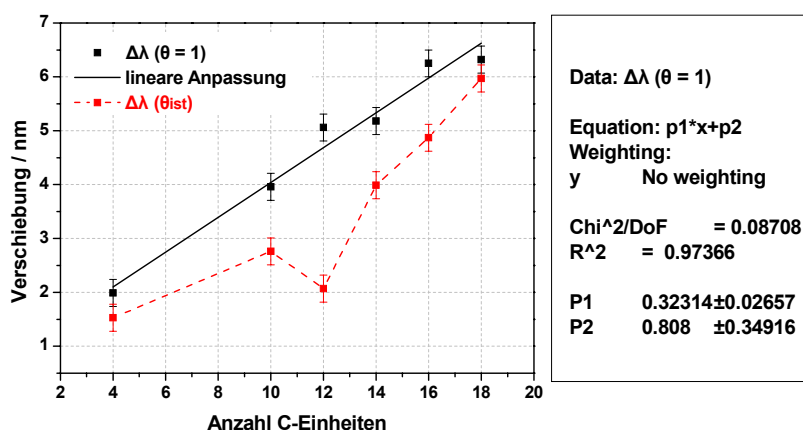


Abb. IV.II.2-20: Verlauf der beobachteten (rot) und der auf den Bedeckungsgrad normierten LSPR-Verschiebung (schwarz) bei Adsorption von Alkanthiolen unterschiedlicher Kettenlänge.

Eine lineare Anpassung der Daten ergibt einen Verschiebungsbetrag von etwa 0,32 nm pro C-Einheit.

Mit Hilfe der normierten theoretischen LSPR-Verschiebungen ($\Delta\lambda_{\theta=1}$) können daher analog zur konventionellen SPR-Spektroskopie über eine lineare Anpassung der ermittelten Daten Sensitivitätsfaktoren für die Sensoroberflächen in Bezug auf Massenbelegung ($\text{ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{nm})$) und Schichtdicke ($\text{nm}/\text{\AA}$) der Adsorbatlage bestimmt werden.

Eine Auftragung von $\Delta\lambda_{\theta=1}$ gegen die Massenbelegung $\Gamma_{\theta=1}$ der vollständig geordneten Monolagen, welche nach

$$\Gamma_{\theta=1} = \frac{M}{N_A \cdot 21,4} \cdot 10^{25} \left[\frac{\text{ng}}{\text{cm}^2} \right] \quad (110)$$

(M = Molekulargewicht [g/mol]; N_A = Avogadro'sche Konstante [mol^{-1}]; 21,4 = Platzbedarf pro Alkylkette [\AA^2]) berechnet werden kann, erlaubt so z.B. die Bestimmung eines Eichfaktors zur Bestimmung unbekannter Massenbelegungen.

Thiol	Massenbelegung $\Gamma_{\theta=1} / \text{ng}/\text{cm}^2$	Verschiebung $\Delta\lambda_{\theta=1} / \text{nm}$
C4	69,8	2,14
C10	135,0	3,96
C12	156,7	5,06
C14	178,5	5,18
C16	200,2	6,25
C18	221,9	6,32

Tab. IV.II.2-6: Auf den Bedeckungsgrad normierte mittlere Massenbelegung und zugehörige LSPR-Verschiebung.

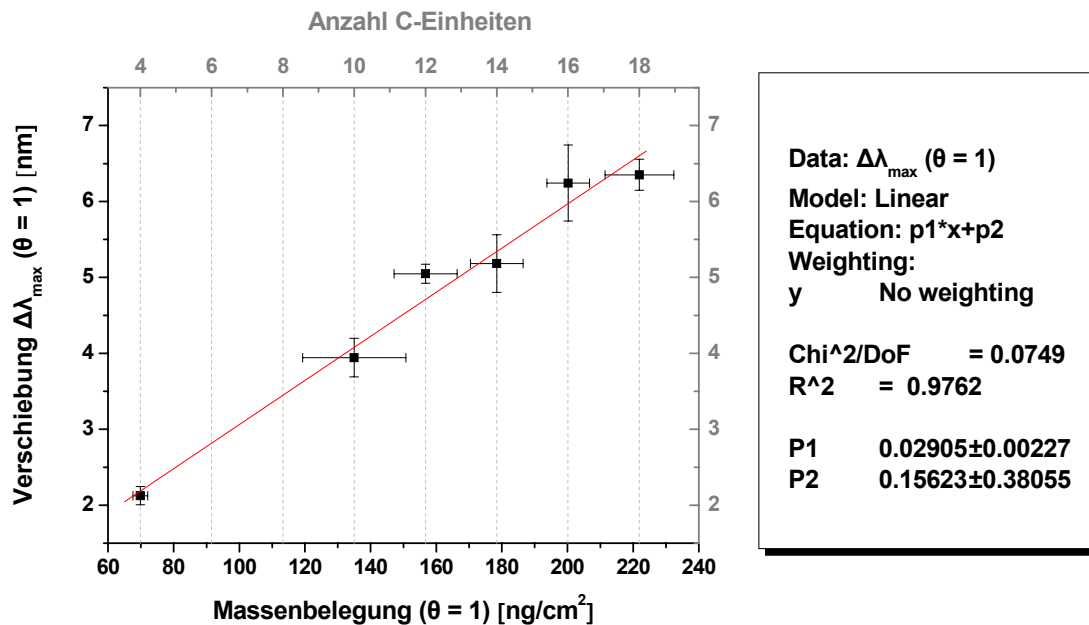


Abb. IV.II.2-21: Bestimmung des Eichwertfaktors bezüglich der Massenbelegung durch lineare Anpassung.

In dem betrachteten Bereich von Massenbelegungen bis zu 208,61 ng/cm² ($\theta_{C18} * \Gamma_{\theta=1,C18}$) zeichnen sich die optisch aktiven Nanosensor-Oberflächen daher durch einen linearen Antwortbereich aus, welcher durch einen Sensitivitätsfaktor von 2,91 (nm*mm²)/ng beschrieben werden kann.

Werden die Daten dagegen ohne Offset angepasst, so ergibt sich ein etwas höherer Eichwertfaktor von 2,99 (nm*mm²)/ng. Dies wurde auch in [32] beobachtet und könnte z.B. darauf zurückgeführt werden, dass eine atomar dicke Goldschicht infolge des Adsorptionsprozesses ihren metallischen Charakter verliert; die damit verbundene Zunahme des Verhältnisses von Kern- zum Hüllenradius führt zu einem zusätzlichen Verschiebungsbetrag (ins Rote) und somit zu einem positiven Offset in den Eichkurven.

Auf analoge Weise ergibt eine Auftragung der normierten Verschiebung gegen die für den Fall $\theta = 1$ zu erwartenden Schichtdicken einen Sensitivitätsfaktor von 0,255 nm/Å, mit dessen Hilfe eine Schichtdickenbestimmung anhand der beobachteten LSPR-Verschiebung erfolgen kann.

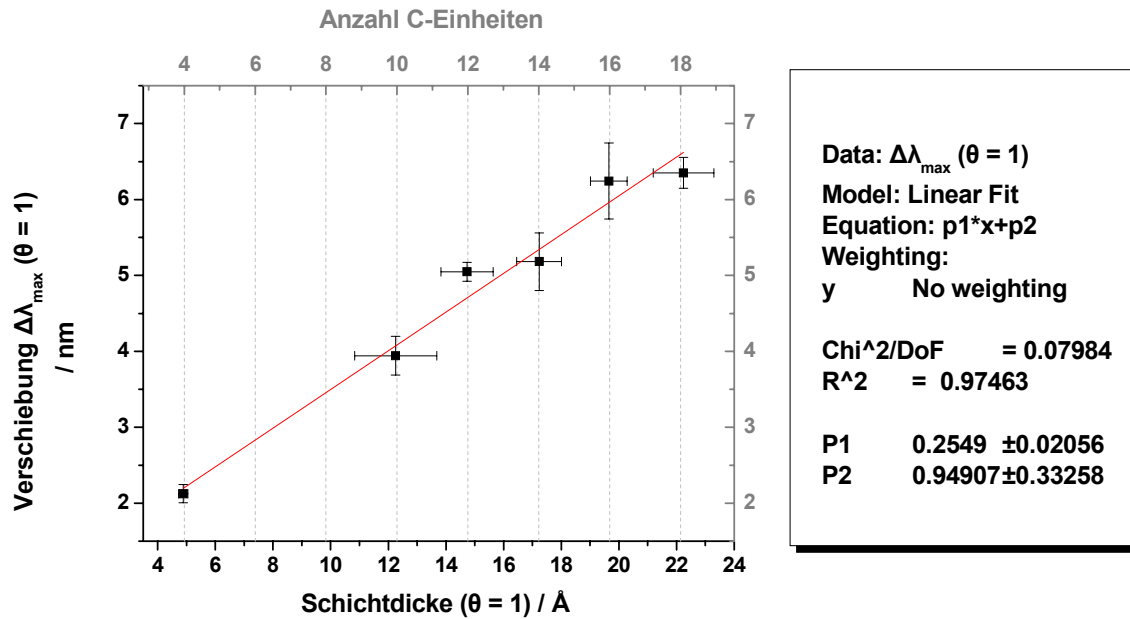


Abb. IV.II.2-22: Bestimmung des Eichwertfaktors bezüglich der Schichtdicke durch lineare Anpassung.

Auch hier wird ein positiver Offset beobachtet; werden die Daten durch den Nullpunkt angepasst, so ergibt sich ein Eichwertfaktor von 0,31 nm/Å.

Innerhalb des betrachteten Bereichs von Schichtdicken bis zu 20,9 Å ($\theta_{C18} \cdot d_{\theta=1,C18}$) und Massenbelegungen bis zu 208,61 ng/cm² ($\theta_{C18} \cdot \Gamma_{\theta=1,C18}$) kann daher näherungsweise von einem linearen Zusammenhang zwischen Sensorantwort und der Schichtdicke der Adsorbatlage ausgegangen werden⁶. Mit Hilfe der in den Abbildungen IV.II.2-21 und -22 dargestellten Eichgeraden ist es daher möglich, über eine einfache Bestimmung der infolge stattfindender Bindungsereignisse resultierenden Verschiebung der LSPR-Resonanzlage quantitative Aussagen in Bezug auf Schichtdicke und Massenbelegung der ausgebildeten Adsorbatlage zu treffen.

Ermittelte Eichwertfaktoren:

bzgl. Schichtdicke: 0,255 nm/Å

bzgl. Massenbelegung: 2,91 (nm*mm²)/ng

⁶ **Anmerkung:** Die in Abbildungen IV.II.2-21 und -22 dargestellten Eichgeraden stellen infolge des Bezugs auf $\theta = 1$ (vollständige Bedeckung) Extrapolationen des tatsächlich Messbereiches dar. Die Aussage einer linearen Sensorantwort kann daher nur bezogen auf diesen Bereich verstanden werden.

2.3 Eichwertbestimmung durch Adsorption von Oligo- und Polyethylenglykol-Thiolen

2.3.1 LSPR-Messungen

Zur Analyse der Sensorantwort im Bereich höherer Massenbelegungen wurden als länger-kettige Moleküle ebenfalls einige der bereits in Kapitel IV.I beschriebenen (polymeren) Ethylenglykole auf den Oberflächen adsorbiert. Analog zu der in Abschnitt 2.2 beschriebenen Alkanthiol-Eichreihe konnten auch hier über eine Bestimmung des Bedeckungsgrades und der normierten LSPR-Verschiebungen Sensitivitätsfaktoren in Bezug auf Massenbelegung und Schichtdicke ermittelt werden. In der Tabelle IV.II.2-7 sind die verwendeten Poly- und Oligoethylenglykol-Verbindungen sowie ihre Abkürzungen aufgeführt.

<i>Abkürzung</i>	<i>Strukturformel</i>
EG3OH	HS-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₃ -OH
EG6OH	HS-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₆ -OH
EG13OH	HS-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₁₃ -OH
EG17NH₂	HS-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₁₇ -NH ₂
EG22OH	HS-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₂₂ -OH
EG30COOH	HS-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₃₀ OCH ₂ -COOH
EG31NH₂	HS-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₃₁ -NH ₂
EG36COOH	HS-(CH ₂) ₁₁ -(OCH ₂ CH ₂) ₃₆ OCH ₂ -COOH

Tab. IV.II.2-7: Liste der adsorbierten (P)EG-Thiole; Strukturformel und verwendete Abkürzung.

Bei den Verbindungen EG3OH und EG6OH handelt es sich um Oligoethylenglykole mit einheitlicher Kettenlänge. Die restlichen Verbindungen sind polymere Ethylenglykole; die angegebene Kettenlänge entspricht daher der mittleren Anzahl an Ethylenglykoleinheiten.

Vor und nach der Thiol-Funktionalisierung wurden LSPR-Spektren aufgenommen und die durch die Adsorption hervorgerufene Verschiebung der bei etwa 400 nm auftretenden Oberflächenplasmonenresonanz ermittelt.

Die Abb. IV.II.2-23 bis -26 zeigen für jede adsorbierte Verbindung beispielhaft einige der jeweils vor und nach der Adsorption aufgenommenen LSPR-Spektren.

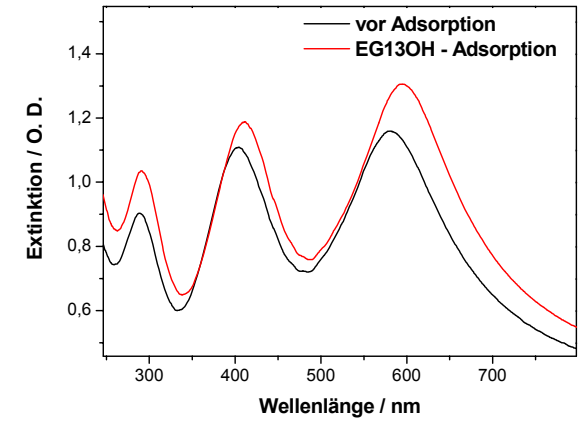
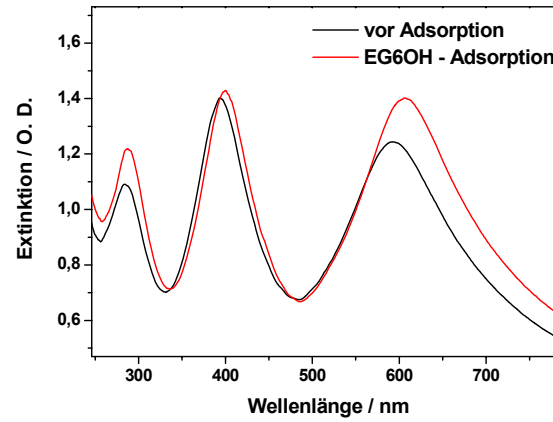
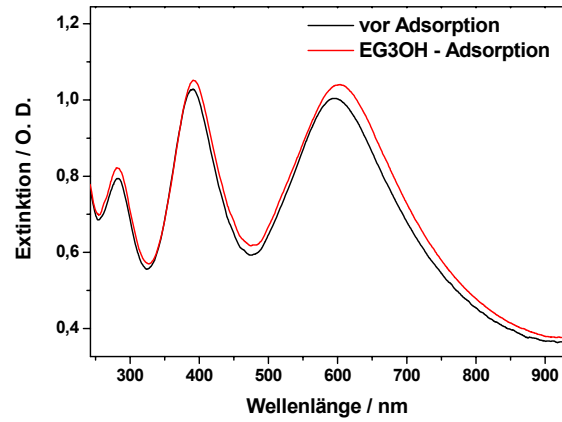


Abb. IV.II.2-23: Übersichts-LSPR-Spektren; aufgenommen vor (schwarz) und nach Adsorption (rot) von EG3OH (links), EG6OH (Mitte) und EG13OH (rechts).

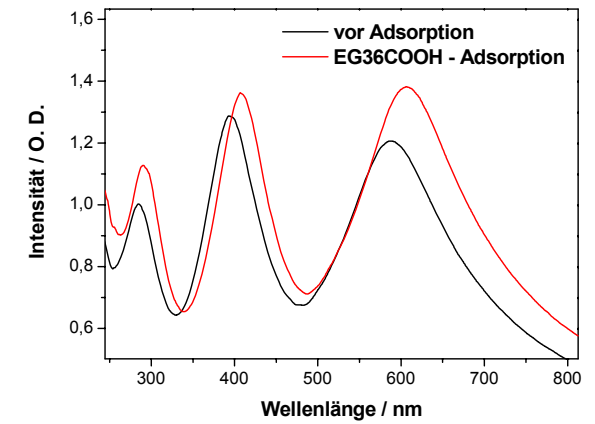
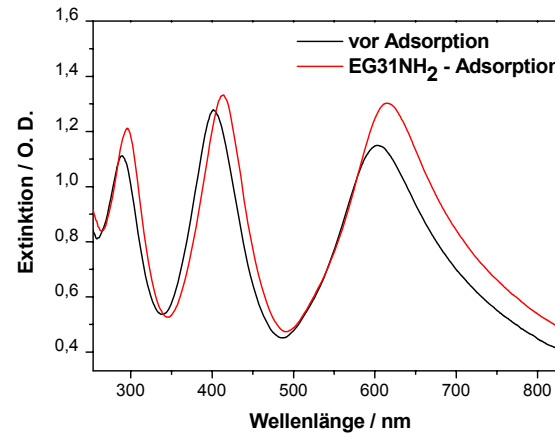
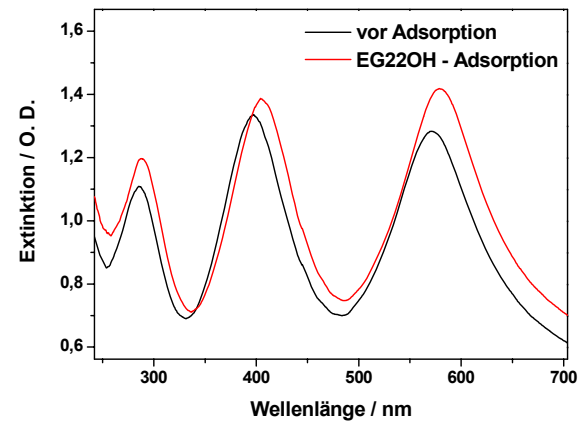


Abb. IV.II.2-24: Übersichts-LSPR-Spektren; aufgenommen vor (schwarz) und nach Adsorption (rot) von EG22OH (links), EG31NH₂ (Mitte) und EG36COOH (rechts).

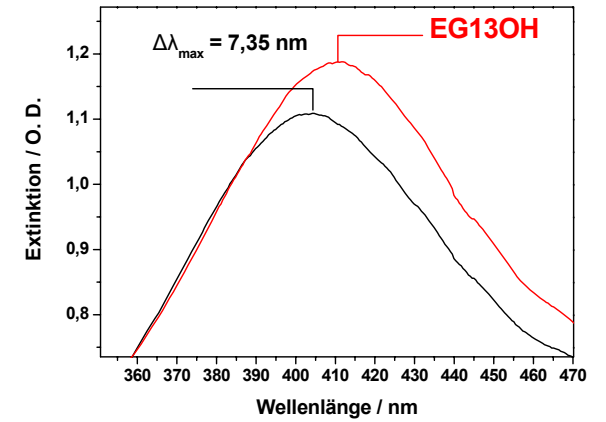
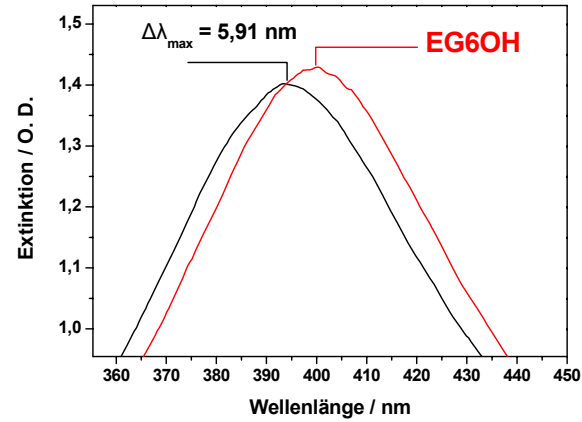
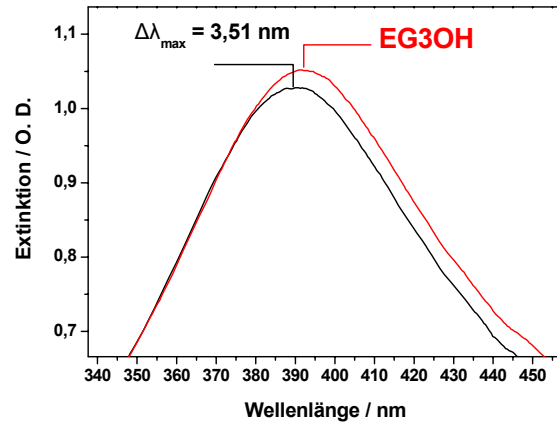


Abb. IV.II.2-25: Oberflächenplasmonenresonanz bei ca. 400 nm; aufgenommen vor (schwarz) und nach Adsorption (rot) von EG3OH (links), EG6OH (Mitte) und EG13OH (rechts).

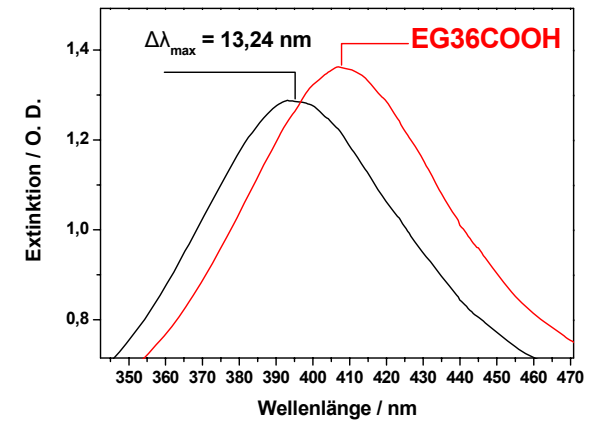
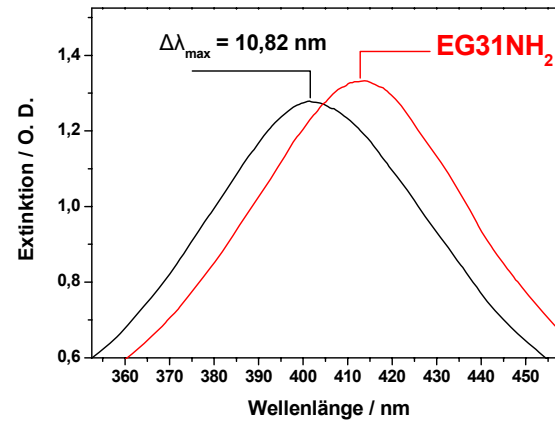
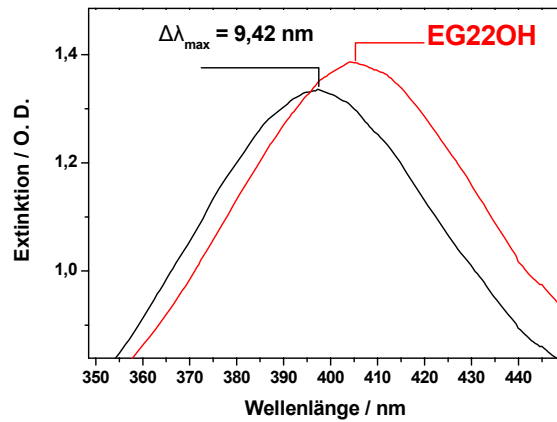


Abb. IV.II.2-26: Oberflächenplasmonenresonanz bei ca. 400 nm; aufgenommen vor (schwarz) und nach Adsorption (rot) von EG22OH (links), EG31NH₂ (Mitte) und EG36COOH (rechts).

Für jede adsorbierte Verbindung wurden LSPR-Spektren von 6 bis maximal 12 verschiedenen Proben aufgenommen und die jeweilige Verschiebung der bei etwa 400 nm auftretenden Oberflächenplasmonenresonanz bestimmt. In der Tabelle sind die mittleren Verschiebungen $\Delta\lambda_{\max}$ und zugehörigen Standardabweichungen angegeben. In der rechten Spalte ist außerdem der sich pro EG-Einheit ergebende Verschiebungsbetrag aufgeführt (Division von $\Delta\lambda_{\max}$ durch die Anzahl der EG-Einheiten des adsorbierten (P)EG-Thiols).

(P)EG-Thiol	$\Delta\lambda_{\max}$ (400 nm) / nm	SD / nm	$\Delta\lambda_{\max} / EG$ / nm
EG3-OH	3,51	0,59	1,17
EG6-OH	5,91	0,60	0,99
EG13-OH	7,35	0,48	0,57
EG22-OH	9,42	0,42	0,59
EG1NH2	10,02	0,28	0,43
EG31-NH2	10,82	0,47	0,37
EG30-COOH	11,02	0,32	0,35
EG36-COOH	13,34	0,53	0,37

Tab. IV.II.2-8: Mittlere LSPR-Verschiebung und zugehörige Standardabweichung; rechte Spalte: LSPR-Verschiebungsbetrag pro EG-Einheit.

Auch hier wird ein Anstieg der Resonanzverschiebung mit zunehmender Kettenlänge bzw. der Anzahl an EG-Einheiten beobachtet (s. Abb. IV.II.2-27).

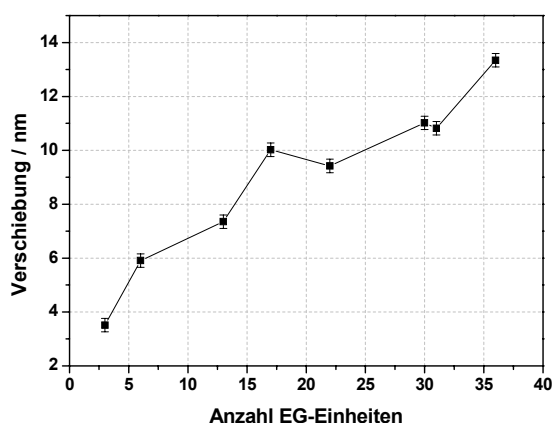


Abb. IV.II.2-27: Abhängigkeit der LSPR-Verschiebung von der Anzahl mittlerer EG-Einheiten der adsorbierten PEG-Thiole.

Die pro EG-Einheit erhaltenen Verschiebungsbeträge nehmen allerdings mit zunehmender Kettenlänge von 1,17 nm (EG3OH) bis auf 0,37 nm (EG36COOH) ab. Ursache ist, dass die adsorbierten PEG-Thiole auf den gekrümmten Nanopartikeloberflächen keine wohlgeordneten Monolagen mit einer helikalen Konformation der PEG-Ketten ausbilden können und der mit dem Molekulargewicht der polymeren Ethylenglykole ansteigende hydrodynamische Radius daher zu einer mit der Anzahl der mittleren EG-Einheiten abnehmenden Massenbelegung Γ (ng/cm²) führt. Zur Bestimmung der Sensor-Sensitivitäten ist es hier daher unerlässlich, die beobachteten Resonanz-Verschiebungen auf den Bedeckungsgrad zu normieren.

Eine einfache Mittelwertbildung der in der rechten Spalte der Tabelle IV.II.2-8 angegebenen Werte führt zu einem Verschiebungsbetrag von 0,6 nm pro EG-Einheit.

Unter Vernachlässigung des Bedeckungsgrades ergibt sich aus der Alkanthiol-Eichreihe ein Betrag von 0,3 nm pro CH₂-Einheit. Diesen Faktoren entsprechen Werte von 79,6 g/(mol*nm) (PEG-Thiole) bzw. 54,8 g/(mol*nm) (Alkan-Thiole). Der etwas höhere Wert für die PEG-Thiole ist unter Berücksichtigung der zu erwartenden niedrigeren Bedeckungen verständlich.

Insgesamt ergeben sich jedoch – trotz der unterstellten identischen Bedeckungen – sehr ähnliche Werte für beide Eichreihen. Dies führte zu der Vermutung, dass die Reaktion in Bezug auf die Belegung eventuell auch in diesem Bereich höherer Massenbelegungen als näherungsweise linear interpretiert werden kann.

Zur Analyse der Sensorantwort wurden daher auch hier die tatsächlich vorliegenden Belegungsdichten mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie bestimmt.

2.3.2 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Zur Kontrolle des Adsorptionsprozesses sowie zur Bestimmung des Bedeckungsgrades wurden XP-Spektren von den funktionalisierten Oberflächen aufgenommen.

Die Abbildung IV.II.2-28 zeigt in einer Gesamtübersicht C1s-Detailspektren von jeder adsorbierten (P)EG-Verbindung.

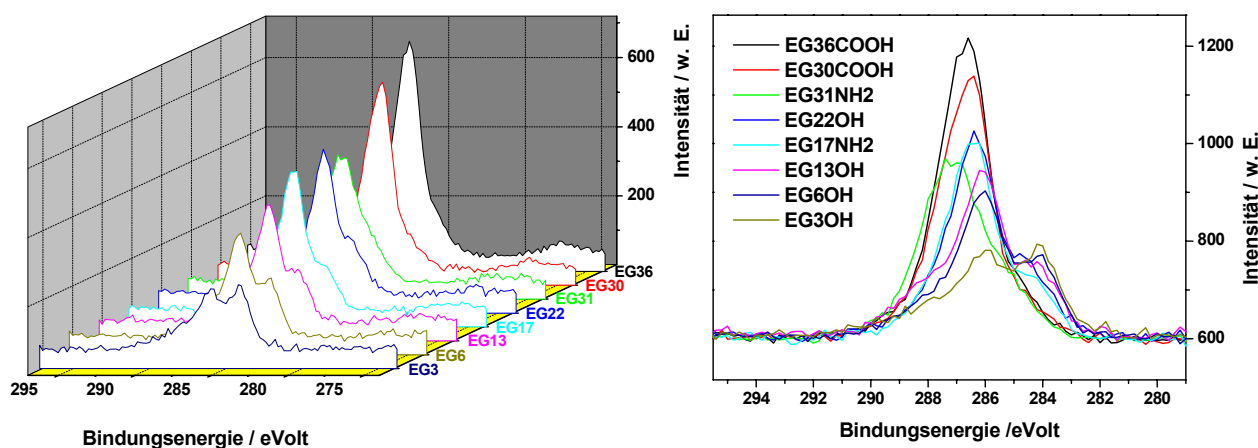


Abb. IV.II.2-28: C1s-Detailspektren der Nanopartikeloberflächen, aufgenommen nach Adsorption von PEG-Thiolen unterschiedlicher Kettenlänge.

Mit zunehmender Anzahl an Ethylenglykoleinheiten wird erwartungsgemäß ein Anstieg der C1s-Intensität beobachtet, welcher zugleich einen effektiven Adsorptionsprozess der Thiole nachweist.

Infolge auftretender Aufladungseffekte mussten alle detektierten Signale als Dubletts angepasst werden. Den auf leitendem Untergrund adsorbierten Molekülen wurden folgende Signallagen zugeordnet:

Au4f_{7/2} bei 83,6 eV, Au4f_{5/2} bei 87,3 eV; C1s-Alkyl bei 284,3 eV, C1s-Ether bei 286,3 eV und O1s-Ether bei 532,3 eV. Diese entsprechen den für planare Goldoberflächen in der Literatur angegebenen Positionen.

Zur quantitativen Auswertung der Spektren wurden die detektierten Signale mit einem Voigt-Profil angepasst und integriert. Die Anpassung der Signale erfolgte wie bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben.

Die Abbildungen IV.II.2-29 bis -36 zeigen für jede adsorbierte Verbindung einige der angepassten Au4f-, C1s- und O1s-Detailpektren.

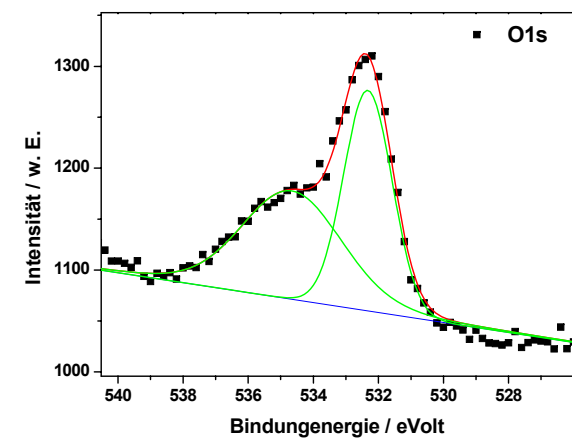
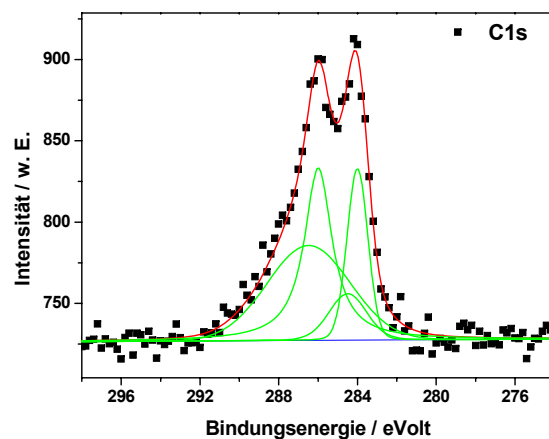
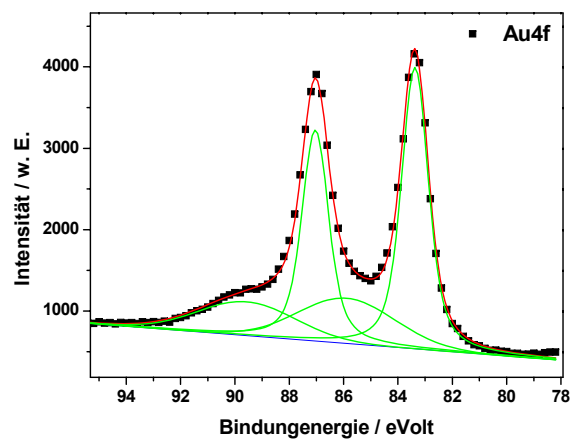


Abb. IV.II.2-29: Angepasste Au4f- (links), C1s- (Mitte) und O1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von EG3OH.

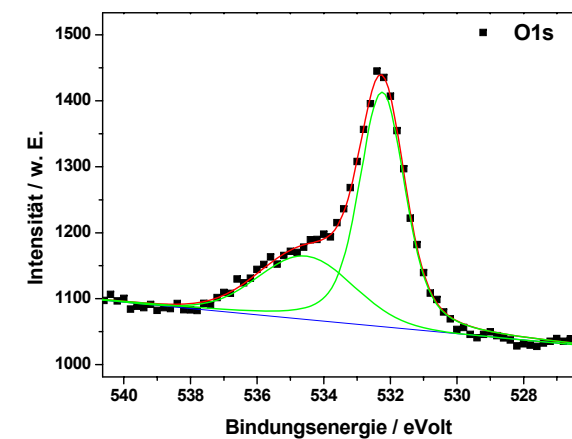
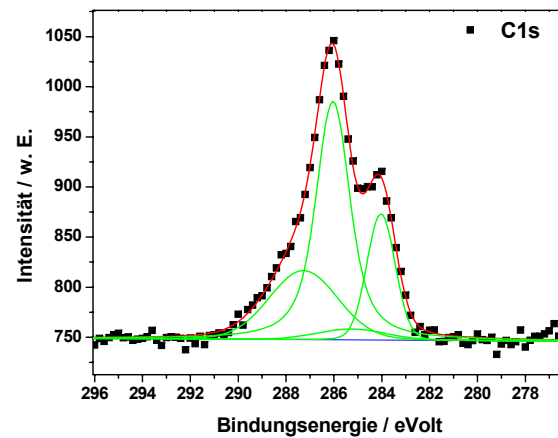
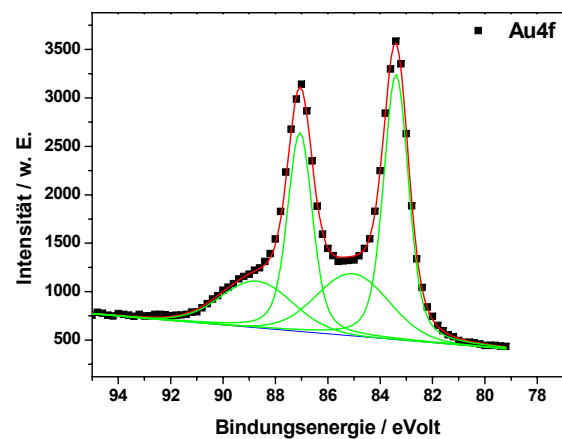


Abb. IV.II.2-30: Angepasste Au4f- (links), C1s- (Mitte) und O1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von EG6OH.

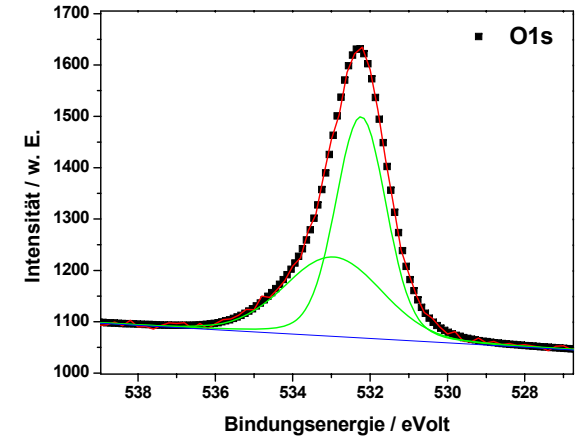
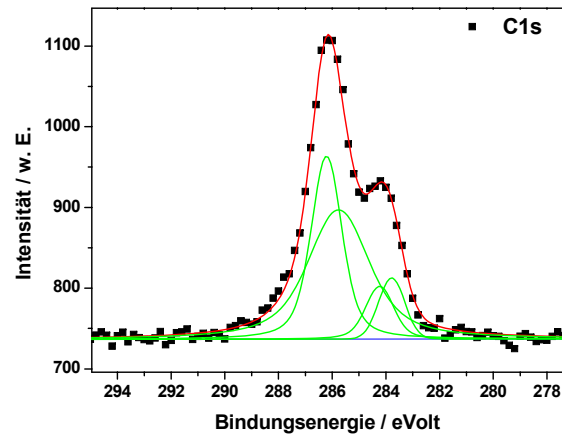
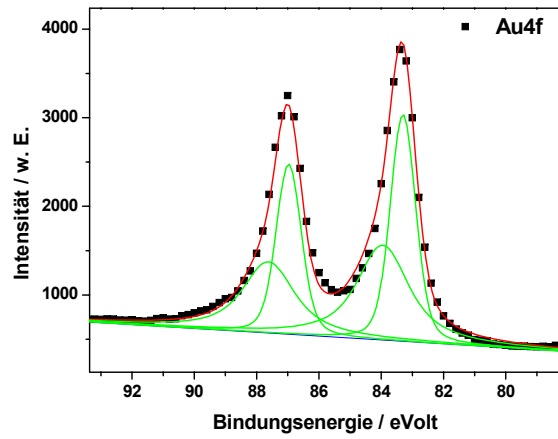


Abb. IV.II.2-31: Angepasste Au4f- (links), C1s- (Mitte) und O1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von EG13OH.

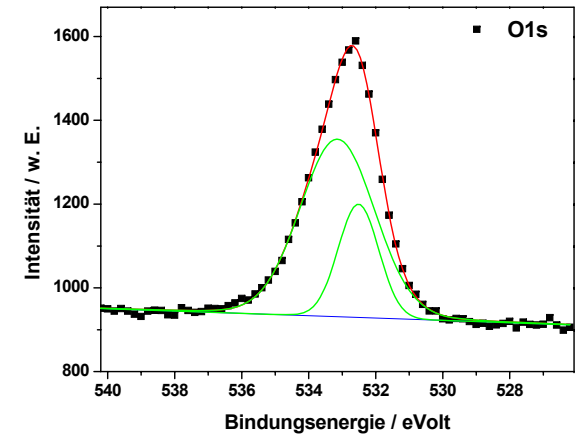
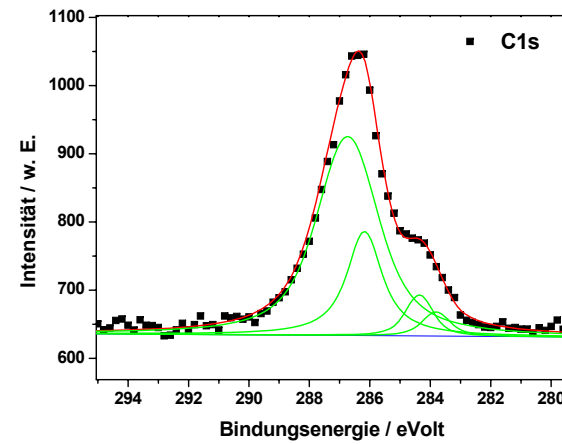
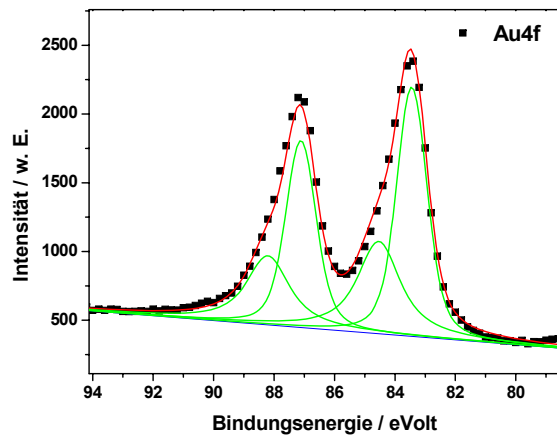


Abb. IV.II.2-32: Angepasste Au4f- (links), C1s- (Mitte) und O1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von EG17NH₂.

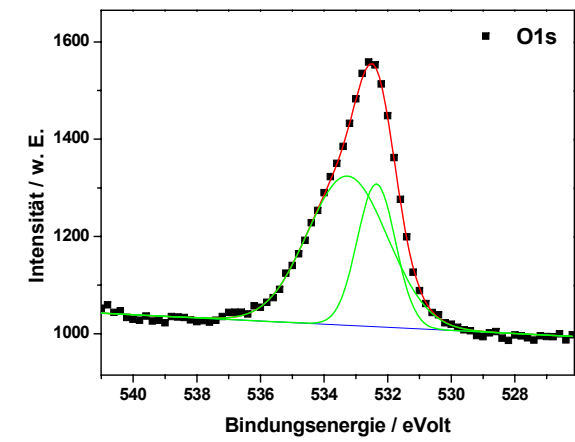
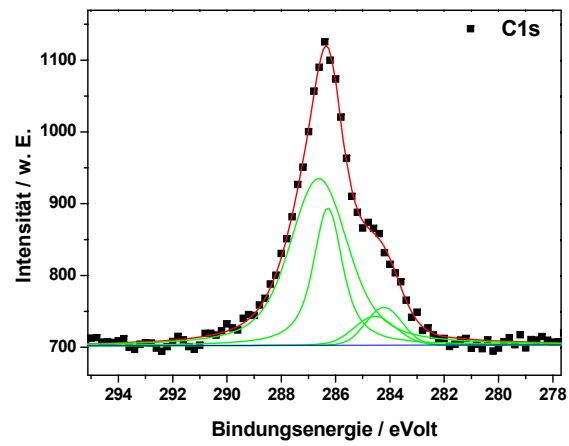
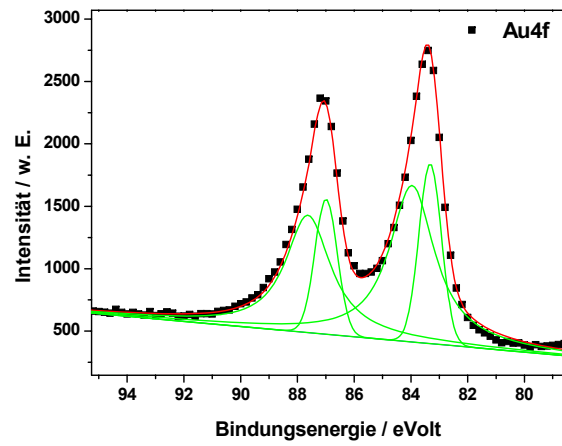


Abb. IV.II.2-33: Angepasste Au4f- (links), C1s- (Mitte) und O1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von EG2OH.

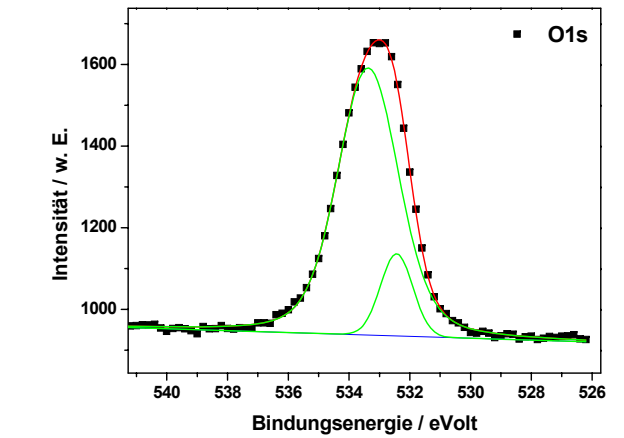
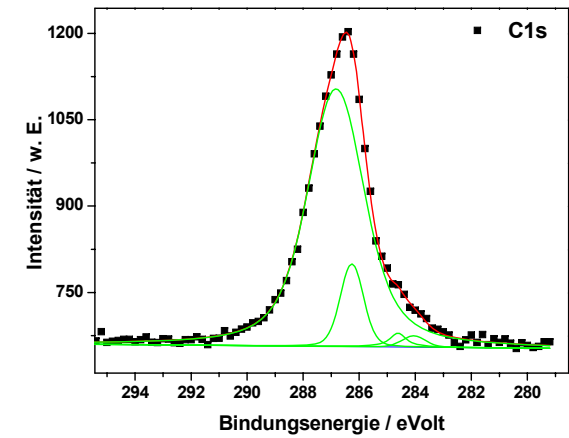
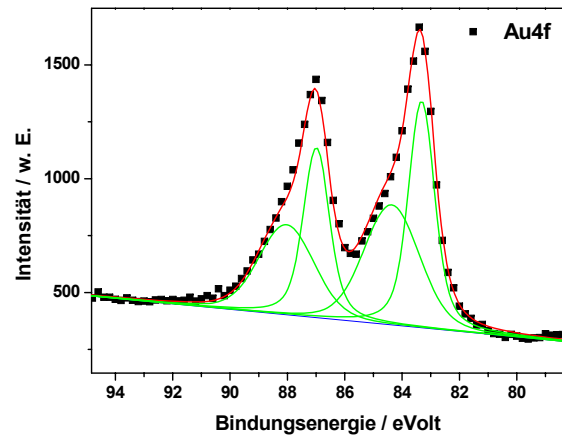


Abb. IV.II.2-34: Angepasste Au4f- (links), C1s- (Mitte) und O1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von EG30COOH.

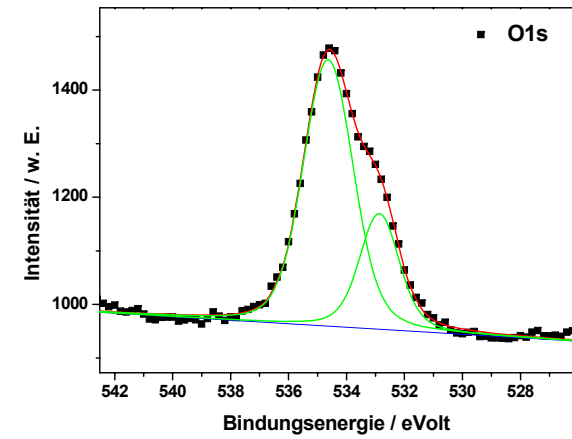
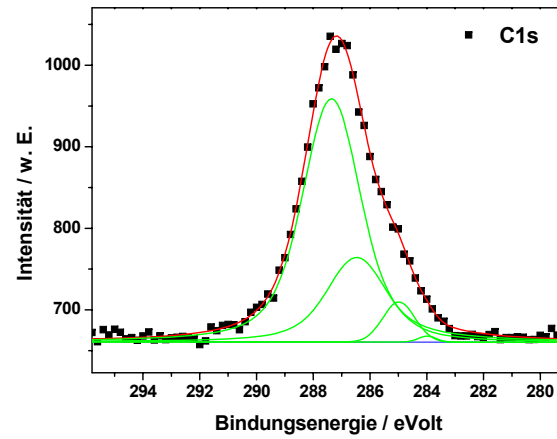
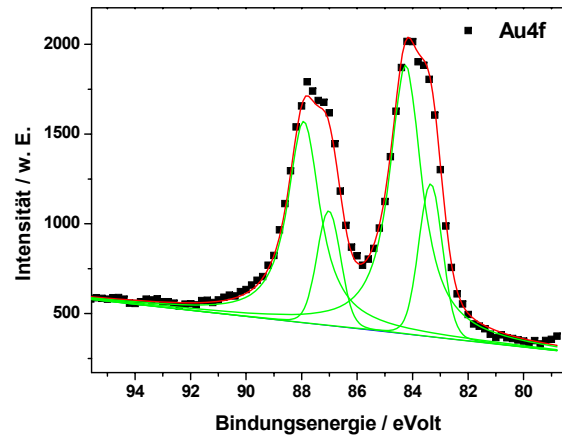


Abb. IV.II.2-35: Angepasste Au4f- (links), C1s- (Mitte) und O1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von EG31NH₂.

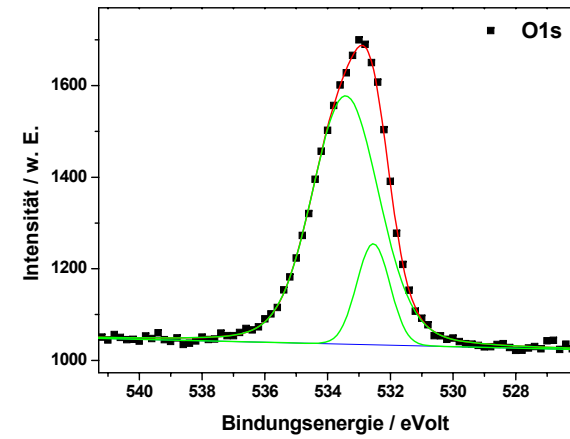
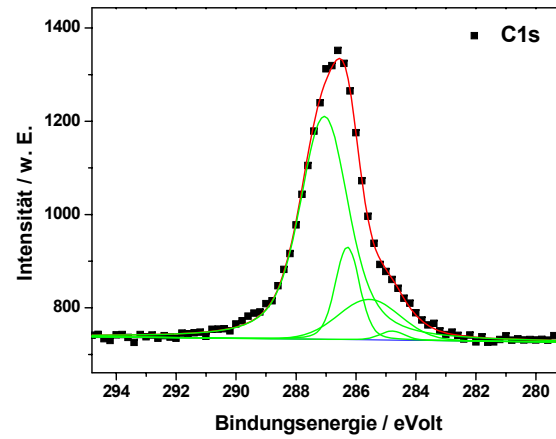
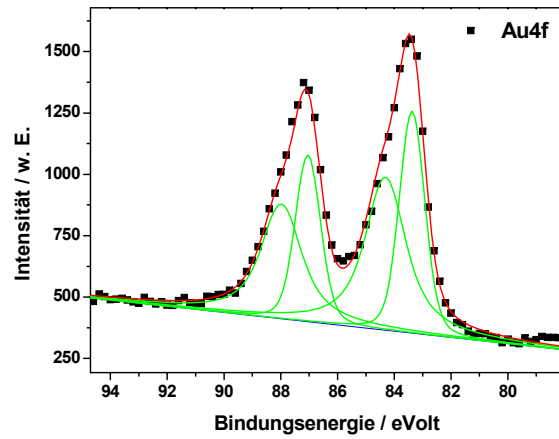


Abb. IV.II.2-36: Angepasste Au4f- (links), C1s- (Mitte) und O1s- (rechts) Detailspektren; aufgenommen nach Adsorption von EG36COOH.

Die folgende Tabelle enthält die durch Anpassung der C1s- und O1s-Detailspektren ermittelten Integrale der den Ethylenglykoleinheiten zu zuordnenden Signale eines jeden Dubletts (Positionen im nicht-aufgeladenen Zustand: C1s-Ether bei 286,3 eVolt, O1s-Ether bei 532,3 eVolt). Es wurde jeweils das Ether-C1s/O1s-Verhältnis der zueinander gehörenden Einzelsignale (leitende bzw. aufgeladene Bereiche) ermittelt. Zum Vergleich ist in der rechten Spalte der Tabelle IV.II.2-9 außerdem das theoretisch zu erwartende Ether-C/O-Verhältnis angegeben.

<i>Thiol</i>	<i>Leitender Untergrund</i>			<i>Aufgeladene Bereiche</i>			<i>Gesamtes</i>	<i>Soll</i>
	<i>C1s</i>	<i>O1s</i>	<i>C1s/O1s</i>	<i>C1s</i>	<i>O1s</i>	<i>C1s/O1s</i>	<i>C1s/O1s</i>	<i>C1s/O1s</i>
EG3OH	61,6	403,1	1,61	282,7	438,3	1,90	1,75	1,75
EG6OH	67,4	610,4	2,06	455,0	551,0	1,68	1,86	1,86
EG13OH	390,1	530,2	1,93	591,4	2038,5	1,93	1,93	1,93
EG17NH2	327,8	400,8	1,98	976,8	1226,3	2,04	2,00	2,06
EG22OH	353,2	400,6	2,00	776,4	968,6	2,00	2,00	1,96
EG30COOH	160,2	210,3	1,90	1402,9	1842,4	1,90	1,90	1,88
EG31NH2	343,9	428,7	2,11	945,8	1180,3	2,12	2,00	2,03
EG36COOH	221,9	291,4	1,90	1199,4	1575,1	1,90	1,90	1,90

Tab. IV.II.2-9: Ether-C1s- und Ether-O1s-Intensitäten sowie das berechnete Ether-C/O-Verhältnis der auf leitendem und aufgeladenem Probenuntergrund adsorbierten (P)EG-Thiole.

Sowohl für die auf leitendem als auch auf geladenem Untergrund adsorbierten Anteile stimmen die über die Anpassung ermittelten Ether-C/O-Verhältnisse gut mit den jeweiligen Sollwerten überein. Verunreinigungen der Oberflächen können somit ausgeschlossen und die detektierten Signale eindeutig den adsorbierten Verbindungen zugeordnet werden.

Eine quantitative Auswertung der Daten erfolgte auch hier über die Abschwächung der Substratintensität (Au) nach Gleichung (105) und der Bestimmung einer effektiven C-Atomanzahl (ECA) anhand des sich für den Beitrag $\theta \cdot ACA$ ergebenden Wertes. Die erhaltene ECA-Zahl gibt dabei die Anzahl der C-Atome derjenigen vollständig geordneten ($\theta = 1$) Alkanthiolmolekölage an, welche zu einer identischen Abschwächung der Substratlage geführt hätte.

Die Tabelle IV.II.2-10 enthält für jede (P)EG-Verbindung die berechnete Anzahl effektiver C-Atome (ECA) sowie die gesamte C1s- und O1s-Intensität (inklusive Aufspaltungsbetrag).

<i>Thiol</i>	<i>Effektive Anzahl C-Atome</i>	<i>Gesamte C1s-Intensität</i>	<i>Gesamte O1s-Intensität</i>
EG3OH	10,56	805,83	841,32
EG6OH	17,06	1030,89	1071,75
EG13OH	22,95	1172,22	1268,87
EG17NH2	31,33	1441,66	1627,07
EG22OH	28,41	1296,91	1409,23
EG30COOH	33,65	1611,08	2052,66
EG31NH2	31,36	1365,72	1609,02
EG36COOH	43,13	1666,19	1866,51

Tab. IV.II.2-10: Mittlere LSPR-Verschiebung und zugehörige Standardabweichung; LSPR-Verschiebungsbetrag pro EG-Einheit.

Die folgende Graphik zeigt den Zusammenhang zwischen dem mit der Anzahl der effektiven C-Atome verbundenen Anstieg der gesamten C1s-Intensität für die adsorbierten PEG-Thiole (schwarze Punkte); zum Vergleich ist außerdem der bei der Adsorption der Alkanthiole beobachtete und in der Abbildung IV.II.2-18 bereits dargestellte Verlauf mit angegeben (rote Punkte).

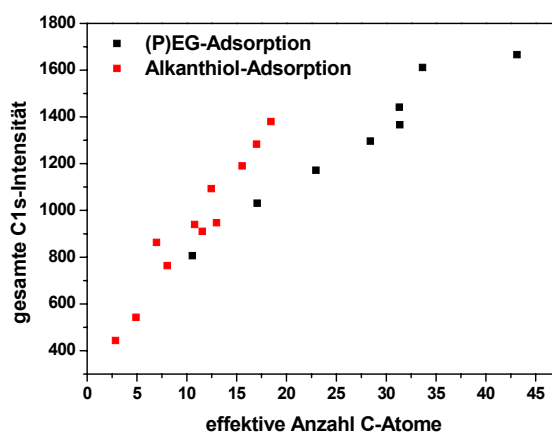


Abb. IV.II.2-37: Abhängigkeit der gesamten C1s-Intensität von der Anzahl effektiver C-Atome für die Alkanthiol- (schwarz) und (P)EG-Thiol-Adsorption (rot).

Für die PEG-Thiole wird erwartungsgemäß ein geringerer Anstieg der gesamten C1s-Intensität festgestellt, da der zusätzliche Abschwächungsbeitrag der Substratintensität, welcher durch die moleküleigenen O₂-Atome bedingt ist, hier nicht berücksichtigt wird.

Ein Vergleich dieser Daten mit denen der Alkanthiol-Eichreihe ermöglicht jedoch eine Überprüfung der bei der Datenauswertung unterstellten Annahme identischer Substratabschwächungsbeiträge für beide Atomarten. Dies ist möglich, da von einer statistisch homogenen Verteilung der Ether-C- und Ether-O-Atome in der PEG-Matrix ausgegangen werden kann (statistisches Modell; s. Kap. II.III Abs. 1). Unter Berücksichtigung der atomspezifischen Wirkungsquerschnitte σ und der Abschwächungslängen λ wurden daher nach

$$I_{i, \text{kor}} = \frac{I_i}{\lambda_i \cdot \sigma_i} \quad (111)$$

korrigierte Ether-C- und Ether-O-Intensitäten für die PEG-Thiole sowie eine korrigierte Alkyl-C-Intensität für die Alkanthiole bestimmt (C_{kor} und O_{kor}). Im Fall ähnlicher Abschwächungsbeiträge sollte der Verlauf der korrigierten, gesamten Ether-(C+O)-Intensität in Abhängigkeit von der Anzahl effektiver C-Atome dem Verlauf der Alkyl-C-Intensität ebenfalls ähnlich sein.

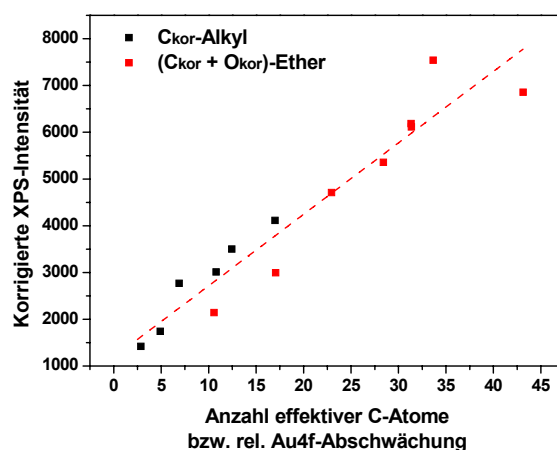


Abb. IV.II.2-38: Abhängigkeit der korrigierten XPS-Intensität von der effektiven C-Atom-Anzahl.

Beide Datenreihen verlaufen tatsächlich sehr ähnlich, so dass näherungsweise von gleichen Abschwächungsbeiträgen für beide Atomarten ausgegangen werden kann.

Die Abbildungen IV.II.2-39 zeigen Au4f- und C1s-Detaillspektren, welche jeweils mit und nach anschließender oxidativer Ablösung einer adsorbierten EG36COOH-Monolage aufgenommen wurden.

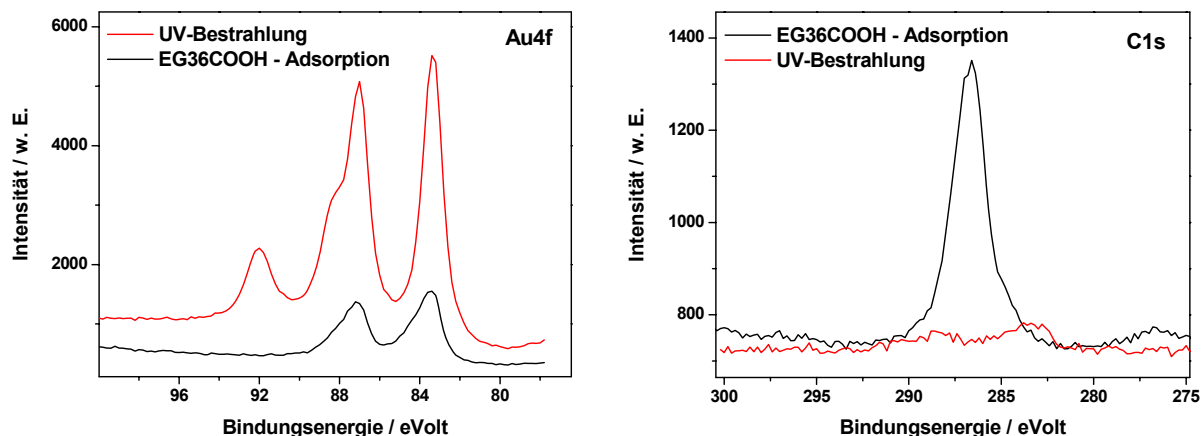


Abb. IV.II.2-39: Au4f- und C1s-Detailspektren, aufgenommen nach Adsorption von EG36COOH (rot) und einer 1-stündigen UV-Bestrahlung (schwarz).

Auch hier wurde nach der UV-Bestrahlung teilweise ein starker Anstieg der Ladungsaufspaltung von etwa 1 bis auf maximal 6 eV festgestellt. Die Bestimmung der Schichtdicken erfolgte nach Gleichung (104). In der Tabelle IV.II.2-11 ist für jede adsorbierte Spezies die mittlere Schichtdicke sowie die vor und nach der UV-Bestrahlung durch Anpassung der Spektren ermittelte Ladungsaufspaltung der C1s-, O1s- und Au4f-Signale angegeben.

<i>Thiol</i>	<i>Schicht-dicke /Å</i>	<i>C1s-Aufspaltung vor UV / eV</i>	<i>O1s-Aufspaltung vor UV / eV</i>	<i>Au4f-Aufspaltung vor UV / eV</i>	<i>Au4f-Aufspaltung nach UV / eV</i>
EG3OH	13,00	1,14	2,34	2,53	6,00
EG6OH	20,59	1,66	1,23	2,30	5,76
EG13OH	28,24	0,45	0,71	0,65	3,67
EG17NH2	38,53	0,56	0,63	1,09	3,67
EG22OH	34,95	0,64	0,33	0,91	3,67
EG30COOH	41,04	0,60	0,88	1,04	4,58
EG31NH2	38,98	1,00	1,77	0,90	3,47
EG36COOH	53,06	0,77	0,89	0,94	4,96

Tab. IV.II.2-11: XP-basierende mittlere Schichtdicken; C1s-, O1s-, und Au4f-Ladungsaufspaltung vor und Au4f-Ladungsaufspaltung nach der UV-Bestrahlung.

Auch hier wurde nach Gleichung (105) zunächst bestimmt, welcher vollständig geordnete Alkanthiofilm zu einer identischen Abschwächung des Au4f-Substratsignals geführt hätte.

Mit Hilfe der auf diese Weise bestimmten effektiven Anzahl an C-Atomen (ECA) und der Gesamtzahl tatsächlich im Molekül enthaltener C- und O-Atome (C+O) wurde anschließend der Bedeckungsgrad der Oberflächen nach

$$\theta = \frac{ECA}{\sum(C+O)} \quad (112)$$

berechnet. Dies ist möglich, da das Au4f-Substratsignal durch C- und O-Atome etwa gleich stark abgeschwächt wird. Es handelt sich also hierbei um einen Relativwert, welcher sich auf die Bedeckung vollständig geordneter Alkanthiolmonolagen bezieht, für welche $\theta = 1$ gesetzt wird.

Auf Basis dieser Werte konnte somit auch hier eine theoretische LSPR-Verschiebung für den Fall $\theta = 1$ berechnet werden.

In der Tabelle IV.II.2-12 sind für jede adsorbierte Spezies die effektive C-Zahl, die Gesamtzahl moleküleigener C- und O-Atome, der ermittelte Bedeckungsgrad θ der Oberflächen sowie die beobachtete und für den Fall $\theta = 1$ theoretisch zu erwartende LSPR-Verschiebung angegeben.

<i>Thiol</i>	<i>XPS-Messungen</i>			<i>(L)SPR-Messungen</i>	
	<i>Effektive Anzahl C-Atome</i>	<i>Gesamtzahl C- und O-Atome</i>	<i>Bedeckungsgrad θ</i>	<i>Verschiebung $\Delta\lambda_{max} / nm$</i>	<i>Verschiebung $\Delta\lambda_{\theta=1} / nm$</i>
EG3OH	10,56	21	0,50	3,51	7,02
EG6OH	17,06	30	0,57	5,91	10,37
EG13OH	22,95	51	0,45	7,35	16,33
EG17NH2	31,33	62	0,50	10,02	20,04
EG22OH	28,41	78	0,36	9,42	26,17
EG30COOH	33,65	106	0,32	11,02	34,44
EG31NH2	31,36	104	0,30	10,82	26,17
EG36COOH	43,13	124	0,35	13,34	34,44

Tab. IV.II.2-12: Röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelter Bedeckungsgrad sowie die beobachtete und auf den Bedeckungsgrad normierte LSPR-Verschiebungen.

Der Bedeckungsgrad der funktionalisierten Oberflächen nimmt mit zunehmender Kettenlänge der adsorbierten (P)EG-Thiole erwartungsgemäß ab. Für die kürzeren Oligoethylenglykol-Verbindungen EG3- und EG6OH liegt dieser zwischen etwa 50 – 60% und nimmt bei den polymeren Verbindungen aufgrund des größeren Platzbedarfs pro Moleküleinheit bis

auf etwa 33% bei einer mittleren EG-Anzahl von ca. 30 Einheiten ab. Auf Gold-bedampften Si-Wafern wurden dagegen von Herrwerth et. al auf analogem Wege Bedeckungen von 81 und 74% für EG3OH bzw. EG6OH und von 53% für EG33COOH ermittelt [245]. Auf den gekrümmten Nanopartikeloberflächen fällt der Bedeckungsgrad somit um etwa 10-20% niedriger aus, da die Polymerketten schlechter miteinander in Wechselwirkung treten können. Eine Auftragung der auf den Bedeckungsgrad normierten theoretischen LSPR-Verschiebung ($\Delta\lambda_{\theta=1}$) gegen die Anzahl der EG-Einheiten der adsorbierten (P)EG-Thiole bestätigt auch hier die Vermutung eines linearen Zusammenhangs zwischen Massenbelegung und Sensorantwort. Zum Vergleich sind in der Abb. IV.II.2-40 ebenfalls die bereits in Abb. IV.II.2-27 dargestellte nicht-normierte LSPR-Verschiebungen mit aufgetragen.

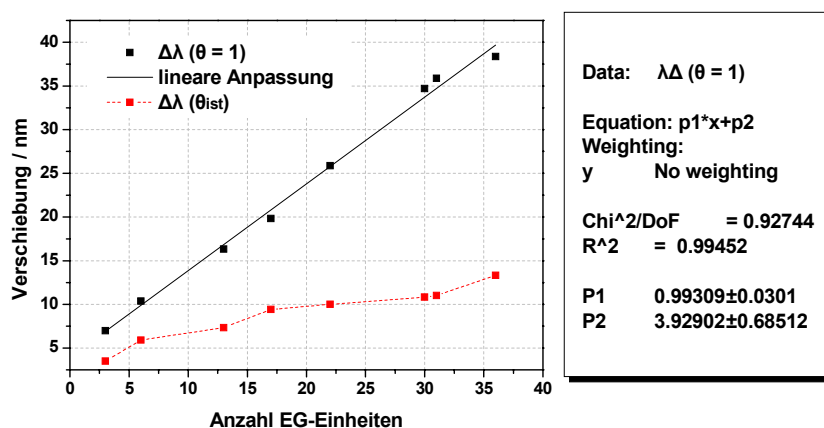


Abb. IV.II.2-40: Abhängigkeit der beobachteten (rot) und auf den Bedeckungsgrad normierten (schwarz) LSPR-Verschiebung von der Anzahl mittlerer EG-Einheiten der adsorbierten PEG-Thiole.

Die auf den Bedeckungsgrad normierten Verschiebungswerte zeigen erkennbar einen linearen Zusammenhang zur Anzahl der EG-Einheiten und somit zur Massenbelegung der Oberfläche.

Eine lineare Anpassung der Daten führt zu einem Verschiebungsbetrag von etwa 0,99 nm pro EG-Einheit. Die Daten der Alkanthiol-Eichreihe ergaben dagegen einen Betrag von etwa 0,32 nm pro CH₂-Einheit. Da sich diese Werte auf den gleichen Bedeckungsgrad beziehen ($\theta = 1$), können sie direkt miteinander verglichen werden. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Molekulargewichts beider Molekülfragmente (CH₂ = 16 g/mol; EG = 44 g/mol) folgen hieraus Werte von 43,3 g/(mol*nm) (Alkanthiole) bzw. von 44,3 g/(mol*nm) (PEG). Somit kann die Sensor-Reaktion auch in diesem Bereich höherer Massenbelegungen bis zu 485,6 ng/(cm²*nm) ($\theta_{EG36} * \Gamma_{\theta=1,EG36}$) näherungsweise durch eine lineare Funktion approximiert werden.

Analog zur Alkanthiolreihe können daher über eine lineare Anpassung der Daten mit Hilfe der normierten LSPR-Verschiebung ($\Delta\lambda_{\theta=1}$) Sensitivitätsfaktoren für die Sensoroberflächen in

Bezug auf Massenbelegung ($(\text{nm} \cdot \text{mm}^2)/\text{ng}$) und Schichtdicke ($\text{nm}/\text{\AA}$) der Adsorbatlage bestimmt werden. Die für den Fall $\theta = 1$ theoretisch zu erwartenden Massenbelegungen $\Gamma_{\theta=1}$ wurden nach Gleichung (110) berechnet; sie sind zusammen mit den auf den Bedeckungsgrad normierten LSPR-Verschiebungen in der Tabelle IV.II.2-13 aufgeführt.

<i>Thiol</i>	<i>Massenbelegung</i> $\Gamma_{\theta=1} / \text{ng}/\text{cm}^2$	<i>Verschiebung</i> $\Delta\lambda_{\theta=1} / \text{nm}$
EG3OH	260,7	6,98
EG6OH	363,2	10,39
EG13OH	602,1	16,33
EG17NH2	738,7	19,83
EG22OH	909,4	25,86
EG30COOH	1182,6	34,71
EG31NH2	1216,7	35,88
EG36COOH	1387,4	38,36

Tab. IV.II.2-13: Auf den Bedeckungsgrad normierte Massenbelegung und LSPR-Verschiebung.

Die Auftragung von $\Delta\lambda_{\theta=1}$ gegen die Massenbelegung $\Gamma_{\theta=1}$ der vollständig geordneten Monolagen führt über eine lineare Anpassung zu einem Eichfaktor, mit dessen Hilfe unbekannte Massenbelegungen ermittelt werden können.

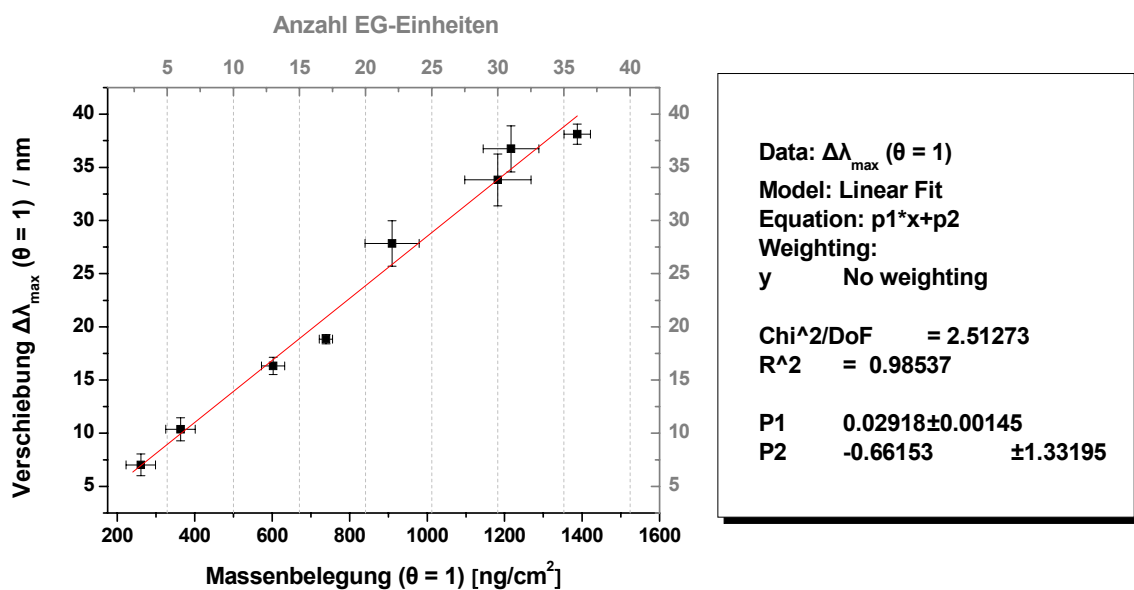


Abb. IV.II.2-41: Bestimmung des Eichwertfaktors bezüglich der Massenbelegung durch lineare Anpassung.

Die LSPR-aktiven Sensoroberflächen zeichnen sich daher in dem betrachteten Bereich von Massenbelegungen bis zu $485,6 \text{ ng/cm}^2$ ($\theta_{\text{EG36}} * \Gamma_{\theta=1, \text{EG36}}$) durch einen linearen Antwortbereich aus, der durch einen Sensitivitätsfaktor von $2,92 \text{ (nm*mm}^2\text{)/ng}$ beschrieben werden kann. Hier ergibt sich allerdings ein negativer Offset; auch bei den in [117] durchgeführten Eichreihen ergaben sich negative Achsenabschnitte, die auf eine Erhöhung der Elektronendichte durch mit dem Adsorptionsprozess verbundene Charge-Transfer-Wechselwirkungen zurückgeführt wurden. Werden die Daten durch den Nullpunkt angepasst, so ergibt sich ein Eichwert von $2,85 \text{ (nm*mm}^2\text{)/ng}$, der sehr gut mit den Entsprechenden der Alkanthiol-Eichreihe $2,9 \text{ (nm*mm}^2\text{)/n}$ übereinstimmt (s. Abschnitt 2.2)

Auf analoge Weise konnte durch eine Auftragung der normierten Verschiebung gegen die für den Fall $\theta = 1$ zu erwartenden Schichtdicken ein Eichfaktor zur Bestimmung von Adsorbatschichtdicken ermittelt werden.

Eine lineare Anpassung der Daten ergab einen Sensitivitätsfaktor von $0,262 \text{ nm/Å}$, der sehr gut mit dem Wert der Alkanthiol-Eichreihe ($3,92 \text{ nm/Å}$) übereinstimmt.

Innerhalb des betrachteten Bereiches von Schichtdicken bis zu $53,06 \text{ Å}$ ($\theta_{\text{EG36}} * d_{\theta=1, \text{EG36}}$) kann daher näherungsweise von einem linearen Zusammenhang zwischen Sensorantwort und der Schichtdicke der Adsorbatschicht ausgegangen werden.

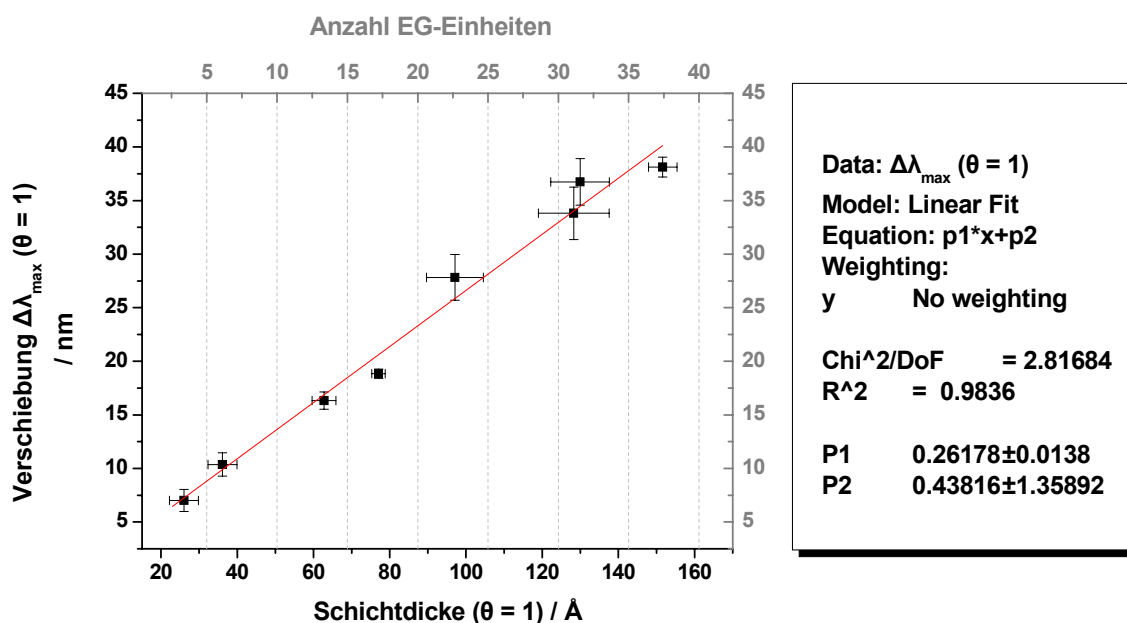


Abb. IV.II.2-42: Bestimmung des Eichwertfaktors bezüglich der Schichtdicke durch lineare Anpassung.

Die Daten beider Eichreihen (Adsorption von Alkan- bzw. (P)EG-Thiolen) wurden daher zur Bestimmung gemittelter Eichfaktoren vereint. Da kein eindeutiger Trend zu positiven oder negativen Offsetbeträgen erkennbar ist (was eventuell auf zu hohe Fehlerbreiten zurückgeführt werden kann), wurden die Daten durch den Nullpunkt angepasst.

Eine Auftragung der Schichtdicke ($d_{\theta=1}$) gegen die auf den Bedeckungsgrad normierte LSPR-Verschiebung führte über eine lineare Anpassung der Daten zu einem Eichwertfaktor von $0,266 \text{ nm}/\text{\AA}$.

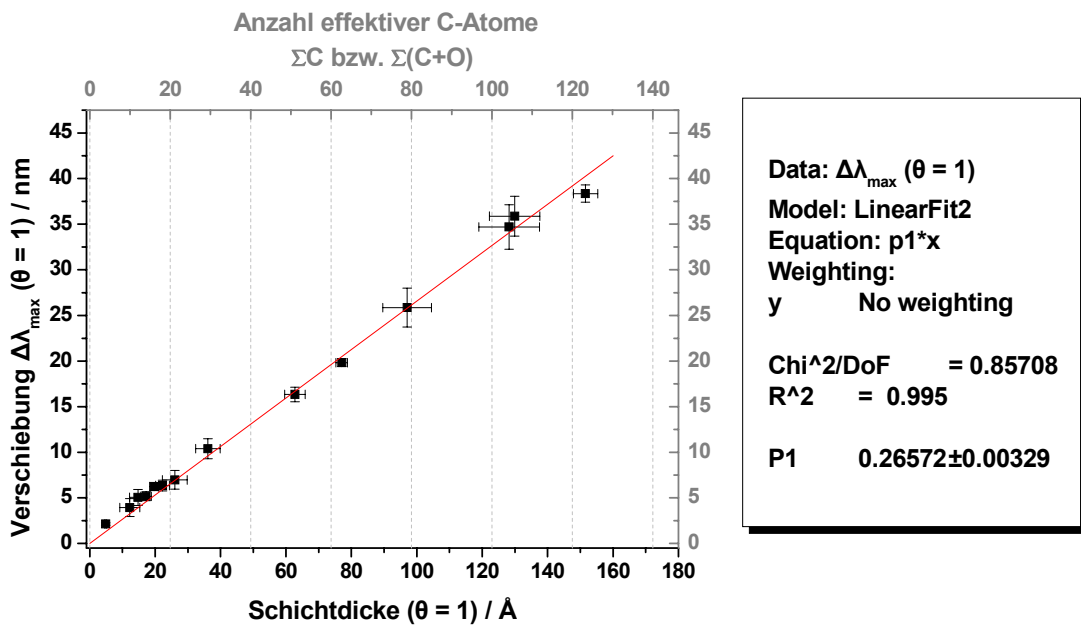


Abb. IV.II.2-43: Lineare Abhängigkeit der auf den Bedeckungsgrad normierten LSPR-Verschiebung von der Schichtdicke der Adsorbatlage unter Berücksichtigung der aus der Alkanthiol- und PEG-Reihe erhaltenen Daten.

Eine lineare Anpassung von $\Delta\lambda_{\theta=1}$ in Abhängigkeit von der Massenbelegung $\Gamma_{\theta=1}$ ergibt einen Sensitivitätsfaktor von $2,85 \text{ (nm} \cdot \text{mm}^2\text{)}/\text{ng}$.

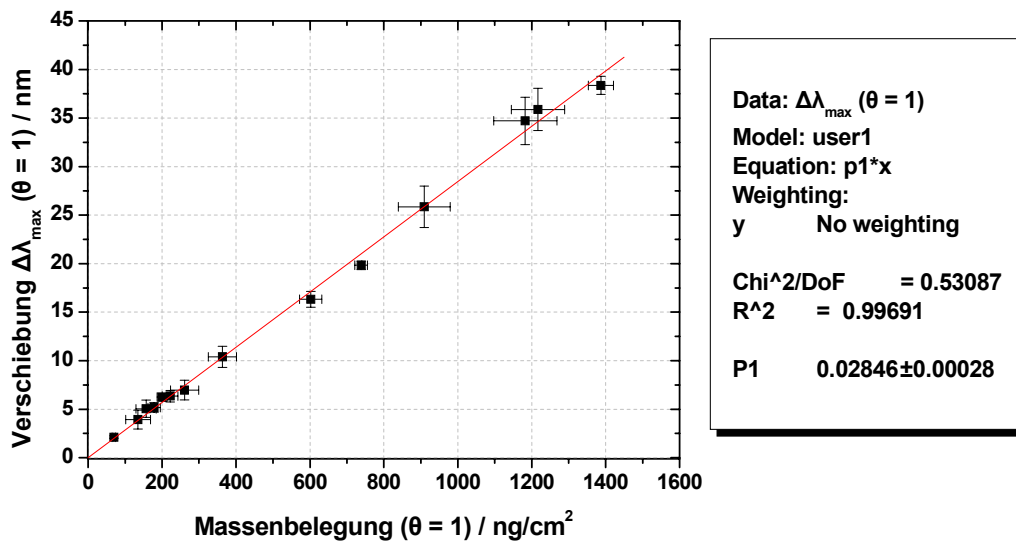


Abb. IV.II.2-44: Lineare Abhängigkeit der auf den Bedeckungsgrad normierten LSPR-Verschiebung von der Massenbelegung der Adsorbatlage unter Berücksichtigung der aus der Alkanthiol- und PEG-Reihe erhaltenen Daten.

2.4 Fazit zu den Eichwertmessungen

Die beschriebenen Eichmessungen zeigen, dass die Reaktion der LSPR-aktiven Sensoroberflächen in Bezug auf Massenbelegung und Schichtdicke der Adsorbatlage in dem betrachteten Messbereich von Schichtdicken bis zu 53,1 Å und Massenbelegungen bis zu 485,6 ng/cm² durch eine lineare Funktion beschrieben werden kann.

Die Abschwächungslänge des sich an der Oberfläche ausbildenden und zur Detektion genutzten evaneszenten Feldes muß also in diesem System, von welchem vermutet wird, dass seine optischen Eigenschaften auf einer Wechselwirkung zwischen lokalisierten und propagierenden Oberflächenplasmonen-Resonanzen beruhen, mindestens 100 nm betragen (s. Abb. IV.II.2-45). Höhere Abschwächungslängen hätten über eine stärkere Feldstärkenabnahme dagegen mit zunehmendem Abstand

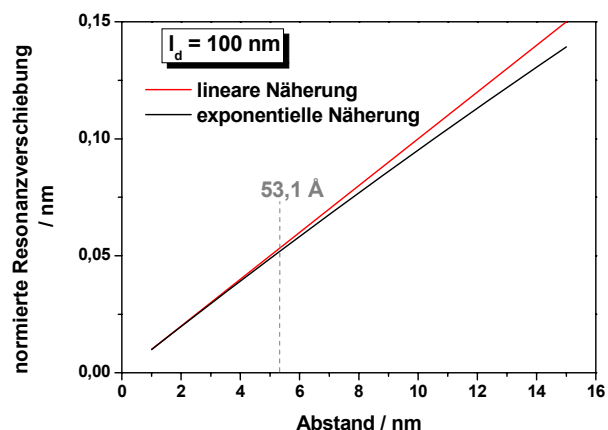


Abb. IV.II.2-45: Verlauf der linear (rot) und exponentiell (schwarz) genäherten Sensorantwort bei einer Abschwächungslänge von $l_d = 100$ nm.

von der Oberfläche zu einer verminderten und somit nicht mehr linear verlaufenden Sensorantwort geführt. Bei einer Abschwächungslänge von 100 nm beträgt die Abweichung zur exponentiellen Näherung dagegen nur etwa 2,6 %.

Analog zur konventionellen SPR-Spektroskopie kann daher im Bereich mittlerer Massenbelegungen eine quantitative Interpretation der beobachteten Resonanzverschiebung für diese LSPR-aktiven Systeme (in dem angegebenen Messbereich) näherungsweise durch die lineare Näherung der Gleichung (22) bzw. (64) beschrieben werden.

3 Detektion biospezifischer Wechselwirkungen

3.1 Detektion von Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen

Die beschriebenen LSPR-aktiven Sensoroberflächen wurden zur Demonstration eines möglichen Einsatzes in der biomedizinischen Diagnostik in verschiedenen immunodiagnostischen Anwendungen zur Detektion biospezifischer Wechselwirkungen eingesetzt.

Nach geeigneter Funktionalisierung der Sensoroberflächen wurden zunächst Antikörper in diese Schichten integriert und die Bindung des spezifischen Antigens über die Verschiebung der LSP-Resonanzlage analysiert.

Nach jedem Kopplungsschritt wurden LSPR-Spektren aufgenommen und die Massenbelegung und Schichtdicke anhand der zuvor ermittelten Eichwertfaktoren (s. Kap. IV.II Abs. 2) bestimmt. Zur Kontrolle der einzelnen Funktionalisierungsschritte sowie zur unabhängigen Verifikation der ermittelten Massenbelegungen wurden zusätzlich Röntgenphotoelektronenspektren von jeder Stufe aufgenommen und XP-basierende Schichtdicken berechnet. Durch Verwendung Peroxidase-markierter Antikörper konnten die Antikörper-Kopplungen zudem über enzymkinetische (ELISA-) Messungen quantifiziert und die erhaltene Massenbelegung mit den LSPR-basierenden Werten verglichen werden.

3.1.1 Verwendung nicht-proteinresistenter Matrices

Zur Integration der IgG-Rezeptoren wurden zunächst nicht-proteinresistente Matrizen verwendet (Abschnitt 3.1.1); anschließend wurden die in Kapitel IV.I beschriebenen proteinresistenten amino- und carboxyterminierten PEG-Thiole als Basis zum Aufbau dieser Immunoassays eingesetzt; s. Abschnitt 3.1.2.

3.1.1.1 Antikörper-Kopplung an C15COOH-terminierte Oberflächen

In der Abbildung IV.II.3-1 sind die einzelnen Funktionalisierungsschritte schematisch dargestellt.

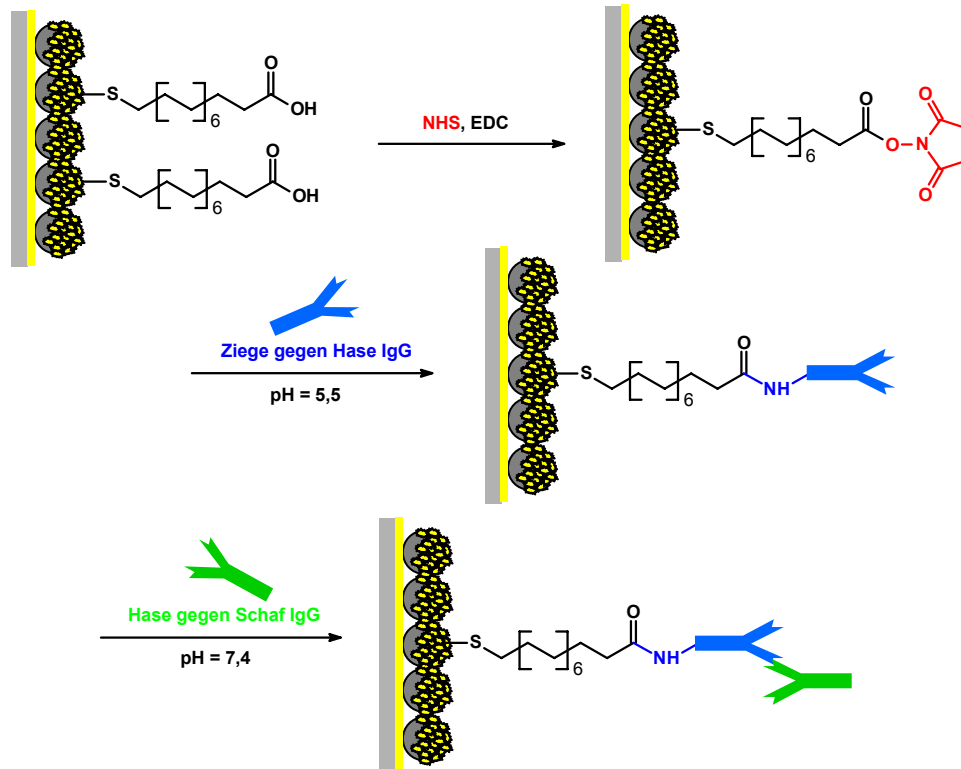


Abb. IV.II.3-1: Kovalente Bindung von Antikörpern an C15COOH-terminierte Nanopartikeloberflächen und Umsetzung mit dem spezifischen Antigen.

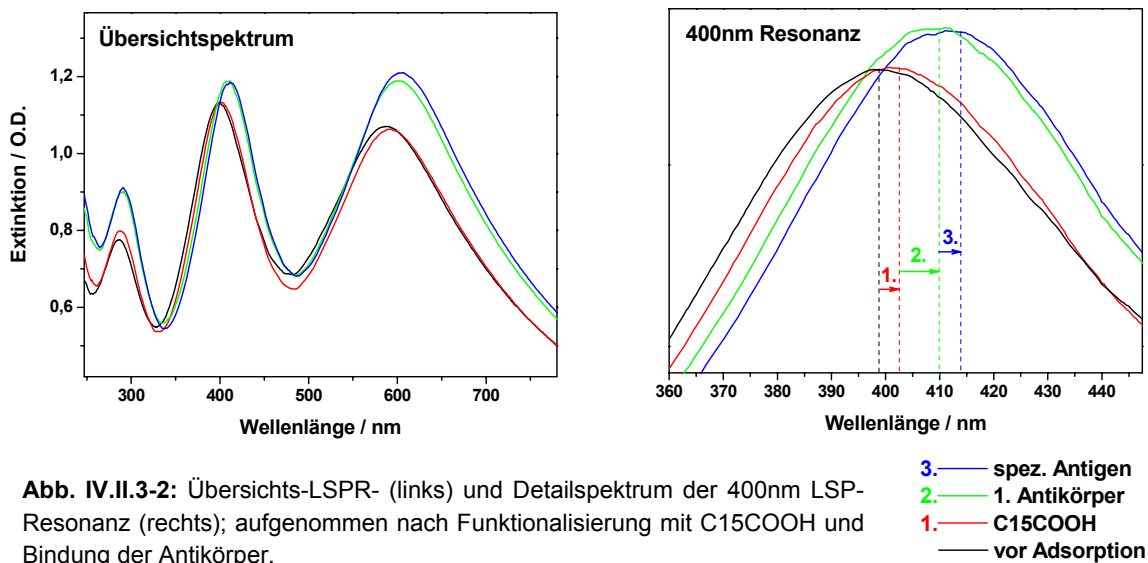
Die Nanopartikeloberflächen wurden zunächst unter Ausbildung selbstordnender Monolagen mit dem carboxyterminierten Alkanthiol C15COOH funktionalisiert (1). Nach einer Aktivierung der COOH-Gruppen zum N-Hydroxysuccinimid-Aktivester durch Behandlung mit NHS/EDC⁷ konnte der Peroxidase-markierte Erstantikörper (Ziege-anti-Hase-IgG) kovalent gebunden werden (2). Anschließend wurde mit dem spezifischen Antigen (Hase-anti-Schaf-IgG) umgesetzt (3).

LSPR-Messungen

Nach jeder Kopplungsstufe wurden Extinktions-Spektren aufgenommen und die Lage des Absorptionsmaximums der bei ca. 300, 400 und 600 nm auftretenden LSP-Resonanzen bestimmt. Die Abbildung IV.II.3-2 zeigt die von einem ProbenSpot nach den beschriebenen Funktionalisierungsschritten aufgenommenen LSPR-Spektren. Gezeigt sind jeweils ein

⁷ NHS = N-Hydroxysuccinimid; EDC = N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide

Übersichtsspektrum sowie als Detail-Ausschnitt die bei etwa 400 nm auftretende LSP-Resonanz.



In der Tabelle IV.II.3-1 sind die absoluten Verschiebungsbeträge aufgeführt; diese beziehen sich jeweils auf die vorangehende Funktionalisierungsstufe (1, 2 bzw. 3) und entsprechen einer Mittelwertbildung aus 6 bis maximal 12 ausgewerteten Extinktionsspektren.

	<i>LSPR bei 300 nm</i>		<i>LSPR bei 400 nm</i>		<i>LSPR bei 600 nm</i>	
<i>Stufe</i>	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>
C15COOH	1,46	0,64	3,93	1,69	5,12	1,90
1AK	2,71	0,93	7,17	1,13	9,53	3,11
2AK	0,82	0,45	2,22	1,16	2,80	1,18

Tab. IV.II.3-1: Mittlere LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm und zugehörige Standardabweichung nach Funktionalisierung mit C15COOH und Bindung der Antikörper.

Die 3 Extinktionsmaxima werden unterschiedlichen Multipolschwingungen zugeordnet. Die Resonanz bei etwa 300 nm zeigt die geringsten Verschiebungsbeträge; diejenige bei 600 nm weist zwar die höchste sensorische Sensitivität auf, eine exakte Bestimmung der Position ihres Extinktionsmaximums ist aufgrund der großen HWB dieser Resonanz jedoch schwierig. Wie bereits erläutert (s. Kap. IV.II Abs. 1.2), wurden zur quantitativen Auswertung der Daten die Verschiebungsbeträge der 400er-Resonanz verwendet.

Zur Analyse eines eventuellen Zusammenhangs zwischen den Verschiebungsbeträgen der 3 Resonanzen wurden diese nach Gleichung (113) auf die jeweiligen Werte der 200er Resonanz normiert.

$$\Delta\lambda_{\max,i}^{norm} = \frac{\Delta\lambda_{\max,i}}{\Delta\lambda_{\max,300nm}} \quad (113)$$

Die berechneten Werte können auch als normierte Sensor-Sensitivitäten verstanden werden. In der Tabelle IV.II.3-2 sind die für die beschriebene Kopplungsreihe erhaltenen Werte aufgeführt.

Stufe	LSPR bei 300 nm	LSPR bei 400nm	LSPR bei 600 nm
	$(\Delta\lambda_{\max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{\max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{\max})_{norm}$
C16COOH	1,00	2,69	3,51
1AK	1,00	2,65	3,52
2AK	1,00	2,71	3,41

Tab. IV.II.3-2: Auf die Verschiebung der 300er-Resonanz normierte LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm.

Die Einheitlichkeit der normierten Werte deutet auf eine proportionale Beziehung zwischen den Verschiebungsbeträgen der drei LSP-Resonanzen.

Die Sensitivität der 400er Resonanz in Bezug auf die Massenbelegung ist etwa 2,7-fach höher als diejenige der 300er Resonanzlinie. Dagegen liegen die $\Delta\lambda_{\max}$ -Werte der 600er Resonanz noch mal etwa 1,3 fach höher als diejenigen der 400er Linie. Sie zeigt somit die höchste sensorische Sensitivität.

Mit Hilfe der in Abschnitt 2 ermittelten Eichwertfaktoren (4,08 Å/nm; 35,1 ng/(cm²*nm)) wurden anhand der Verschiebungsbeträge der 400er Resonanz Schichtdicke und Massenbelegung für die einzelnen Kopplungsstufen berechnet. In der Tabelle IV.II.3-3 sind die berechneten Werte aufgeführt; diese entsprechen dem Schichtdickenanstieg bzw. der Änderung der Massenbelegung, die mit den angegebenen Funktionalisierungen verbunden sind.

Stufe	Schichtdicke	Massenbelegung
	/Å	/ ng/cm²
C16COOH	16,00	137,85
1. Antikörper	29,21	251,63
2. Antikörper	9,05	77,92

Tab. IV.II.3-3: Anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechnete und mit den angegebenen Funktionalisierungen verbundener Zuwachs an Schichtdicke und Massenbelegung.

Zur Beurteilung der ermittelten Schichtdicken und Massenbelegungen wurden Röntgenphotoelektronenspektren von jeder Stufe aufgenommen und nach Gleichung (104) XP-basierende Schichtdicken berechnet.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Zur Kontrolle der einzelnen Funktionalisierungsschritte sowie zur Bestimmung der jeweiligen Adsorbatschichtdicken wurden XP-Spektren von den Nanopartikeloberflächen aufgenommen.

Auch hier fand eine Probenaufladung statt, die zu einer Dublettaufspaltung der detektierten Signale führte. Zur Bestimmung der Schichtdicken wurde die Thiol-Monolage wie in Kap. III Abs. 4.5.1 beschrieben durch UV-Bestrahlung oxidativ entfernt. Die Ladungsaufspaltung steigt infolge des mit dieser Methode verbundenen Austritts von Photoelektronen um einige eVolt an.

Die Abbildungen IV.II.3-3 zeigen nach Funktionalisierung mit C15COOH aufgenommene C1s- und Au4f-Detailspektren.

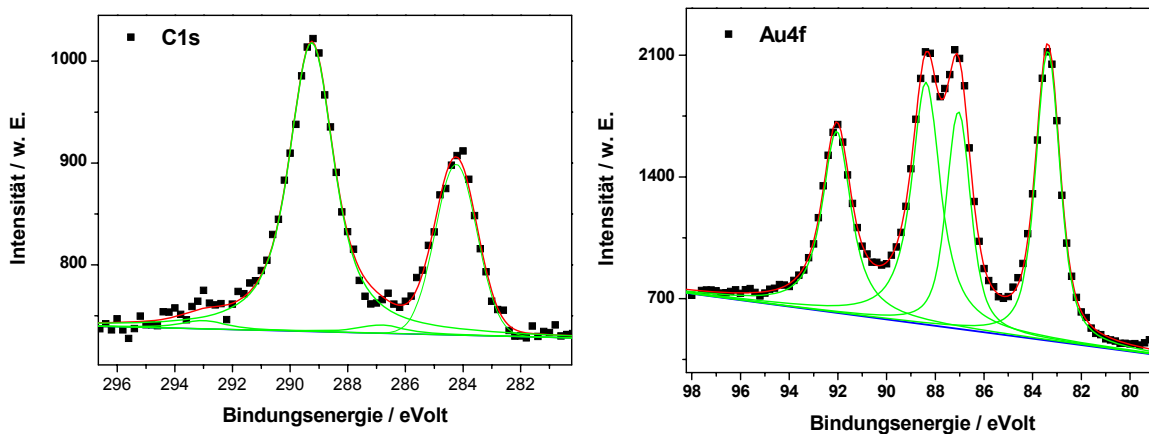


Abb. IV.II.3-3: C1s- (links) und Au4f-Detailspektrum, aufgenommen nach Funktionalisierung der Nanopartikel-oberflächen mit C15COOH.

Den nicht aufgeladenen Probenbereichen können im Fall des C1s-Signals die Positionen bei 284,1 eVolt (aliphatische Kohlenstoffe) und 287,1 eVolt (Kohlenstoff der Carboxygruppe) zugeordnet werden; die Ladungsaufspaltung beträgt etwa 5 eVolt. Für das Au4f-Signal ergab sich ebenfalls eine Aufspaltung von 5,0 eVolt.

Nach der UV-Behandlung steigt infolge des oxidativen Abbaus der C15COOH-Monolage die Au4f-Intensität deutlich an und die Ladungsaufspaltung nimmt auf Werte bis zu 5,6 eVolt zu. Die Abb IV.II.3-4 zeigt Au4f-Spektren, welche mit und nach anschließender oxidativer Desorption einer adsorbierten C15COOH-Monolage aufgenommen wurden.

Die Antikörper-Bindung führt auch in diesem Fall, bedingt durch die proteineigenen Kohlen- und Sauerstoffatome zum Auftreten zusätzlicher C1s- und O1s-Signale in den XP-Spektren.

Zu erwarten sind im Fall des C1s-Signals neben dem C1s-Alkyl-Signal (C-H, C-C) das Auftreten weitere Signale bei 285,1 eV (C-N) und 288,3 eV (C=O).

Die Abbildung IV.II.3-5 zeigt C1s-Detailspektren, welche jeweils mit einer adsorbierten C15COOH-Monolage und nach anschließender Adsorption zweier Lagen Antikörper aufgenommen wurden; rechts sind die nach der kovalenten Bindung des Erstantikörpers und der anschließenden Behandlung mit dem spezifischen Antigen aufgenommen und angepassten C1s-Detailspektren dargestellt. Die auf die Antikörper zurückzuführenden zusätzlichen XP-Signale können somit zur Analyse dieser Bindungsprozesse herangezogen werden.

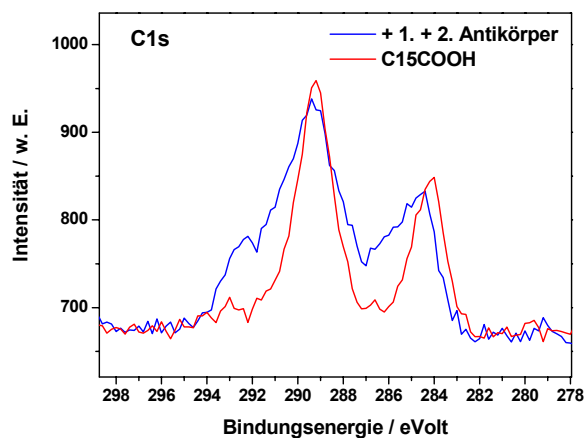


Abb. IV.II.3-5: Oben: C1s-Detailspektren nach Funktionalisierung mit C15COOH und Bindung des 1. und des spezifischen Zweitantikörpers; Rechts: angepasste C1s-Detailspektren nach Kopplung der Antikörper.

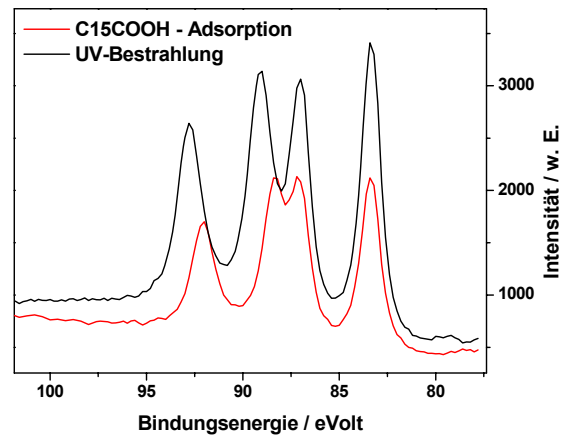
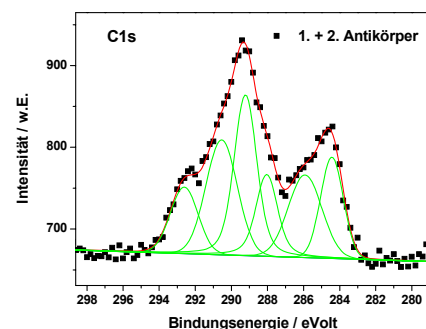
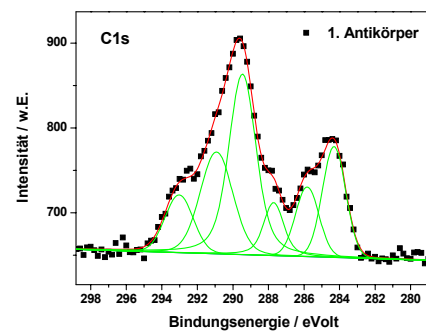


Abb. IV.II.3-4:

Au4f-Detailspektren nach Funktionalisierung mit C15COOH (schwarz) und anschließender, 1-stündiger UV-Bestrahlung.



Die Ladungsaufspaltung führt auch hier zu einer Dublettauspaltung, so dass insgesamt 6 Signallagen anzupassen sind; in den gezeigten Spektren beträgt diese etwa 5 eV. Bei 284,1 eV wird das C1s-Alkyl-Signal detektiert; die gesamte C1s-Intensität der zusätzlich auftretenden und auf die gebundenen Proteine zurückzuführenden Signale bei 285,1 (C-N) und 288,3 eV (C=O) beträgt nach Bindung des Erstantikörpers 661 Einheiten. Bei Umsatz

mit dem Zweitantikörper (Schichtdicke 9,05 Å) steigt sie weiter bis auf 871 Einheiten an. Dagegen nimmt die C1s-Intensität der aliphatischen Kohlenstoffe bedingt durch die Bindung des Erstantikörpers von 866 auf 691 Einheiten ab; nach Umsatz mit dem Zweitantikörper weist sie nur noch eine Intensität von 545 Einheiten auf.

Die Antikörper-Bindung lässt sich jedoch gegebenenfalls genauer über eine Analyse der mit ihnen verbundenen N1s-Signale analysieren, da diese eindeutig den adsorbierten Biomolekülen zugeordnet werden können. Eine mit höheren Ungenauigkeiten verbundene Anpassung mehrerer Signallagen zur Eliminierung von Beiträgen des Basisfilms ist in diesem Fall nicht erforderlich.

Die Abbildung IV.II.3-6 zeigt N1s-Detailspektren, welche nach kovalenter Bindung des Erstantikörpers und Umsatz mit dem spezifischen Antigen aufgenommen wurden. Das bei etwa 400,3 eV detektierte Signal ist den Amin- und Amid-gebundenen Stickstoffatomen der immobilisierten Proteine zu zuordnen.

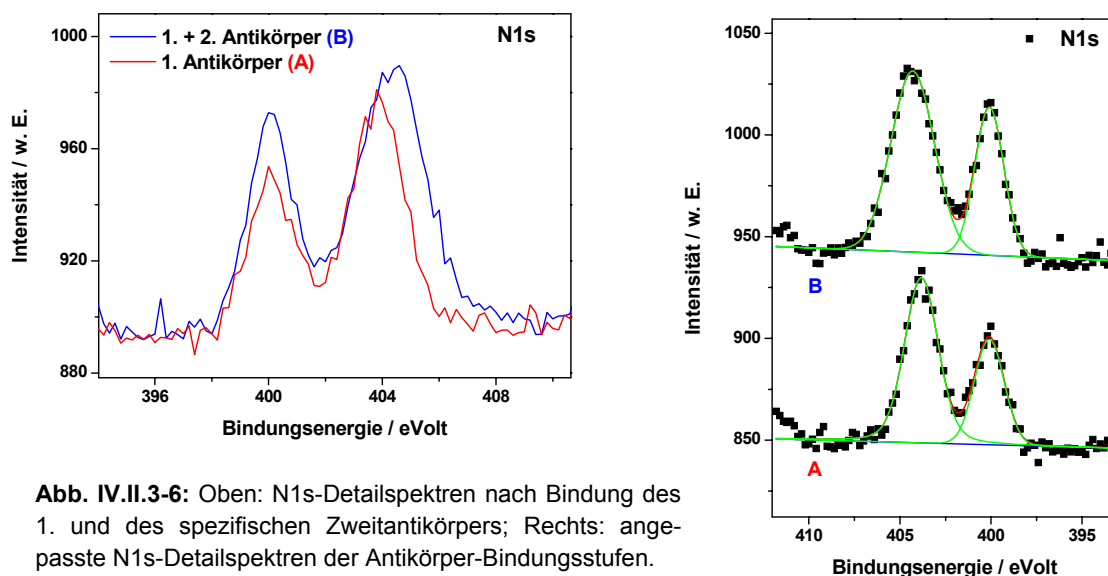


Abb. IV.II.3-6: Oben: N1s-Detailspektren nach Bindung des 1. und des spezifischen Zweitantikörpers; Rechts: angepasste N1s-Detailspektren der Antikörper-Bindungsstufen.

Die Anpassung der Spektren ergibt einen N1s-Intensitätsanstieg von 311 Einheiten nach Bindung des Erstantikörpers um den Faktor 1,3 auf 411 Einheiten nach Umsetzung mit dem spezifischen Antigen.

Die integrierten XP-Intensitäten eignen sich jedoch nur zu einer qualitativen Interpretation der beschriebenen Biofunktionalisierungen, da je nach Schichtdicke der adsorbierten Lage eine elementspezifische Signalabschwächung auftritt.

Zudem ist die Anpassung einer Vielzahl an Signallagen, wie im Fall der C1s-Detailspektren, mit einer höheren Ungenauigkeit verbunden, wodurch quantitative Aussagen weiterhin eingeschränkt werden.

Die Schichtdicken der einzelnen Funktionalisierungsstufen konnten über die Abschwächung der Au4f-Intensität berechnet werden; sie sind zusammen mit den anhand der LSPR-Verschiebungen ermittelten Werten in der folgenden Tabelle IV.II.3-4 aufgeführt.

Stufe	XPS	LSPR
	Schichtdicke /Å	Schichtdicke /Å
C15COOH	20,76	16,00
C15COOH + 1AK	48,01	45,21
C15COOH + 1AK + 2AK	54,60	54,26

Tab. IV.II.3-4: Röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelte und anhand der LSPR-Verschiebung der 400nm Resonanz berechnete Schichtdicken der angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Die auf Basis dieser unterschiedlichen Methoden ermittelten Schichtdicken stimmen insgesamt gut überein. Die Massenbelegung der Antikörper konnte zusätzlich über einen oberflächen-modifizierten ELISA-Assay ermittelt werden.

Enzymkinetische ELISA-Messungen

Wie bereits beschrieben, kann die Peroxidase-Aktivität über die Absorption des enzymatisch gebildeten ABTS-Radikalkations bestimmt werden. Die Abbildung IV.II.3-7 zeigt den UV/Vis-spektroskopisch detektierten, zeitabhängigen Anstieg der Konzentration des ABTS-Radikalkations.

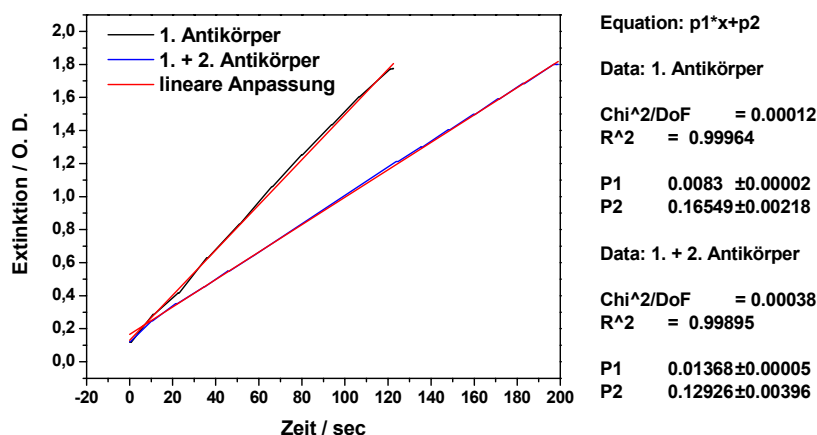


Abb. IV.II.3-7: UV/Vis-spektroskopisch detektierter Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS; Anpassung nach Michaelis-Menten-Modell zur Bestimmung der Massenbelegung an Antikörpern.

In der Tabelle IV.II.3-5 sind die sich auf diese Weise ergebenden Massenbelegungen angegeben; zum Vergleich sind ebenfalls die anhand der LSPR-Messungen berechneten Antikörper-Belegungsichten aufgeführt. Die rechte Spalte enthält außerdem die auf Basis der ELISA-Messungen ermittelten LSPR-Eichwertfaktoren bezüglich der Massenbelegung.

Stufe	Massenbelegung		ELISA-Eichwert
	LSPR / ng/cm²	ELISA / ng/cm²	/ ng/(cm²*nm)
1. Antikörper	251,6	220,6	30,8
1. + 2. Antikörper	329,6	336,1	35,8

Tab. IV.II.3-5: Enzymkinetisch mittels des ELISA-Assays und anhand der LSPR-Verschiebung bestimmte Massebelegung der Antikörper; ELISA-basierender Eichwert bzgl. der Massenbelegung (rechte Spalte).

Die enzymkinetisch ermittelten Belegungsdichten stimmen insgesamt gut mit den Massenbelegungen überein, welche anhand der LSPR-Messungen berechnet wurden. Die ELISA-Eichwertfaktoren bezüglich der Massenbelegung liegen daher in einem ähnlichen Bereich wie der Eichwert, welcher anhand von XPS-Messungen ermittelt wurde (s. Abschnitt 2; 35,1 ng/(cm²*nm)).

Interpretation und Fazit

Die mittels unterschiedlicher Methoden ermittelten Adsorbat-Schichtdicken und -Massenbelegungen stimmen sehr gut mit den auf Basis der LSPR-Verschiebung ermittelten Werten überein. Dies bekräftigt zum einen ihre Eignung zur quantitativen Interpretation von Bindungsereignissen.

Die Ergebnisse zeigen jedoch auch, dass sich der lineare Antwortbereich der LSPR-aktiven Sensoroberflächen auf Abstände erstreckt, welche in der Größenordnung der gekoppelten Biomoleküle liegen. In der Abbildung IV.II.3-8 sind die räumlichen Dimensionen von IgG-Molekülen schematisch dargestellt. Ihre Immobilisierung führt somit je nach Kopplungs-Geometrie zu Adsorbatdicken von etwa 10 nm. Da in den beschriebenen Versuchen ein aus 2 Antikörpern bestehende Sandwich-Struktur ausgebildet wurde, muss die Stärke des evaneszenten Feldes innerhalb eines Abstandsbereiches von etwa 20 nm noch ausreichend sein, so dass eine lineare Interpretation der Sensorantwort mit Hilfe der in Abschnitt 2 ermittelten Eichwertfaktoren möglich ist. Die Abschwächungslänge des evaneszenten Feldes beträgt somit mindestens 300 nm (s. Abb. IV.II.3-9); ansonsten hätte die Anwendung der Eichwertfaktoren aus Abschnitt 2 zu niedrigeren Schichtdicken und Massenbelegungen geführt als mittels der anderen Analyse-Methoden bestimmt wurde.

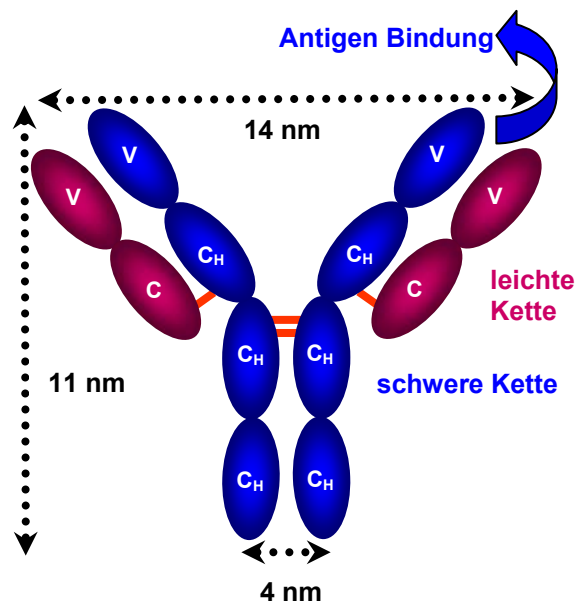


Abb. IV.II.3-8: Struktur und Ausmaße eines IgG-Antikörpers.

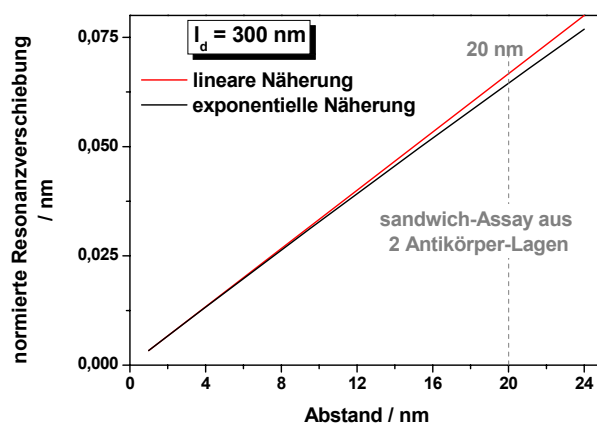


Abb. IV.II.3-9: Exponentiell und linear genäherte Sensorantwort bei der LSPR; Abschwächungslänge 300 nm.

bestimmt wurde.

Werden Antikörper an Oberflächen adsorbiert oder kovalent gebunden, so tritt oft keine Monolagenbildung ein; dies entspricht daher dem in Kapitel II.II, Abschnitt 1.3.6 diskutiertem Fall einer inhomogenen, inselartig funktionalisierten Oberfläche. Die angegebenen Schichtdicken und Massenbelegungen entsprechen daher lateral gemittelten Werten.

3.1.1.2 Antikörper-Kopplung an C11NH₂-terminierte Oberflächen

In der Abb. IV.II.3-10 sind die einzelnen Funktionalisierungsschritte dargestellt. Es wurde zunächst eine aminotermi­nierte Oberfläche erzeugt, indem die Nanopartikel­oberflächen unter Ausbildung selbstaggregierender Monolagen mit dem Alkanthiol C11NH₂ funktionalisiert wurden (1). Nach Einführung des Linkermoleküls Glutar­dialdehyd, dessen Aldehydgruppen mit freien Aminogruppen unter Ausbildung von Iminbindungen reagieren, konnte der Peroxidase-markierte Erstantikörper (Ziege-anti-Hase-IgG) (2) gebunden werden; anschließend wurde auch hier mit dem spezifischen Antigen (Hase-gegen-Schaf-IgG) um­gesetzt (3).

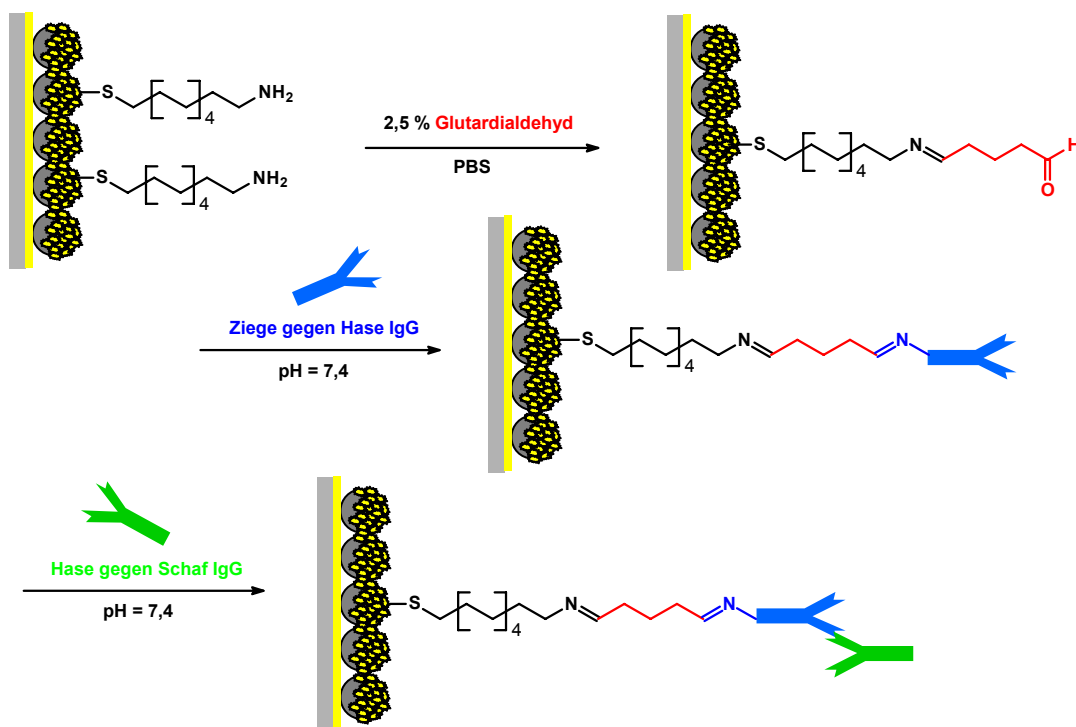
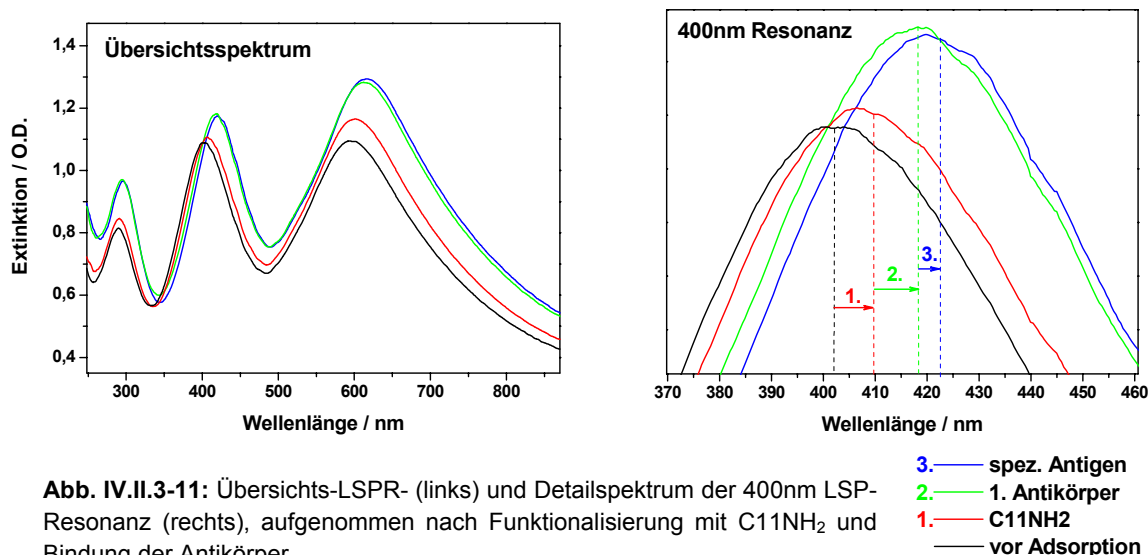


Abb. IV.II.3-10: Kovalente Bindung von Antikörpern an C11NH₂-terminierte Nanopartikeloberflächen und Umsetzung mit dem spezifischen Antigen.

LSPR-Messungen

Nach jeder Funktionalisierungsstufe wurden LSPR-Spektren aufgenommen und die Verschiebung der bei ca. 300, 400 und 600 nm auftretenden LSP-Resonanzen bestimmt. Die Abbildung IV.II.3-11 zeigt ein typisches Übersichtsspektrum sowie als Detailausschnitt die zu quantitativen Aussagen herangezogene Resonanz bei 400 nm.



In der Tabelle IV.II.3-6 sind die mittleren Verschiebungsbeträge und ihre Standardabweichung angegeben. Diese beziehen sich auf die jeweilige Vorstufe (1, 2, 3) und basieren auf 6 bis maximal 12 ausgewerteten Extinktionsspektren verschiedener Nanopartikelspots.

Stufe	LSPR bei 300 nm		LSPR bei 400 nm		LSPR bei 600 nm	
	$\Delta\lambda_{max}$	SD	$\Delta\lambda_{max}$	SD	$\Delta\lambda_{max}$	SD
C11NH ₂	1,4	0,54	5,21	1,62	5,45	1,33
1AK	2,87	0,82	9,35	0,53	11,79	3,19
2AK	1,4	0,35	3,07	1,03	4,03	2,10

Tab. IV.II.3-6: Mittlere LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm und zugehörige Standardabweichung nach Funktionalisierung mit C11NH₂ und Bindung der Antikörper.

Zur quantitativen Auswertung wurde die bei etwa 400 nm auftretende LSP-Resonanz herangezogen; die nach Gleichung (113) berechneten normierten Verschiebungsbeträge sind in der Tabelle aufgeführt.

	<i>LSPR 300 nm</i>	<i>LSPR 400nm</i>	<i>LSPR 600 nm</i>
Stufe	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$
C11NH2	1,00	3,7	3,9
1AK	1,00	3,3	4,1
2AK	1,00	2,2	2,9

Tab. IV.II.3-7: Auf die Verschiebung der 300er-Resonanz normierte LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm.

Auch hier liegen die für die einzelnen Resonanzen berechneten normierten Werte in einem ähnlichen Größenbereich; sie fallen jedoch weniger einheitlich aus als diejenigen Werte, welche für die Bindungsstudien an den C15COOH-terminierten Oberflächen erhalten wurden. Dies ist vor allem darin begründet, dass die zur Normierung benutzten Verschiebungen der 300er-Resonanz insgesamt nur sehr gering ausfallen und somit kleinere Fehler in ihrer Bestimmung zu größeren Abweichungen der normierten Werte führen. Jedoch ist auch hier ein ähnlicher Trend erkennbar, der auf eine proportionale Beziehung zwischen den ermittelten Verschiebungsbeträgen der 3 Extinktionsmaxima hindeutet. Die Sensitivität der 400er-Resonanz ist hier etwa 3,1-fach höher als diejenige der 300er Resonanz (2,7-fach höher laut Ergebnissen aus Abschnitt 3.1.1.1). Die höchste sensorische Empfindlichkeit besitzt die LSP-Resonanz bei 600 nm; ihre Verschiebungen sind durchschnittlich etwa 1,2-fach höher als diejenigen der 400er Linie.

Zur quantitativen Auswertung wurde aus bereits beschriebenen Gründen die 400er Resonanz herangezogen. Die mit Hilfe der ermittelten Eichwertfaktoren berechneten Schichtdicken und Massenbelegungen sind in der Tabelle IV.II.3-8 aufgeführt; diese Werte entsprechen einem Anstieg, der jeweils auf die unmittelbare Vorstufe des Funktionalisierungsschemas bezogen ist.

<i>Stufe</i>	<i>Schichtdicke</i> / Å	<i>Massenbelegung</i> / ng/cm ²
C11NH₂	21,23	182,74
1. Antikörper	38,11	328,04
2. Antikörper	12,51	107,68

Tab. IV.II.3-8: Anhand der LSPR-Verschiebung der 400nm Resonanz berechneter und mit den angegebenen Funktionalisierungen verbundener Zuwachs an Schichtdicke und Massenbelegung.

Zusätzlich wurden von jeder Stufe XP-Spektren aufgenommen, mit deren Hilfe nach Gleichung (104) XP-basierende Schichtdicken ermittelt werden konnten. Durch eine Verwendung Peroxidase-markierter Antikörper konnte die Massenbelegung der Antikörper zudem mittels enzymkinetischer Messungen bestimmt werden.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Abbildung IV.II.3-12 zeigt nach Funktionalisierung mit C11NH₂ aufgenommene C1s- und Au4f-Detailspektren.

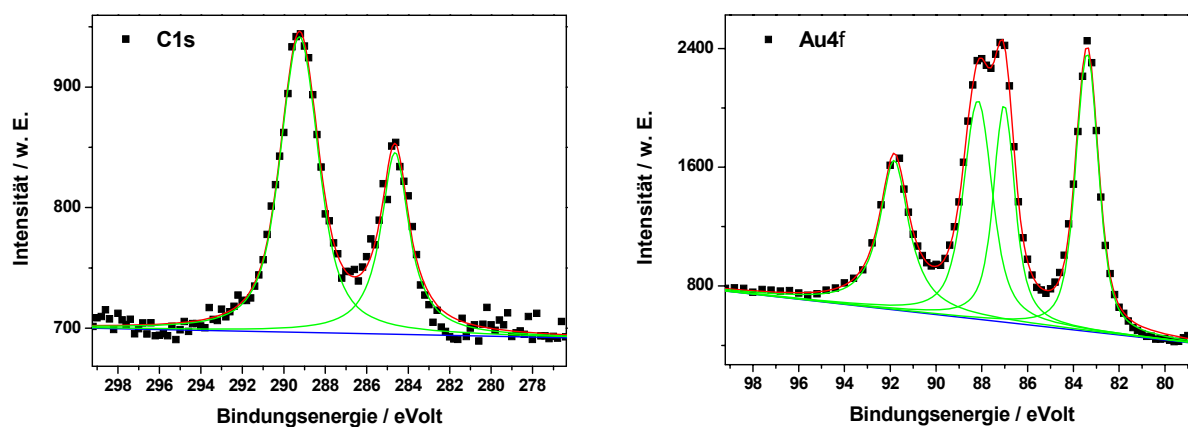


Abb. IV.II.3-12: C1s- (links) und Au4f-Detailspektrum (rechts); aufgenommen nach Funktionalisierung der Nanopartikeloberflächen mit C11NH₂.

Den nicht aufgeladenen Probenbereichen können im Fall des C1s-Signals die Positionen bei 284,3 eV (aliphatische Kohlenstoffe) zugeordnet werden; das Au4f-Signal der leitenden Probenbereiche entspricht den Positionen bei 83,3 und 87,6 eV. Die Ladungsaufspaltung beträgt in den gezeigten Spektren etwa 4,7 eV.

Die Bestrahlung der Oberflächen mit UV-Licht führt zu einem Anstieg der Ladungsaufspaltung auf etwa 6 eV. Der starke Anstieg der Au4f-Intensität nach dieser Behandlung deutet auf eine effektive oxidative Ablösung der C11-Monolage. Die Abb. IV.II.3-13 zeigt Au4f-

Spektren, welche jeweils mit und nach dem Abbau der Thiol-Monolage aufgenommen wurden.

Die Antikörper-Kopplungen können über eine Anpassung der C1s-Detailspektren analysiert werden. In der Abbildung IV.II.3-14 sind C1s-Detailspektren dargestellt, welche jeweils nach Adsorption einer C11NH₂-Monolage und anschließender Bindung des Erst- und spezifischen Zweitantikörpers aufgenommen wurden; rechts sind die angepassten C1s-Detailspektren der beiden Proteinkopplungsstufen abgebildet.

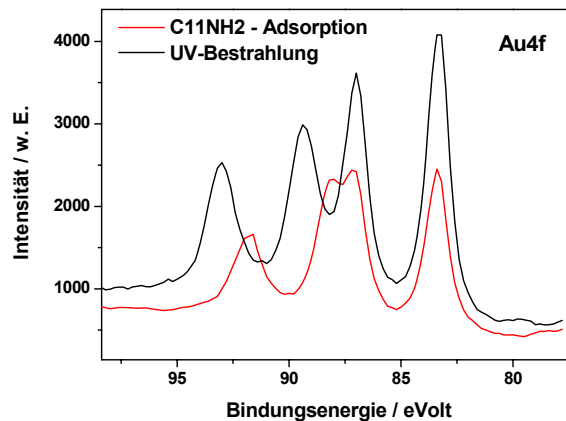


Abb. IV.II.3-13:

Au4f-Detailspektren, aufgenommen nach Funktionalisierung mit C11NH₂ (schwarz) und anschließender, 1-stündiger UV-Bestrahlung (rot).

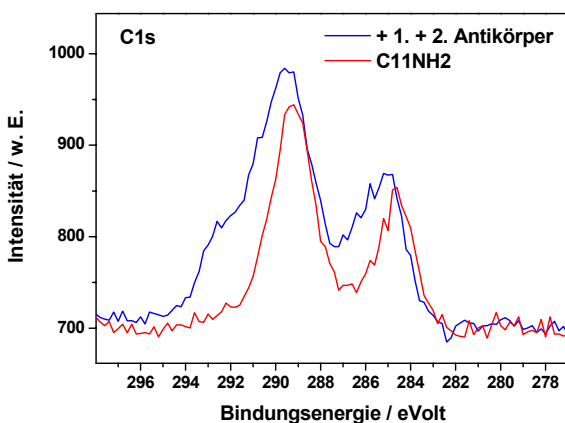
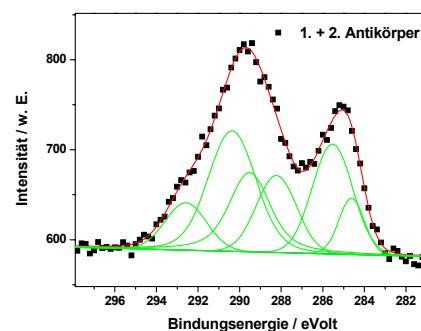
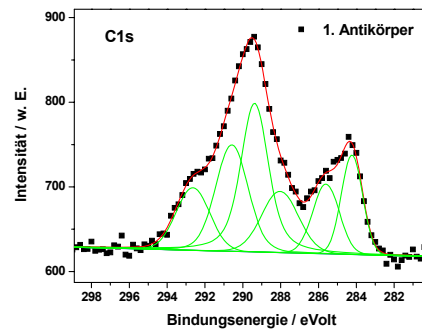


Abb. IV.II.3-14: Oben: C1s-Detailspektren nach Funktionalisierung mit C11NH₂ und Bindung des 1. und des spezifischen Zweitantikörpers; Rechts: angepasste C1s-Detailspektren nach Kopplung der Antikörper.



Die Ladungsaufspaltung beträgt in den gezeigten Spektren etwa 4,8 eV. Die gesamte C1s-Intensität der durch die Proteinbindung zusätzlich auftretenden Signallagen (bei 285,1 und 288,3 eV) beläuft sich nach Ausbildung der ersten Antikörper-Lage (38,11 Å) auf 965 Einheiten. Die zusätzliche Kopplung des spezifischen Zweitantikörpers (Schichtdickenbeitrag von 12,51 Å) bewirkt einen weiteren Intensitätsanstieg auf 1047 Einheiten.

Dagegen nimmt die C1s-Alkyl-Intensität nach Bindung des Erstantikörpers von einer Gesamtintensität von 1032 Einheiten auf 526 Einheiten ab; nach Umsatz mit dem Zweitantikörper beträgt sie nur noch 412 Einheiten.

Die Antikörper-Kopplungen können ebenfalls anhand der N1s-Detailspektren analysiert werden. Die Abbildung IV.II.3-15 zeigt den mit der Bindung des Erst- und des spezifischen Zweitantikörpers verbundenen N1s-Intensitätsanstieg.

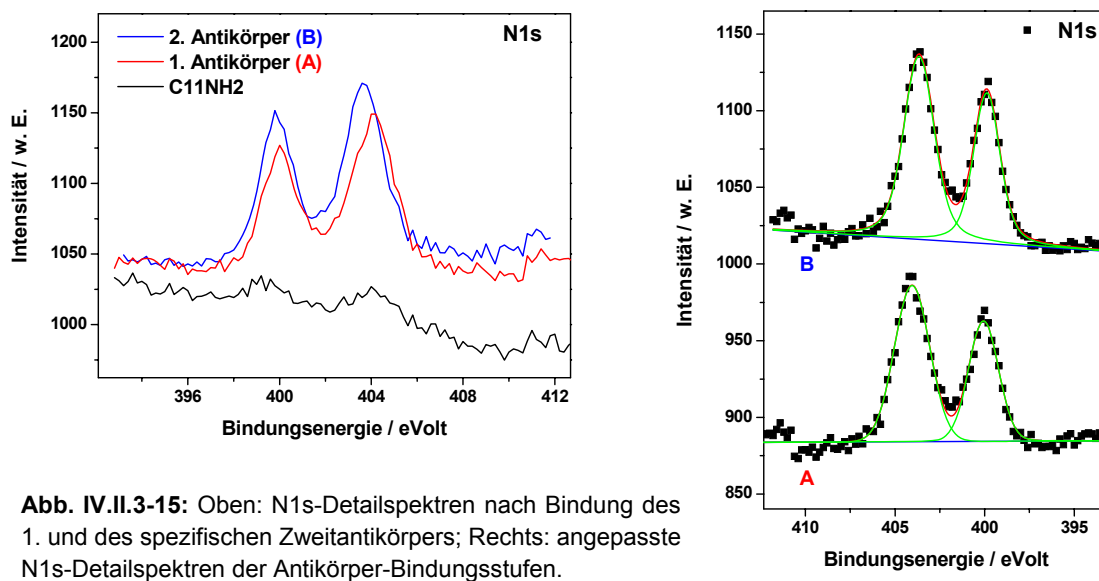


Abb. IV.II.3-15: Oben: N1s-Detailspektren nach Bindung des 1. und des spezifischen Zweitantikörpers; Rechts: angepasste N1s-Detailspektren der Antikörper-Bindungsstufen.

Das bei etwa 400,3 eV detektierte Signal entspricht den Amin- und Amid- gebundenen Stickstoffatomen der Proteine.

Da ein aminoterminierter Basisfilm (C11NH₂) verwendet wurde, ist bereits vor der Biomolekül-Kopplung im N1s-Bereich eine geringe Grundintensität erkennbar. Eine Eliminierung dieses Beitrags ist nicht möglich, da bei einer einfachen Subtraktion die Abschwächung der Signalintensität durch die darüber liegenden Antikörper-Schichten unberücksichtigt bleibt. Die Umsetzung mit den Antikörpern führt jedoch zu einem deutlichen Signalanstieg, so dass die Kopplungsraten zwar nicht quantifiziert, die Bindung dieser Biomoleküle jedoch qualitativ nachvollzogen werden kann.

Die integrierte N1s-Intensität steigt nach Immobilisierung des 1. Antikörpers von 418 um den Faktor 1,22 auf 510 Einheiten bei zusätzlicher Bindung des Zweitantikörpers an; dagegen nehmen die LSPR-spektroskopisch ermittelte Schichtdicke und Massenbelegung um einen Faktor von etwa 1,33 zu. Die Differenz zwischen beiden Faktoren kann auf die mit zunehmender Schichtdicke verbundene Signalabschwächung zurückgeführt werden.

Die über die Abschwächung der XP-Intensität der Substratlage (Au) ermittelten Schichtdicken sind in der Tabelle IV.II.3-9 angegeben; zum Vergleich sind außerdem die anhand der LSPR-Messungen ermittelten Werte aufgeführt.

<i>Stufe</i>	<i>XPS</i>	<i>LSPR</i>
	<i>Schichtdicke /Å</i>	<i>Schichtdicke /Å</i>
C11NH2	20,41	21,23
C11NH2 + 1AK	63,28	59,34
C11NH2 + 1AK + 2AK	64,46	71,85

Tab. IV.II.3-9: Röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelte und anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechnete Schichtdicken der angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Die mittels unterschiedlicher Methoden erhaltenen Schichtdicken stimmen insgesamt gut überein. Eine größere Abweichung wird nur im Bereich höherer Schichtdicken (Bindung des Zweitantikörpers) beobachtet; hier ergibt sich XP-spektroskopisch eine etwa 7,4 Å niedrigere Schichtdicke als auf Basis der LSPR-Daten berechnet.

Auch diese Messungen zeigen daher, dass im vorliegenden Messbereich noch von einer linearen Reaktion zwischen Massenbelegung und der induzierten Sensorantwort ausgegangen werden kann; die Schichtdicken werden LSPR-spektroskopisch nicht unterschätzt, wie es außerhalb des linearen Antwortbereichs zu erwarten wäre.

Die Massenbelegung der Antikörper wurde zusätzlich mittels enzymkinetischer ELISA-Messungen ermittelt.

Enzymkinetische ELISA-Messungen

Die Massenbelegung der Antikörper konnte zusätzlich über eine Bestimmung der Enzymaktivität anhand eines Oberflächen-modifizierten ELISA-Assay ermittelt werden. Die Abbildung IV.II.3-16 zeigt den UV/Vis-spektroskopisch detektierten Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten ABTS-Radikalkations, dessen Absorptionsmaximum sich bei etwa 405 nm befindet.

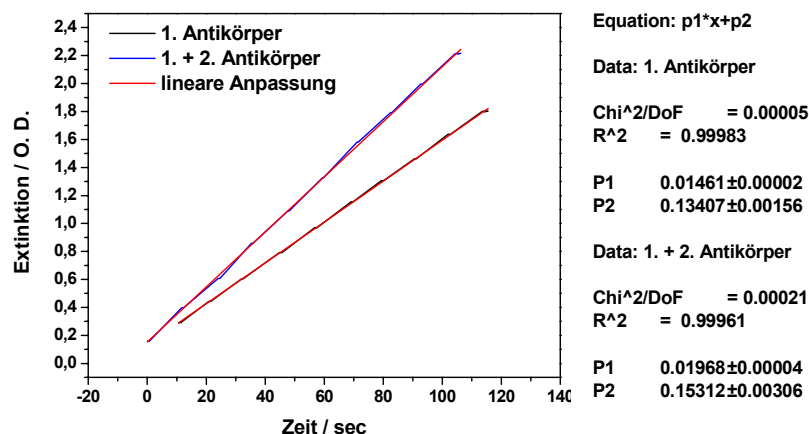


Abb. IV.II.3-16:

UV/Vis-spektroskopisch detektiertes Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS; Anpassung nach dem Michaelis-Menten-Modell zur Bestimmung der Massenbelegung an Antikörpern.

Eine enzymkinetische Auswertung der Daten nach dem Modell von Michaelis-Menten führt zu den in der Tabelle IV.II.3-10 angegebenen Massenbelegungen; zum Vergleich sind ebenfalls die anhand der LSPR-Messungen ermittelten Antikörper-Belegungsichten angegeben. Die rechte Spalte enthält die auf Basis der ELISA-Messungen berechneten LSPR-Eichwertfaktoren bezüglich der Massenbelegung.

Stufe	Massenbelegung		ELISA-Eichwert
	LSPR / ng/cm ²	ELISA / ng/cm ²	/ ng/(cm ² *nm)
1. Antikörper	251,63	265,51	37,03
1. + 2. Antikörper	329,55	352,77	37,57

Tab. IV.II.3-10: Enzymkinetisch mittels des ELISAs und anhand der LSPR-Verschiebung bestimmte Massenbelegung der Antikörper; ELISA-basierender Eichwert bzgl. der Massenbelegung (rechte Spalte).

Die enzymkinetisch ermittelten Antikörper-Belegungsichten stimmen gut mit denen überein, welche anhand der LSPR-Verschiebungen bestimmt wurden. Auf Grundlage dieser ELISA-Werte resultiert ein mittlerer Eichwertfaktor von 37,3 ng/(cm²*nm), der ebenfalls gut mit dem XP-basierendem Faktor von 35,1 ng/(cm²*nm) übereinstimmt.

Interpretation und Fazit

Die vorstehenden Ergebnisse bestätigen insgesamt die Schlussfolgerungen des Abschnitts 3.1.1.1. Auch hier wird eine gute Übereinstimmung zwischen den LSPR-basierenden und den mittels anderer Methoden (XPS, ELISA) bestimmten Schichtdicken und Massenbelegungen festgestellt. Der lineare Antwortbereich der optisch aktiven Nano-Sensoroberflächen erstreckt sich daher auf einen Abstand von mindestens 20 nm von der Oberfläche, da in den Immunoassays eine aus zwei Antikörper-Lagen bestehende Sandwichstruktur ausgebildet wurde (Größenordnung der gekoppelten IgG-Moleküle ~ 10 nm).

3.1.1.3 Antikörper-Kopplung an β -Alanin funktionalisierte Oberflächen

Mittels der nachfolgend beschriebenen Methoden wurde versucht, eine etwas kompliziertere Beschichtungsstrategie, bestehend aus mehreren Funktionalisierungsschritten, auf die optisch aktiven Oberflächen anzuwenden. Auf diese Weise konnte zum einen ihre Stabilität gegenüber einer intensiveren chemischen Behandlung analysiert sowie eine Vielzahl an Reaktionsschritten zur quantitativen Auswertung der induzierten LSPR-Verschiebung herangezogen werden.

Die Abbildung IV.II.3-17 zeigt die einzelnen Reaktionsschritte zur Erzeugung β -Alanin-terminierter Oberflächen und einer anschließenden kovalenten Bindung von Antikörpern.

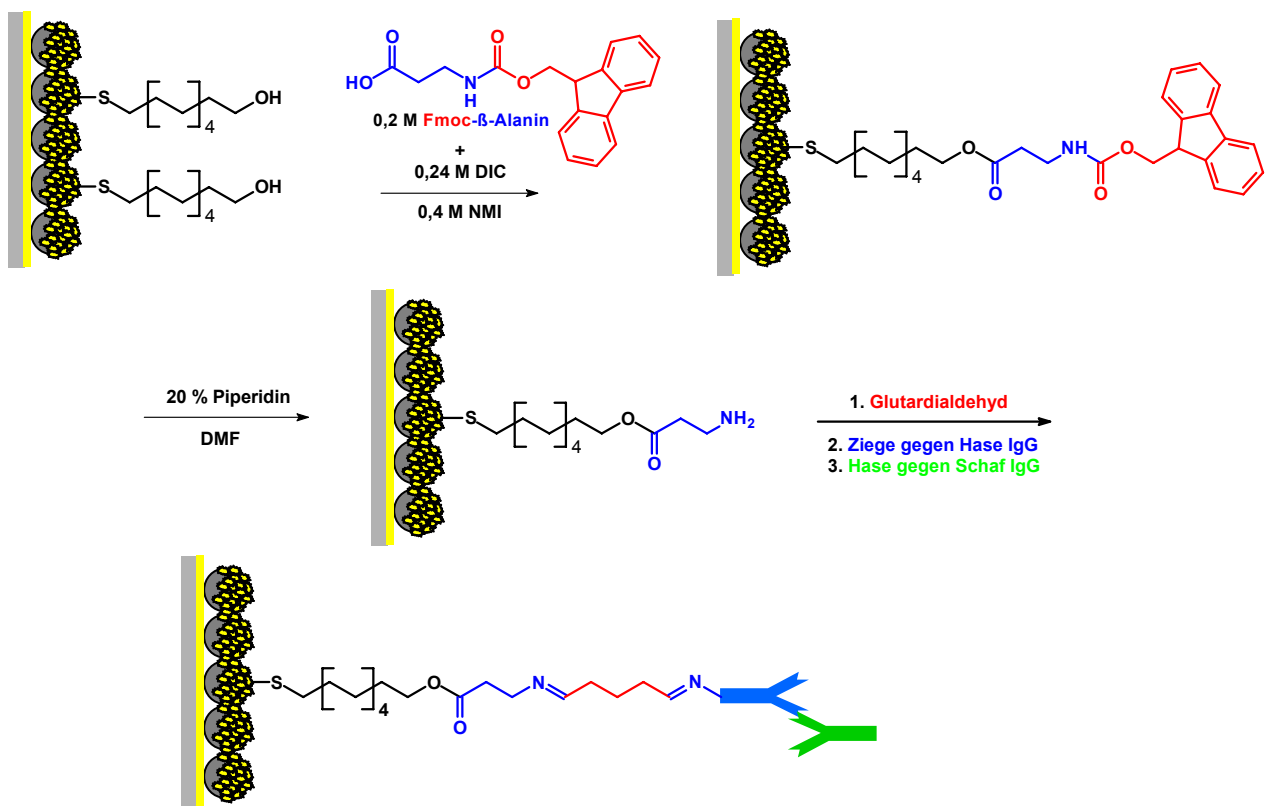


Abb. IV.II.3-17: Funktionalisierung von C11OH-terminierten Nanopartikel-Oberflächen mit Fmoc- β -Alanin und kovalente Bindung von Antikörpern nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

Durch Adsorption des Thiols C11OH wird unter Ausbildung selbstordnender Monolagen zunächst eine OH-terminierte Oberflächenbeschichtung erzeugt (1). Die Umsetzung des Fmoc⁸-geschützten β -Alanins mit DIC/NMI⁹ führt zur Ausbildung eines Aktivesters, der mit den Hydroxy-Gruppen der Oberfläche unter Ausbildung einer Esterbindung reagiert (2).

⁸ Fmoc = 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl

⁹ DIC = Diisopropylcarbodiimid; NMI = N-Methylimidazol

Die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch Behandlung mit einer Piperidin-haltigen Lösung ergibt anschließend eine amino-terminierten Oberfläche (3); diese kann analog zu der bereits in Abschnitt 3.1.1.2 dargestellten Weise nach Einführung des Linkermoleküls Glutar-dialdehyd zur kovalenten Bindung von Antikörpern eingesetzt werden.

Eine Aktivierung der OH-Gruppen unter Verwendung der üblicherweise in der Peptidchemie eingesetzten Aktivierungsreagenzien DCC¹⁰/NMI erwies sich als nicht praktikabel, da die mechanisch sehr sensiblen Nanopartikel-Beschichtungen durch das als Nebenprodukt nadelartig ausfallende Harnstoffderivat beschädigt wurden.

LSPR-Messungen

Nach jedem Funktionalisierungs-Schritt wurden Extinktionsspektren aufgenommen und die Lage des Extinktionsmaximums der bei ca. 300, 400 und 600 nm auftretenden LSP-Resonanzen bestimmt. Die Abbildung IV.II.3-18 zeigt ein typisches Übersichtsspektrum sowie als Detail-Ausschnitt die LSP-Resonanz bei etwa 400 nm.

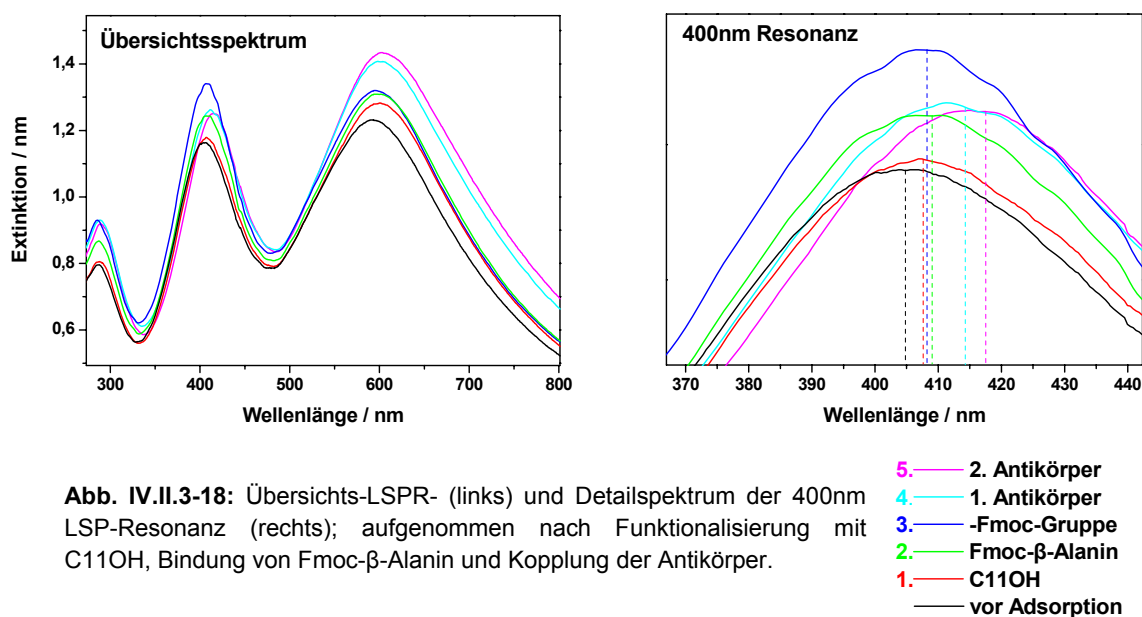


Abb. IV.II.3-18: Übersichts-LSPR- (links) und Detailspektrum der 400nm LSP-Resonanz (rechts); aufgenommen nach Funktionalisierung mit C11OH, Bindung von Fmoc-β-Alanin und Kopplung der Antikörper.

In der folgenden Tabelle sind die Verschiebungsbeträge angegeben; diese beziehen sich jeweils auf die vorangehende Funktionalisierungsstufe (1–5) und entsprechen einer Mittelwertbildung aus 6 bis maximal 12 ausgewerteten Spektren verschiedener Probenspots.

¹⁰ DCC = N, N'-Dicyclohexylcarbodiimid

<i>Stufe</i>	<i>LSPR bei 300 nm</i>		<i>LSPR bei 400 nm</i>		<i>LSPR bei 600 nm</i>	
	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>
C11OH	1,64	0,46	3,09	0,62	5,07	0,93
Fmoc-β-Alanin	0,47	0,32	1,07	0,37	1,8	0,73
β-Alanin	-0,47	0,23	-0,77	1,06	-1,49	1,08
1. Antikörper	2,73	0,81	6,43	0,70	7,17	1,20
2. Antikörper	0,93	0,21	2,28	1,00	3,13	1,41

Tab. IV.II.3-11: Mittlere LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm und zugehörige Standardabweichung nach Funktionalisierung mit C11OH, Fmoc- β -Alanin, Abspaltung der Schutzgruppe und Bindung der Antikörper.

Aufgrund des sterischen Anspruchs der Fmoc-Gruppe ist bei der Reaktion des geschützten Alanins (C2-Körper) mit den OH-Gruppen der funktionalisierten Oberflächen nicht mit einer 1:1-Umsetzung zu rechnen. Trotz der nur geringen Änderung der Massenbelegung wird hier eine kleine Verschiebung in den längerwelligen Bereich beobachtet. Für die Schutzgruppen-Abspaltung resultiert dagegen aufgrund einer abnehmenden Massenbelegung eine Verschiebung in den kürzerwelligen Bereich, so dass hier negative Verschiebungen resultieren. Insgesamt ergibt sich auch hier ein ähnlicher Trend zwischen den Verschiebungsbeträgen der 3 Extinktionsmaxima. Die nach Gleichung (113) berechneten normierten Verschiebungsbeträge sind in der Tabelle IV.II.3-12 aufgeführt.

<i>Stufe</i>	<i>LSPR bei</i>	<i>LSPR bei</i>	<i>LSPR bei</i>
	<i>300 nm</i>	<i>400nm</i>	<i>600 nm</i>
	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$
C11OH	1	1,88	3,09
β-Fmoc-Alanin	1	2,28	3,83
β-Alanin	1	1,64	3,17
1. Antikörper	1	2,36	2,63
2. Antikörper	1	2,45	3,37

Tab. IV.II.3-12: Auf die Verschiebung der 300nm-Resonanz normierte LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm.

Die normierten Werte der einzelnen Resonanzlinien liegen auch hier in einem ähnlichen Größenbereich wie in den zuvor geschilderten Versuchsreihen. Die Resonanz bei 400 nm ist etwa 2,1-fach sensibler bezüglich Änderungen der Massenbelegung als die 300er Resonanz.

Dagegen liegen die Verschiebungen der 600er Linie noch einmal etwa 1,5-fach höher als diejenigen der 400er Linie.

Die zur Normierung benutzten Verschiebungen der 300 Resonanz fallen insgesamt jedoch nur sehr gering aus und liegen teilweise an der Grenze des aufzulösenden Bereiches ($\pm 0,25$ nm). Ihre Bestimmung unterliegt somit einem größeren Fehler, der die Aussagekraft der normierten Werte einschränkt.

Die Verschiebungen der bei etwa 400 nm auftretenden LSP-Resonanz wurden benutzt, um mittels der Eichwertfaktoren Schichtdicke und Massenbelegung der Adsorbatlagen zu bestimmen. In der Tabelle sind die berechneten Werte aufgeführt; sie entsprechen dem Anstieg, der mit der jeweiligen Funktionalisierung verbunden ist.

Stufe	Schichtdicke / Å	Massenbelegung / ng/cm²
C11OH	12,59	108,38
Fmoc-β-Alanin	4,36	37,53
β-Alanin	-3,12	-26,89
1. Antikörper	26,20	225,53
2. Antikörper	9,28	79,88

Tab. IV.II.3-13: Anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechneter und mit den angegebenen Funktionalisierungen verbundener Zuwachs an Schichtdicke und Massenbelegung.

Für die Adsorption des C11OH wird mit Hilfe der Eichwertfaktoren aus Abschnitt 2 eine Schichtdicke von 12,59 nm berechnet; diese entspricht einem Bedeckungsgrad von etwa 85 %. Mit Hilfe dieses Wertes und des bekannten Platzbedarfs pro Alkanthiolkette ($21,4 \text{ Å}^2/\text{Molekül}$) sollte somit für eine hypothetische 1:1-Umsetzung der zur Verfügung stehenden OH-Gruppen eine Massenbelegung von $216,15 \text{ ng/cm}^2$ für diese Kopplungsstufe resultieren. Die berechnete Massenbelegung des Fmoc-Alanins beträgt jedoch nur $37,53 \text{ ng/cm}^2$, woraus sich eine Umsatzrate von 17,36 % ergibt. Im Fall des Fmoc-geschützten β-Alanins macht die Fmoc-Schutzgruppe 71,7 % des gesamten Molekulargewichtes aus. Da für die Einführung des geschützten Alanins ein Verschiebungsbetrag von 1,07 nm festgestellt wurde, sollte der back-shift nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe demnach etwa 0,77 nm betragen. Dies entspricht exakt dem tatsächlich beobachteten Betrag.

Für die Abspaltung der Fmoc-Gruppe (Molgewicht = $223,3 \text{ g/mol}$) ergibt sich unter Berücksichtigung des Bedeckungsgrades der Thiol-Monolage (85%) und der bei der Fmoc-Alanin-Umsetzung erzielten Umsatzrate (17,4%) eine Massenbelegung von $26,92 \text{ ng/cm}^2$; dieser Wert entspricht demjenigen, welcher für die Abspaltung der Schutzgruppe anhand der

LSPR-Verschiebung berechnet wurde. Demnach fand eine effektive (100%-ige) Schutzgruppen-Abspaltung statt.

Um die LSPR-basierenden Schichtdicken beurteilen zu können, wurden diese zusätzlich XP-spektroskopisch ermittelt.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Zur Kontrolle der einzelnen Funktionalisierungsschritte sowie zur Bestimmung der jeweiligen Adsorbatschichtdicken nach Gleichung (104) wurden XP-Spektren von den Nanopartikel-Oberflächen aufgenommen.

Auch hier trat eine Probenaufladung auf, welche zu einer Dublettaufspaltung der detektierten Signale führte.

In der folgenden Abbildung ist der mit der Einführung des Fmoc-geschützten β -Alanins und der Schutzgruppenabspaltung verbundene Verlauf der C1s-Intensität dargestellt; rechts sind die angepassten C1s-Detailspektren abgebildet.

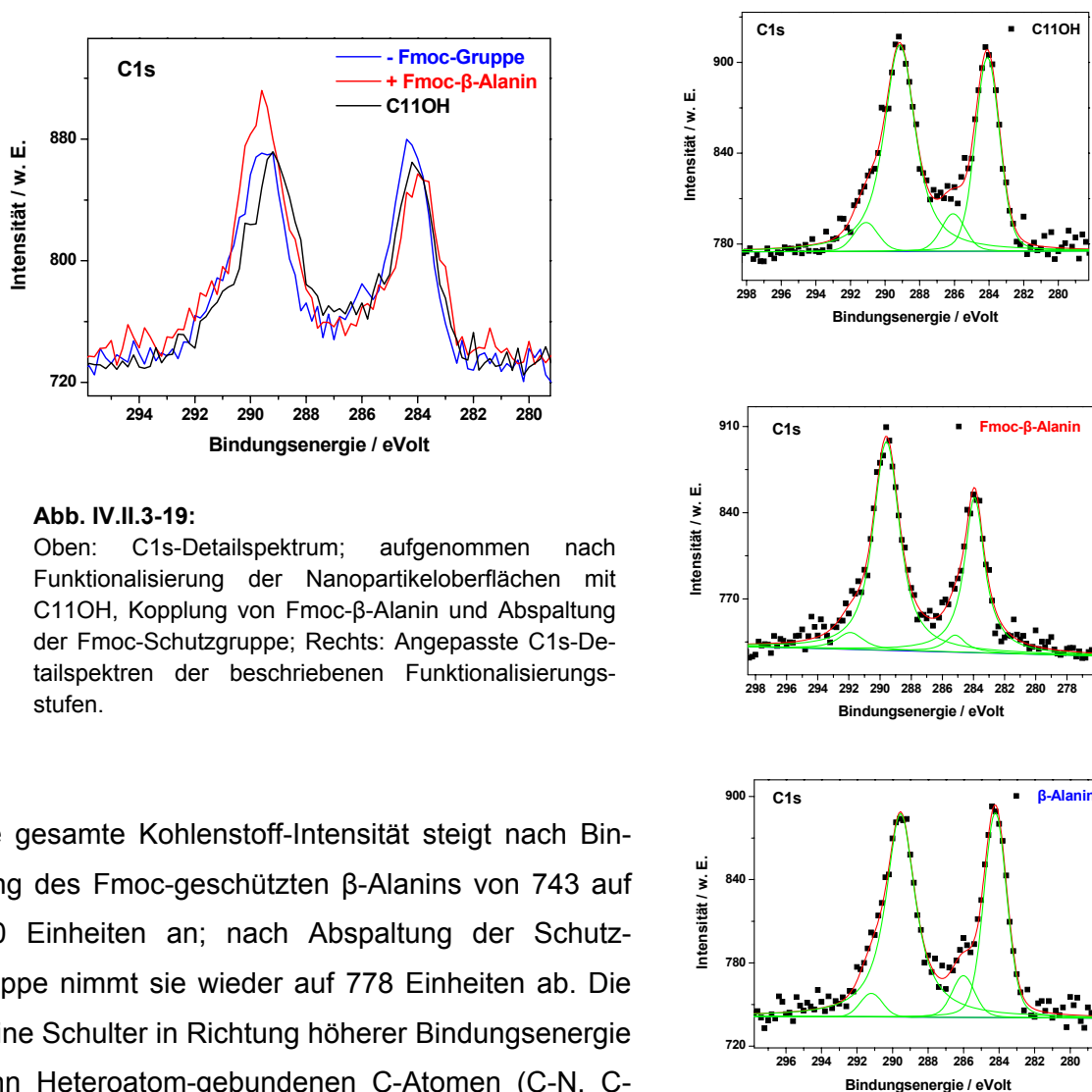


Abb. IV.II.3-19:

Oben: C1s-Detailspektrum; aufgenommen nach Funktionalisierung der Nanopartikeloberflächen mit C11OH, Kopplung von Fmoc- β -Alanin und Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe; Rechts: Angepasste C1s-Detailspektren der beschriebenen Funktionalisierungsstufen.

Die gesamte Kohlenstoff-Intensität steigt nach Bindung des Fmoc-geschützten β -Alanins von 743 auf 880 Einheiten an; nach Abspaltung der Schutzgruppe nimmt sie wieder auf 778 Einheiten ab. Die kleine Schulter in Richtung höherer Bindungsenergie kann Heteroatom-gebundenen C-Atomen (C-N, C-

O) zugeordnet werden.

Der in Abbildung IV.II.3-19 dargestellte Verlauf der C1s-Intensität bestätigt somit über den Anstieg der C1s-Intensität eine effektive Umsetzung der OH-terminierten Oberflächen mit dem aktivierten Fmoc- β -Alanin; die nach der Fmoc-Abspaltung beobachtete Abnahme der C1s-Intensität zeigt weiterhin den Verlust der Schutzgruppe an.

Die Kopplung der Antikörper kann ebenfalls anhand der C1s-Detailspektren analysiert werden. In der Abbildung IV.II.3-20 ist der nach Bindung des 1. und 2. Antikörpers erhaltene Verlauf der C1s-Intensität dargestellt; rechts sind die angepassten C1s-Detailspektren abgebildet.

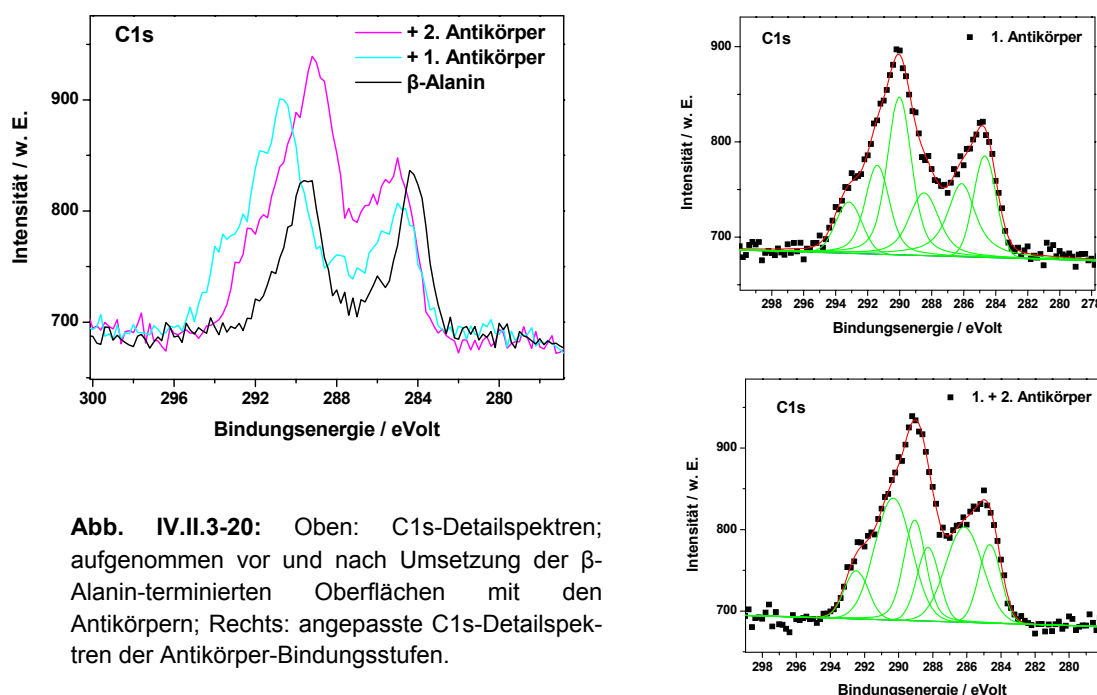


Abb. IV.II.3-20: Oben: C1s-Detailspektren; aufgenommen vor und nach Umsetzung der β -Alanin-terminierten Oberflächen mit den Antikörpern; Rechts: angepasste C1s-Detailspektren der Antikörper-Bindungsstufen.

Die gesamte Intensität der zusätzlichen, auf die Proteine zurückzuführenden C1s-Signale bei 285,1 und 288,3 eV beträgt nach Bindung des 1. Antikörpers 744,7 Einheiten. Die 2. Proteinlage (Schichtdickenbeitrag von 9,3 Å) bewirkt einen weiteren Intensitätsanstieg auf 974,4 Einheiten. Dagegen nimmt die C1s-Alkylintensität nach Bindung des Erstantikörpers von einer Gesamtintensität von 697 auf 560,3 Einheiten ab; nach Umsatz mit dem Zweitantikörper weist sie nur noch eine Intensität von 382 Einheiten auf.

Die Ladungsaufspaltung beträgt in der oberen Abbildung (1. Antikörper) 5,1 eV und in der unteren Abbildung (2. Antikörper) etwa 4,0 eV.

Die Bindung der Antikörper kann außerdem anhand des Verlaufs der N1s-Intensität nachgewiesen werden, welche eindeutig diesen Biomolekülen zugeordnet werden kann.

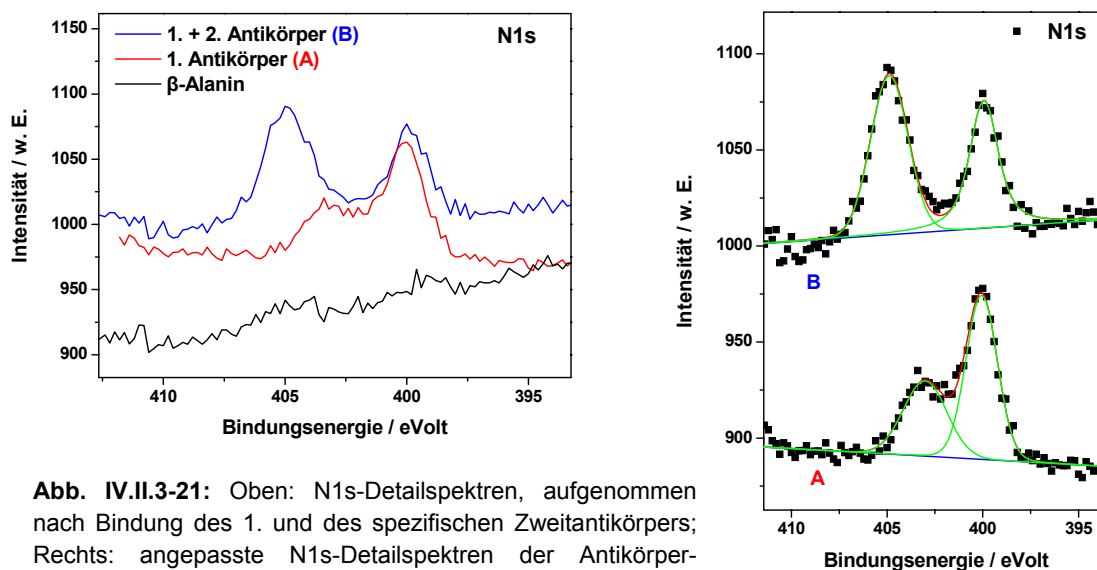


Abb. IV.II.3-21: Oben: N1s-Detailspektren, aufgenommen nach Bindung des 1. und des spezifischen Zweitantikörpers; Rechts: angepasste N1s-Detailspektren der Antikörper-Bindungsstufen.

Die gesamte N1s-Intensität steigt nach Kopplung des 1. Antikörpers von 290 Einheiten um den Faktor 1,27 auf 367 Einheiten an. Dieser Faktor liegt auch hier etwas niedriger als der anhand des Schichtdickenanstiegs ermittelte Faktor von 1,35.

Über die Abschwächung der Intensität der Substratlage wurden die Schichtdicken der einzelnen Funktionalisierungsstufen nach Gleichung (104) ermittelt. Die auf diese Weise ermittelten Schichtdicken sind in der Tabelle angegeben; zum Vergleich sind ebenfalls diejenigen Werte aufgeführt, welche auf Grundlage der LSPR-Verschiebungen berechnet werden konnten.

Stufe	XPS	LSPR
	Schichtdicke /Å	Schichtdicke /Å
C11OH	9,43	12,59
β-Fmoc-Alanin	16,95	15,71
β-Alanin	12,07	12,58
1. Antikörper	40,83	38,79
2. Antikörper	50,77	48,07

Tab. IV.II.3-14: Röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelte und anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechnete Schichtdicken der angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Die mittels beider Methoden erhaltenen Werte stimmen insgesamt gut überein. Auch hier wird die vorliegende Massenbelegung im Bereich höherer Schichtdicken LSPR-spektroskopisch nicht unterschätzt, so dass innerhalb des betrachteten Bereiches von Schichtdicken

von einer linearen Sensorantwort ausgegangen werden kann. Die Massenbelegung der Antikörper wurde zusätzlich anhand enzymkinetischer ELISA-Messungen ermittelt.

Enzymkinetische ELISA-Messungen

Durch die Verwendung Peroxidase-markierter Antikörper konnte die Massenbelegung der Antikörper zusätzlich mittels eines Oberflächen-modifizierten ELISAs quantifiziert werden. Die Abbildung IV.II.3-22 zeigt den UV/Vis-spektroskopisch detektierten Anstieg der Konzentration des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS.

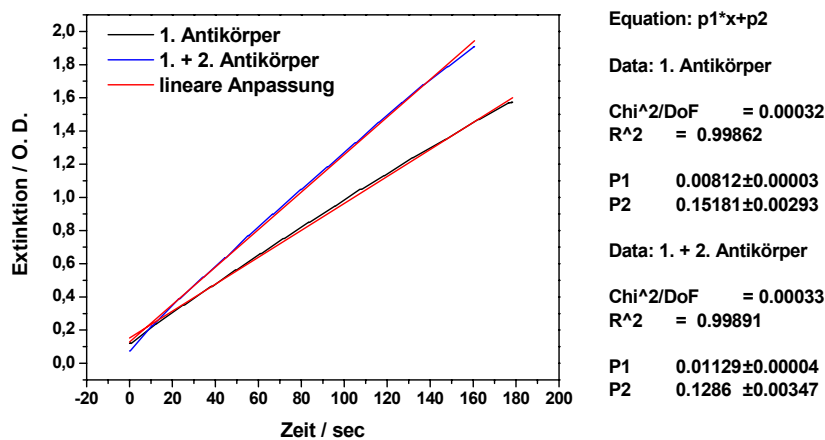


Abb. IV.II.3-22:

UV/Vis-spektroskopisch detektiert Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS; Anpassung nach Michaelis-Menten zur Bestimmung der Massenbelegung an Antikörpern.

In der Tabelle IV.II.3-15 sind die erhaltenen Massebelegungen angegeben; zum Vergleich sind außerdem die auf Basis der LSPR-Messungen berechneten Antikörper-Belegungsdichten aufgeführt; die rechte Spalte enthält die auf Basis der ELISA-Messungen ermittelten LSPR-Eichwertfaktoren bezüglich der Massenbelegung.

Stufe	Massenbelegung		ELISA-Eichwert
	LSPR / ng/cm ²	ELISA / ng/cm ²	/ ng/(cm ² *nm)
1. Antikörper	225,53	198,60	30,89
1. + 2. Antikörper	305,41	312,28	35,85

Tab. IV.II.3-15: Enzymkinetisch mittels des ELISAs und anhand der LSPR-Verschiebung bestimmte Massenbelegung der Antikörper; ELISA-basierender Eichwert bzgl. der Massenbelegung (rechte Spalte).

Die enzymkinetisch ermittelten Belegungsdichten stimmen insgesamt gut mit denen überein, welche anhand der LSPR-Messungen berechnet wurden.

Interpretation und Fazit

Die dargestellten Ergebnisse zeigen somit auch hier, dass die optisch aktiven Nanopartikeloberflächen neben einer markierungsfreien auch eine quantitative Interpretation von Bindungsereignissen zulassen. Der lineare Antwortbereich der Sensoroberflächen erstreckt sich dabei auf einen Abstand von mindestens 20 nm von der Oberfläche (~ Größenordnung der ausgebildeten Antikörper-Sandwich-Strukturen).

3.1.1.4 Gesamtbetrachtung

Die Antikörper-Bindungsstudien an den nicht-proteinresistenten Matrizen wurden mittels unterschiedlicher Methoden analysiert. Hierbei ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den röntgenphotoelektronenspektroskopisch bestimmten Schichtdicken und denen, welche anhand der Verschiebung der LSP-Resonanzlage berechnet wurden. Die Massenbelegung der Antikörper wurde zusätzlich über einen oberflächenmodifizierten ELISA ermittelt; auch diese Werte sind den LSPR-basierenden Massenbelegungen sehr ähnlich.

Somit wird zum einen die Gültigkeit der LSPR-Eichwertfaktoren bestätigt, deren Bestimmung in Abschnitt 2 beschrieben ist. Weiterhin zeigt sich, dass die LSPR-Sensorantwort in dem betrachteten Bereich von Massenbelegungen und Schichtdicken als näherungsweise linear abhängig von diesen Werten betrachtet werden kann. Hierbei ist zu beachten, dass die makromolekularen Antikörper im Normalfall keine Monolage einheitlicher Schichtdicke ausbilden, sondern inselartig auf der Oberfläche adsorbieren. Die angegebenen Schichtdicken entsprechen daher lateral gemittelten Werten.

Die Aussage einer linearen Sensorantwort bezieht sich daher nicht auf die angegebenen mittleren Schichtdicken, sondern die tatsächlich vorliegenden lokal variierenden Absolutwerte. Unter Berücksichtigung einer Basisfilm-Schichtdicke von 20 Å und der Adsorption zweier Lagen Antikörper (Erst- und spezifischer Zweitantikörper) mit Ausdehnungen von etwa 10 nm pro IgG-Molekül (s. Abb. IV.II.3-8), liegen die maximalen Schichtdicken somit bei ungefähr 22 nm. Über diesen Abstandsbereich von der Sensoroberfläche hinweg kann daher eine quantitative Analyse von Bindungsereignissen näherungsweise nach einem linearen Modell und somit unter Verwendung der Eichwertfaktoren aus Abschnitt 2 erfolgen.

Die folgenden Graphiken fassen die Ergebnisse der Abschnitte 3.1.1 bis 3.1.3 zusammen. Gezeigt ist für die unterschiedlichen Basisfilme jeweils die mittels der unterschiedlichen Methoden analysierte Antikörper-Bindung. In der Abbildung IV.II.3-23 ist der Anstieg der C1s-Intensität der Proteine sowie der N1s-Intensitätsanstieg dargestellt, welcher ebenfalls auf diese Biomoleküle zurückzuführen ist. Die mittels des ELISA-Assays erhaltenen Antikörper-Massenbelegungen sowie die LSPR-spektroskopisch bestimmten Schichtdicken sind in der Abbildung IV.II.3-24 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die verschiedenen Methoden (XPS,

ELISA, LSPR) zu einem sehr ähnlichen Verlauf führen, womit die vorstehend dargestellten Auswertungen bestätigt werden.

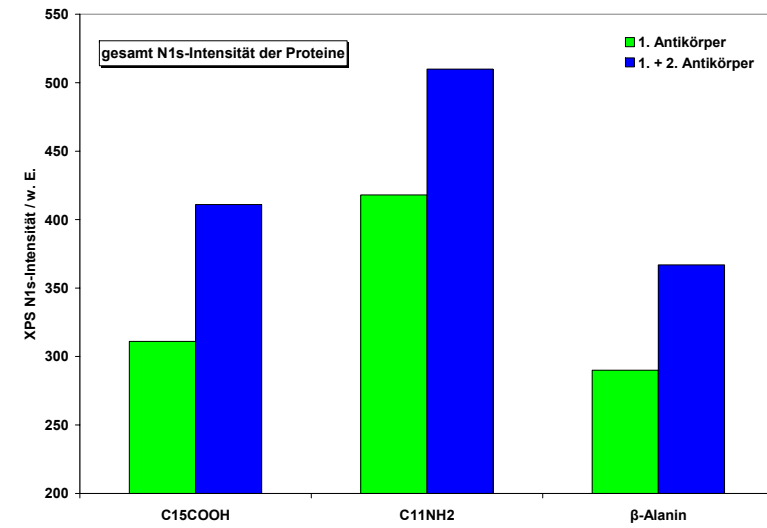
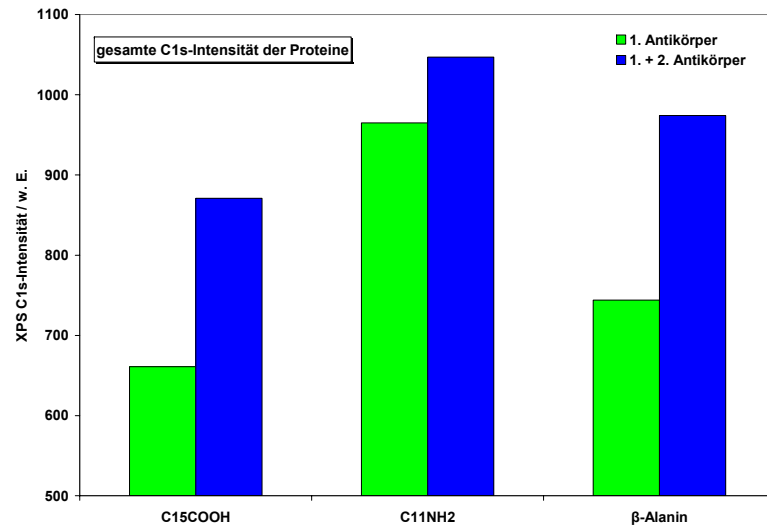


Abb. IV.II.3-23: Gesamte C1s-Intensität (links) und N1s-Intensität (rechts) der Proteine; ermittelt durch Anpassung der nach Bindung des 1. und des spezifischen Antigens an die verschiedenen Basisfilme (C15COOH, C11NH₂ und β-Alanin-terminiert) aufgenommenen XP-Spektren.

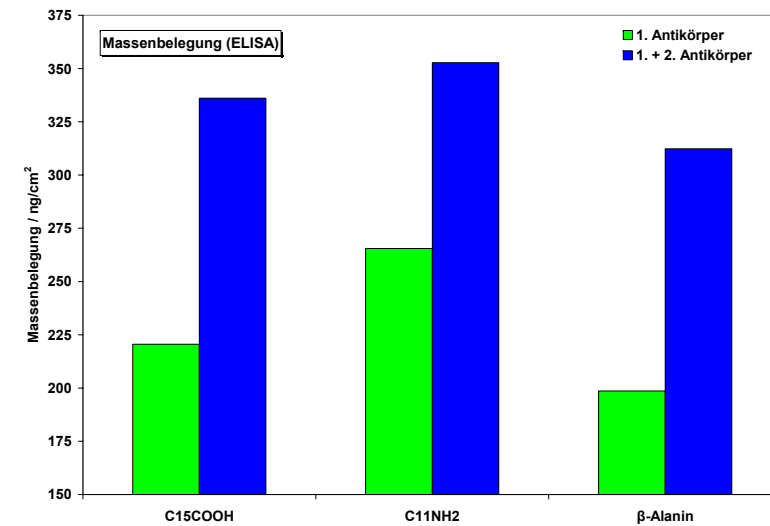
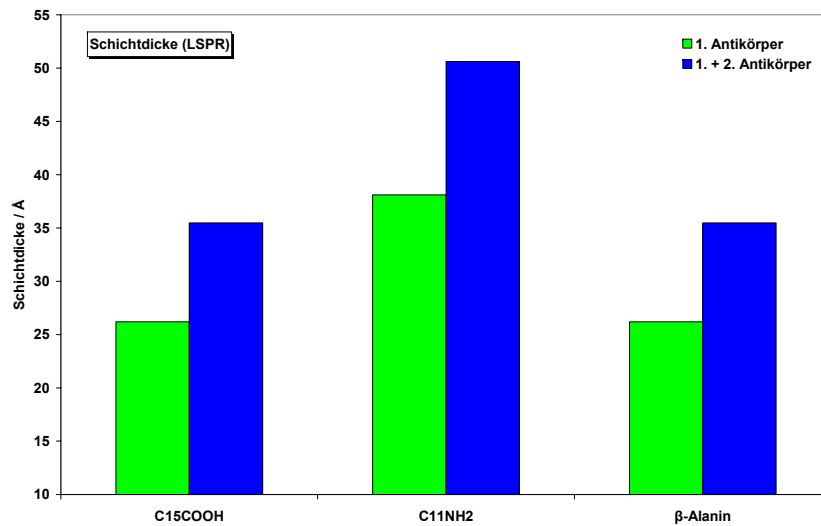


Abb. IV.II.3-24: LSPR-spektroskopisch ermittelter Schichtdickenanstieg (links) und enzymkinetisch ermittelte Antikörper-Massenbelegung (rechts); ermittelt nach Bindung des Erst- und des spezifischen Zweitantikörpers an die verschiedenen Basisfilme (C15COOH, C11NH₂ und β-Alanin-terminiert).

3.1.2 Verwendung proteinresistenter PEG-Matrices

Anschließend wurden zur kovalenten Immobilisierung der Antikörper einige der bereits in Kapitel IV.I beschriebenen proteinresistenten PEG-Basisfilme verwendet. Die Auswertung der Antikörper-Antigen-Assays erfolgte analog zu derer der nicht-proteinresistenten Basisfilme durch Aufnahme von XPS- und LSPR-Spektren sowie anhand enzymkinetischer ELISA-Messungen; im Folgenden sind daher nur kurz die Ergebnisse dieser Kopplungsstudien zusammengefasst. Einzelheiten bezüglich der Durchführung sind in Kapitel III, Abschnitt 4.5 beschrieben; eine Gesamtbetrachtung zu diesen Bindungsstudien befindet sich in Abschnitt 3.1.2.4.

3.1.2.1 Antikörper-Kopplung an EG30COOH-terminierte Oberflächen

In der Abbildung IV.II.3-25 ist das Funktionalisierungsschema dieses Bindungsassays schematisch dargestellt.

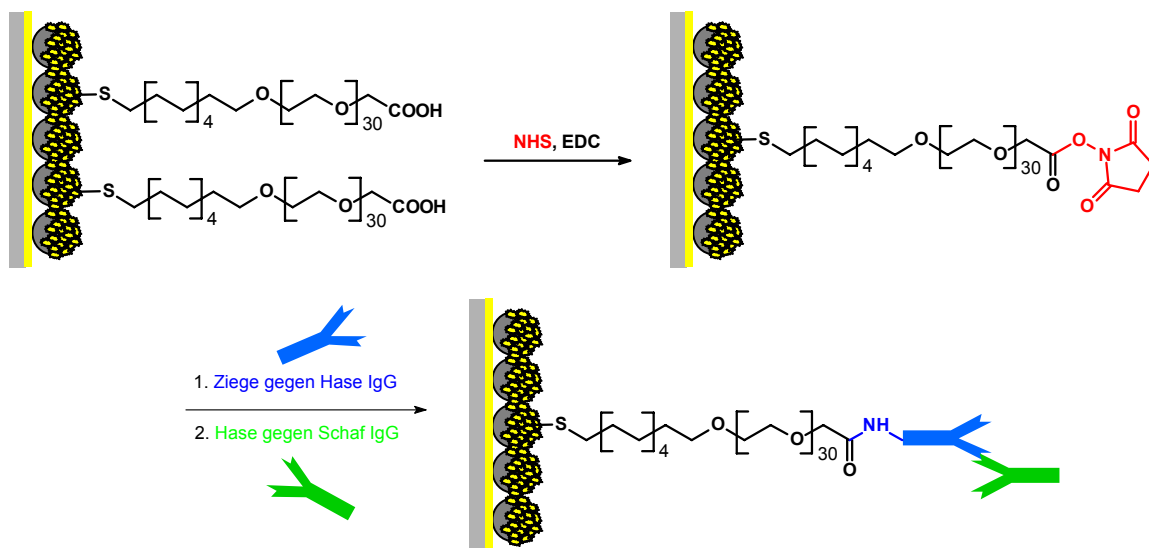


Abb. IV.II.3-25: Kovalente Bindung von Antikörpern an EG30COOH-terminierte Nanopartikeloberflächen und Umsetzung mit dem spezifischen Antigen.

LSPR-Messungen

Nach jeder der beschriebenen Bindungsstufen wurden LSPR-Spektren aufgenommen. In der Abb. IV.II.3-26 sind von einer Probe jeweils die Übersichtsspektren sowie der Detailausschnitt der 400nm-Resonanz gezeigt.

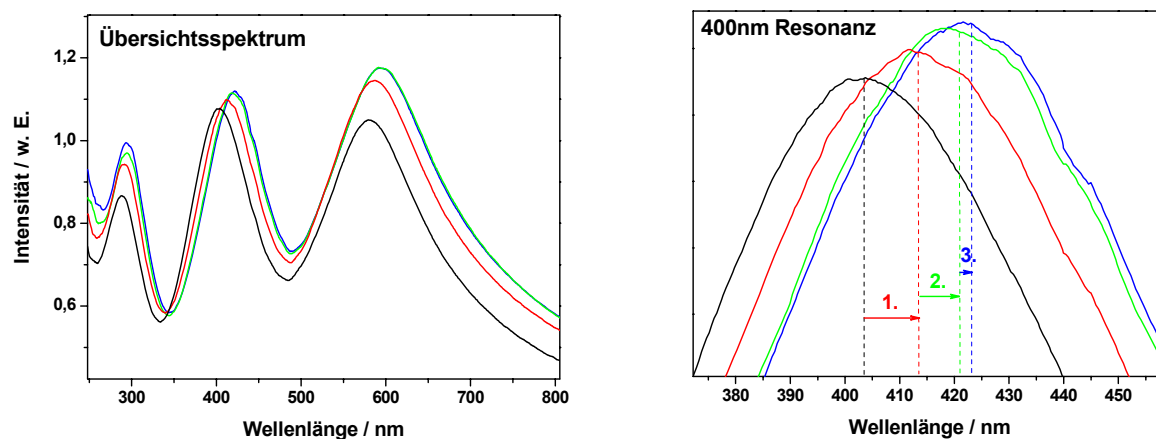


Abb. IV.II.3-26: Übersichts-LSPR- (links) und Detailspektrum der 400er LSP-Resonanz (rechts); aufgenommen nach Funktionalisierung mit EG30COOH und Bindung der Antikörper.

3. — spez. Antigen
 2. — 1. Antikörper
 1. — EG30COOH
 — vor Adsorption

Die Tabelle IV.II.3-16 enthält die absoluten Verschiebungsbeträge; diese beziehen sich auf die jeweilige Vorstufe und entsprechen einer Mittelwertbildung aus 6 bis maximal 12 ausgewerteten Spektren verschiedener Nanopartikelspots.

Stufe	LSPR bei 300 nm		LSPR bei 400 nm		LSPR bei 600 nm	
	$\Delta\lambda_{max}$	SD	$\Delta\lambda_{max}$	SD	$\Delta\lambda_{max}$	SD
EG30COOH	3,82	0,82	9,49	1,35	7,61	2,21
1. AK	3,27	0,83	8,26	1,26	9,86	1,56
2. AK	0,59	0,45	1,15	0,69	1,80	0,63

Tab. IV.II.3-16: Mittlere LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm und zugehörige Standardabweichung nach Funktionalisierung mit EG30COOH und Bindung der Antikörper.

Die normierten Verschiebungsbeträge sind in der Tabelle IV.II.3-17 aufgeführt.

Stufe	LSPR bei 300 nm	LSPR bei 400nm	LSPR bei 600 nm
	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$
EG30COOH	1	2,48	1,99
1. Antikörper	1	2,53	3,02
2. Antikörper	1	1,95	3,05

Tab. IV.II.3-17: Auf die Verschiebung der 300er-Resonanz normierte LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm.

Auch hier ergibt sich dieselbe Rangordnung bezüglich der Sensor-Sensitivitäten der drei LSP-Resonanzen; diese liegen zudem in einer ähnlichen Größenordnung wie in den bereits beschriebenen Antikörper-Bindungsstudien, wodurch die Vermutung einer proportionalen Reaktion bekräftigt wird.

Mit Hilfe der Eichwertfaktoren aus Abschnitt 2 wurden auf Basis der mittleren Resonanzverschiebungen Schichtdicke und Massenbelegung der jeweiligen Adsorbatlagen bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt; sie entsprechen dem Schichtdickenanstieg und der Zunahme der Massenbelegung, die mit den angegebenen Funktionalisierungen verbunden sind.

Stufe	Schichtdicke Massenbelegung	
	/Å	/ ng/cm²
EG30COOH	38,68	332,98
1. Antikörper	33,66	289,72
1. + 2. Antikörper	4,67	40,16

Tab. IV.II.3-18: Anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechneter und mit den angegebenen Funktionalisierungen verbundener Zuwachs an Schichtdicke und Massenbelegung.

Von jeder Reaktionsstufe wurden Röntgenphotoelektronenspektren aufgenommen und die Schichtdicke nach Gleichung (104) berechnet.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Abbildung IV.II.3-27 zeigt die von den einzelnen Funktionalisierungsstufen aufgenommenen und angepassten C1s-, O1s- und N1s-Spektren. Die Tabelle IV.II.3-19 enthält die Signalpositionen, welche der PEG-Matrix und den gebundenen Proteinen zugeordnet werden können.

	XPS-Spezies	XPS-Position /eV
PEG-Basisfilm	Alkyl-C1s	284,4
	Ether-C1s	286,5
	Ether-O1s	532,7
gebundene Proteine	C1s-N	285,1
	C1s=O	287,8
	N1s (Amin, Amid)	400,3

Tab. IV.II.3-19: XP-Signalpositionen der PEG-Matrix und der an dieser immobilisierten Proteine.

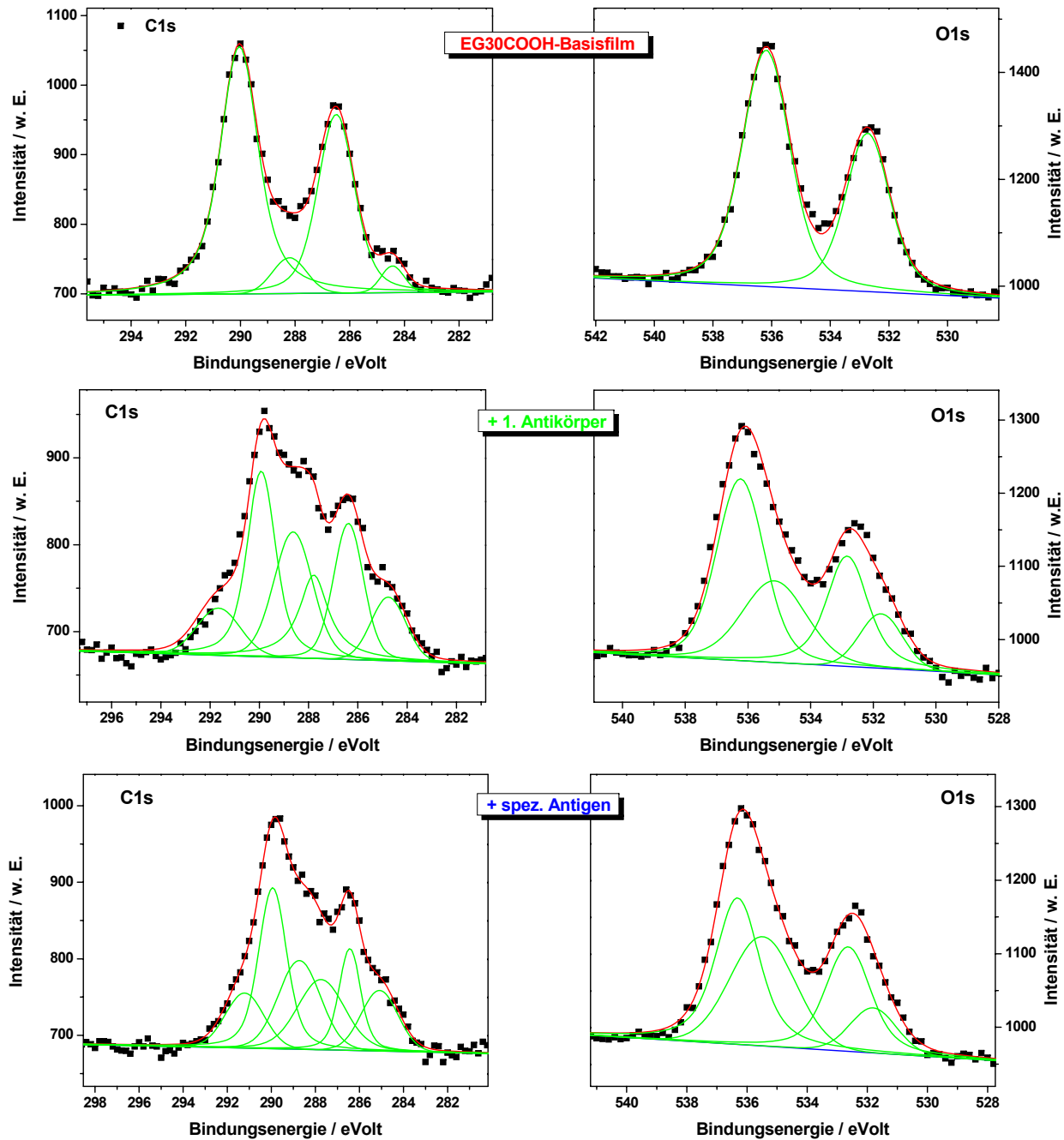
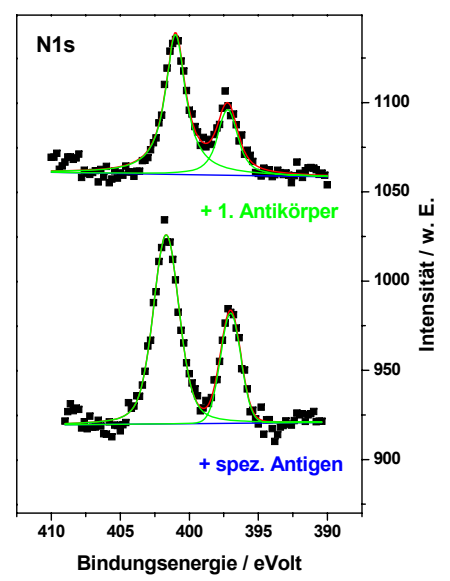


Abb. IV.II.3-27:

Integration von Antikörper-Antigen-Assays in EG30COOH-terminierte Basisfilme.

Angepasste C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren; aufgenommen nach Funktionalisierung mit dem Basisfilm EG30COOH (oben), nach kovalenter Bindung des Erstantikörpers (Mitte) und der Umsetzung mit dem spezifischen Antigen (unten).

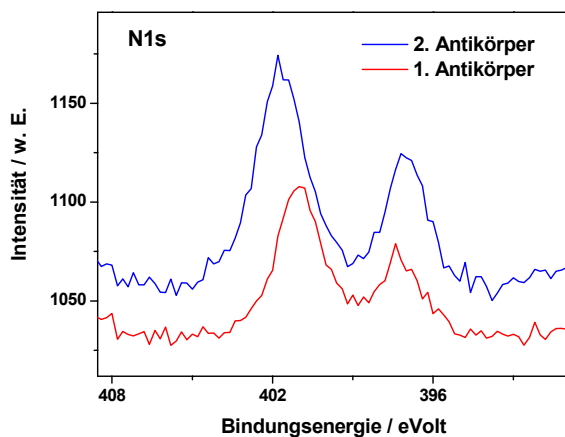


In den gezeigten Spektren der EG30COOH-Monolage beträgt das gesamte Ether-C1s/O1s-Verhältnis ebenso wie das Verhältnis der jeweiligen zueinander gehörenden Ether-Einzel-signale 1,88 (Sollwert 1,88). Oberflächen-Verunreinigungen der Proben können somit ausgeschlossen werden.

Die Gesamtintensität der den Proteinen zu zuordnenden Kohlenstoffe steigt nach Bindung des 1. Antikörpers von einer Gesamtintensität von 766 Einheiten auf 869 Einheiten nach Bindung des 2. Antikörpers an. Dagegen nimmt die gesamte Ether-C1s-Intensität nach der Umsetzung mit dem spezifischen Zweitantikörper um etwa 55 Einheiten ab, was auf den zusätzlichen Abschwächungsbeitrag dieser zweiten Antikörper-Lage zurückgeführt werden kann.

Ebenso nimmt auch die Gesamtintensität der Carbonyl-gebundenen Sauerstoffe der Proteine nach der Bindung des 1. Antikörpers von 438 auf 525 Einheiten zu und die Ether-O1s-Intensität wird durch die Ausbildung der zweiten Antikörper-Lage von 844 um etwa 68 Einheiten reduziert, was auch hier auf den zusätzlichen Abschwächungsbeitrag dieser zweiten Proteinlage zurückgeführt werden kann.

Das durch Integration der Signale erhaltene Ether-C/O-Verhältnis beträgt sowohl nach Kopplung des Erst- als auch des spezifischen Zweitantikörpers 1,88 und stimmt somit mit



Tab. IV.II.3-28: N1s-Detailsspektren; aufgenommen nach kovalenter Bindung des Erstantikörpers und Umsetzung mit dem spezifischen Antigen.

dem Sollwert überein. Die durch Anpassung der Spektren ermittelte Ladungsaufspaltung beläuft sich in den gezeigten Spektren auf etwa 3,6 eV.

Die Abb. IV.II.3-28 zeigt den Verlauf der N1s-Intensität. Die gesamte N1s-Intensität (inklusive des Aufspaltungsbeitrags) steigt von 305 Einheiten auf 402 Einheiten nach Umsatz mit dem spezifischen Antigen an.

Anhand der Abschwächung der Au-Substratlage wurden die Schichtdicken der jeweiligen Adsorbatlagen ermittelt. Diese sind zusammen mit den Werten, die auf Grundlage der LSPR-Verschiebungen

berechnet wurden in der Tabelle IV.II.3-20 aufgeführt.

Stufe	XPS	LSPR
	Schichtdicke /Å	Schichtdicke /Å
EG30COOH	43,70	38,68
+ 1. Antikörper	73,99	72,34
+ 1. + 2. Antikörper	77,35	77,00

Tab. IV.II.3-20: Röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelte und anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechnete Schichtdicken der angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Die ermittelten Schichtdicken stimmen gut überein, wodurch auch hier gezeigt wird, dass die LSPR-aktiven Sensoroberflächen zur quantitativen Detektion von Bindungsereignissen geeignet sind.

Die Massenbelegung der Antikörper wurde außerdem enzymkinetisch bestimmt.

Enzymkinetische ELISA-Messungen

In der Tabelle IV.II.3-21 sind die enzymkinetisch ermittelten Antikörper-Massenbelegungen der Peroxidase-markierten Antikörper aufgeführt; zusätzlich sind auch die Massenbelegungen angegeben, welche auf Basis der LSPR-Messungen berechnet wurden. Die rechte Spalte enthält den Eichwert bezüglich der Massenbelegung, der mittels der ELISA-Werte berechnet wurde.

Stufe	Massenbelegung		ELISA-Eichwert
	LSPR / ng/cm²	ELISA / ng/cm²	/ ng/(cm²*nm)
1. Antikörper	289,7	285,20	34,53
2. Antikörper	329,88	339,91	36,12

Tab. IV.II.3-21: Enzymkinetisch mittels des ELISAs und anhand der LSPR-Verschiebung bestimmte Massenbelegung der Antikörper; ELISA-basierender Eichwert bzgl. der Massenbelegung (rechte Spalte).

Beide Methoden (LSPR und ELISA) führen zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Somit ergibt sich anhand der ELISA-Massenbelegungen ein Eichwertfaktor, der ebenfalls gut mit dem anhand von XPS-Messungen ermittelten Faktor (35,1 ng/(cm²*nm)) übereinstimmt.

3.1.2.2 Antikörper-Kopplung an EG17NH₂-terminierte Oberflächen

Die einzelnen Funktionalisierungsschritte zur Immobilisierung von Antikörpern an EG17NH₂-terminierte Oberflächen sind in der Abbildung IV.II.3-29 gezeigt.

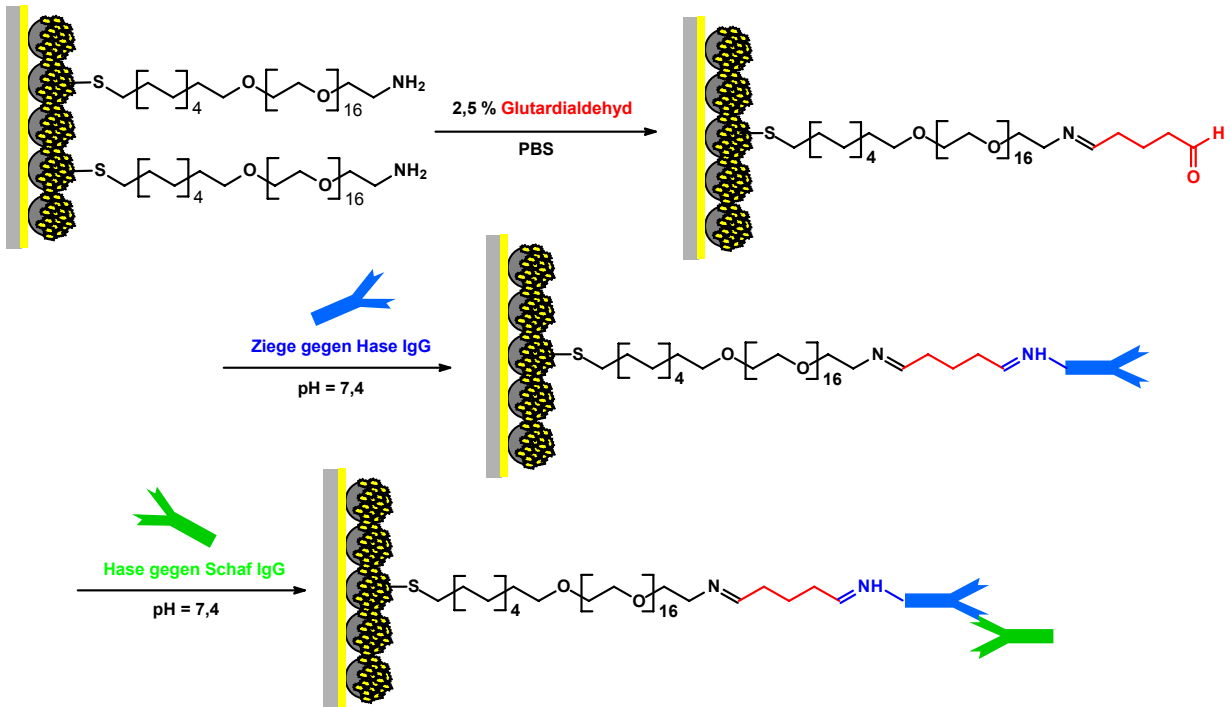


Abb. IV.II.3-29: Kovalente Bindung von Antikörpern an EG17NH₂-terminierte Nanopartikeloberflächen und Umsetzung mit dem spezifischen Antigen.

LSPR-Messungen

Die Abbildung IV.II.3-30 zeigt die nach den verschiedenen Funktionalisierungsstufen von einem Proben spot aufgenommenen Übersichtsspektren sowie den Detailausschnitt der 400er Resonanz.

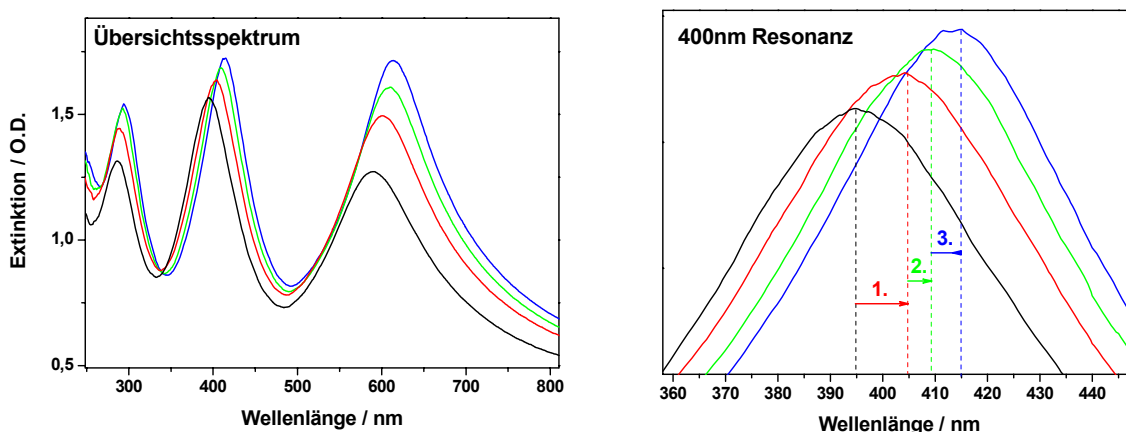


Abb. IV.II.3-30: Übersichts-LSPR- (links) und Detailspektrum der 400er LSP-Resonanz (rechts); aufgenommen nach Funktionalisierung mit EG17NH₂ und Bindung der Antikörper.

3. — spez. Antigen
2. — 1. Antikörper
1. — EG17NH₂
— vor Adsorption

Die Tabelle IV.II.3-22 enthält die Verschiebungsbeiträge, welche mit den einzelnen Reaktionsschritten verbunden sind; sie entsprechen einer Mittelwertbildung aus 6 bis max. 12 ausgewerteten Spektren verschiedener Probenspots.

Stufe	LSPR bei 300 nm		LSPR bei 400 nm		LSPR bei 600 nm	
	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>
EG17NH2	3,51	0,74	9,20	0,94	12,58	4,44
1. AK	1,48	1,30	4,44	0,53	5,91	1,24
2. AK	2,03	0,27	5,05	0,46	8,85	6,03

Tab. IV.II.3-22: Mittlere LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm und zugehörige Standardabweichung nach Funktionalisierung mit EG17NH₂ und Bindung der Antikörper.

Die nach Gleichung (113) berechneten normierten Verschiebungsbeträge sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Stufe	LSPR bei 300 nm	LSPR bei 400nm	LSPR bei 600 nm
	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$
EG17NH2	1	2,62	3,58
1. AK	1	3,00	3,99
2. AK	1	2,49	4,36

Tab. IV.II.3-23: Auf die Verschiebung der 300er-Resonanz normierte LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm.

Auch hier ergibt sich eine ähnliche Beziehung zwischen den Verschiebungsbeträgen der drei Extinktionsmaxima. Die LSP-Resonanz bei 400 nm ist etwa 2,7-fach sensitiver als diejenige bei 300 nm; die 600nm Resonanz besitzt die höchste sensorische Empfindlichkeit gegenüber Adsorptionsprozessen.

Mit Hilfe der Eichwertfaktoren aus Abschnitt 2 wurden auf Grundlage der Verschiebungen der 400nm Resonanz Schichtdicke und Massenbelegung der jeweiligen Adsorbatlagen ermittelt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle IV.II.3-24 angegeben; sie entsprechen dem Anstieg, der mit der angegebenen Funktionalisierung verbunden ist.

Stufe	Schichtdicke /Å	Massenbelegung / ng/cm ²
EG17NH2	37,49	322,69
1. Antikörper	18,11	155,85
2. Antikörper	20,58	177,13

Tab. IV.II.3-24: Anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechneter und mit den angegebenen Funktionalisierungen verbundener Zuwachs an Schichtdicke und Massenbelegung.

Die Schichtdicken wurden außerdem röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelt.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die nach den einzelnen Funktionalisierungsstufen aufgenommenen C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren sind in der Abbildung IV.II.3-31 dargestellt.

Die Spektrenanpassung ergibt für die zueinander gehörenden Einzelsignale (leitender und aufgeladener Probenuntergrund) ein Ether-C1s/O1s-Verhältnis von 2,06. Dieses stimmt mit dem Sollwert überein, so dass Verunreinigungen der Oberflächen ausgeschlossen werden können.

Die Gesamtintensität der auf die immobilisierten Proteine zurückzuführenden C1s-Signale steigt nach der Bindung des 1. Antikörpers von 682 Einheiten um den Faktor 1,3 auf etwa 898 Einheiten nach Umsatz mit dem spezifischen Antigen an. Laut der LSPR-spektroskopisch ermittelten Schichtdicken führt die Bindung des 2. Antikörpers dagegen zu einem Schichtdickenanstieg um einen Faktor von etwa 2,1. XP-spektroskopisch wird die Kopplungsrate des 2. Antikörpers somit unterschätzt; Ursache ist, dass der Zweitantikörper in hohem Maße gebunden hat (Schichtdickenanstieg durch Erstantikörper $\sim 20,6$ Å), so dass ein wesentlicher Abschwächungsbeitrag durch diese 2. Proteinlage verursacht wird, der die Signalintensitäten reduziert. Daher nimmt auch die gesamte Ether-C1s-Intensität nach der Bindung des Zweitantikörpers von 797 auf etwa 579 Einheiten ab.

Analog zur Auswertung der C1s-Detailspektren kann die Immobilisierung der Proteine auch anhand der O1s-Detailspektren analysiert werden. Die Intensität der Carbonyl-gebundenen Sauerstoffe der Proteine (531,5 eVolt) nimmt nach der Bindung des 1. Antikörpers von 271 um den Faktor 1,6 auf 435 Einheiten zu; dagegen wird die Intensität des Ether-O1s-Signals nach der Kopplung des Zweitantikörpers von 965 um etwa 264 Einheiten reduziert, was auch hier auf den zusätzlichen Abschwächungsbeitrag der zweiten Proteinlage zurückgeführt werden kann. Das durch Anpassung der C1s- und O1s-Signale ermittelte Ether-C/O-Verhältnis liegt sowohl nach der Immobilisierung des Erst- als auch des spezifischen Zweitantikörpers bei 2,06 und stimmt mit dem Sollwert überein.

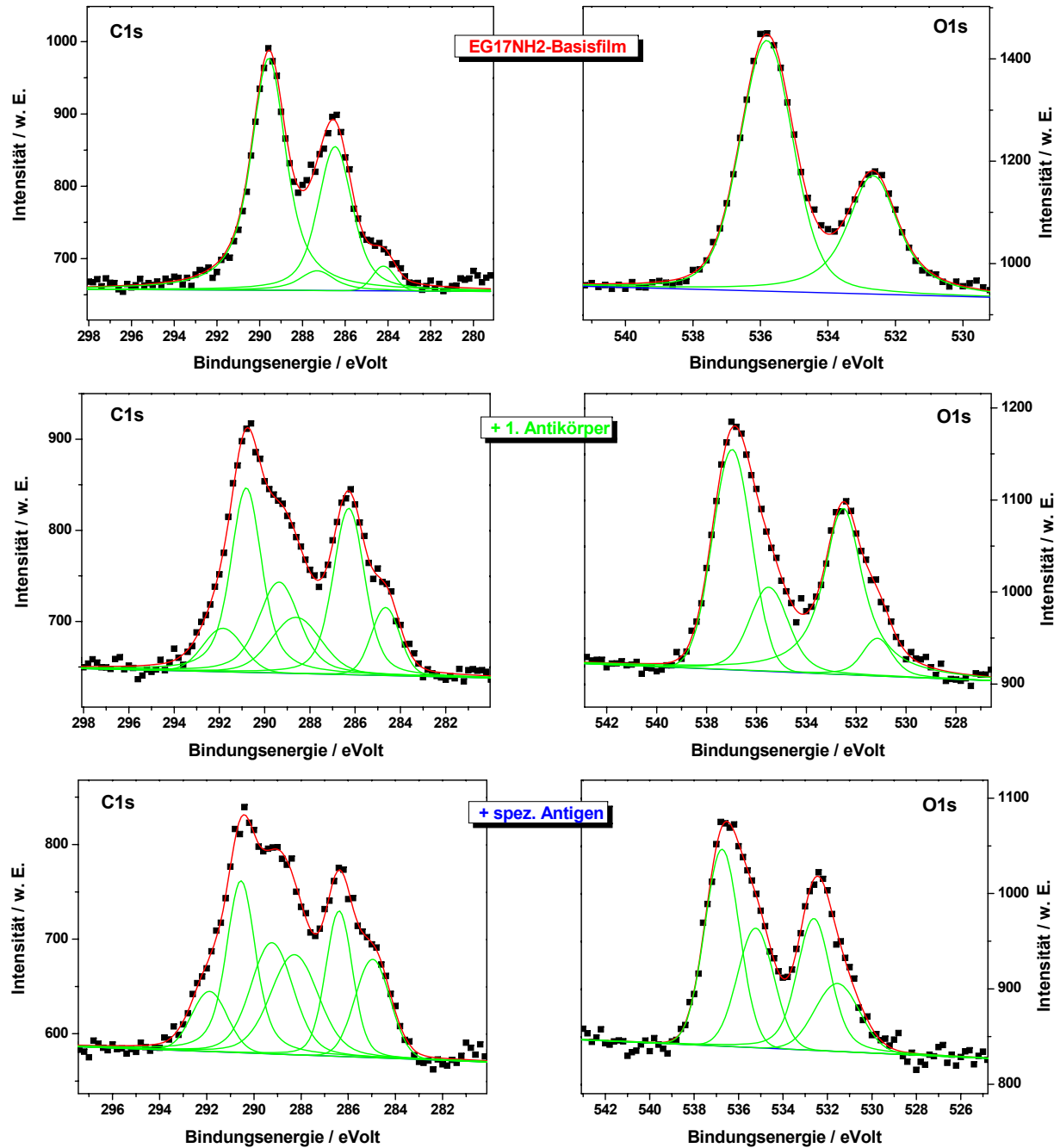
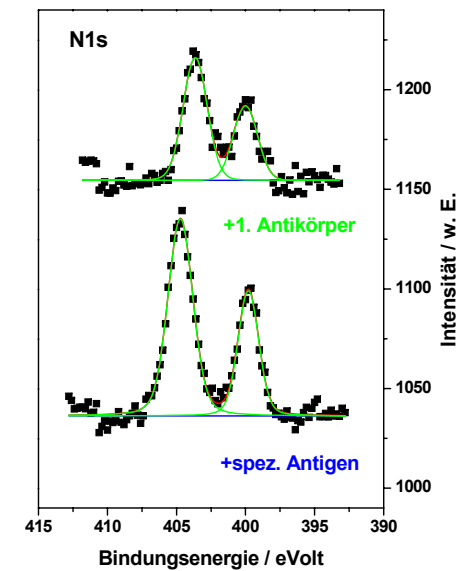
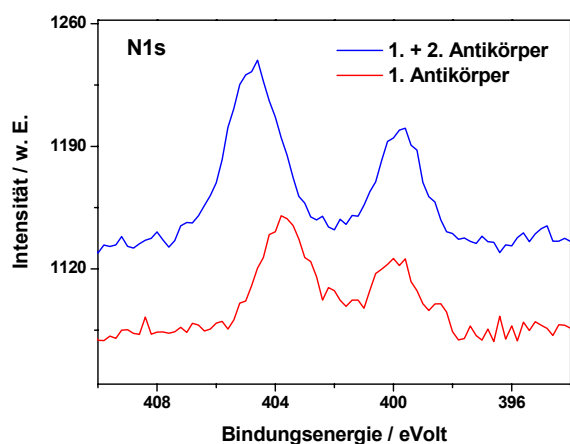


Abb. IV.II.3-31:

Integration von Antikörper-Antigen-Assays in EG17NH₂-terminierte Basisfilme.

Angepasste C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren; aufgenommen nach Funktionalisierung mit dem Basisfilm EG17NH₂ (oben), nach kovalenter Bindung des Erstantikörpers (Mitte) und der Umsetzung mit dem spezifischen Antigen (unten).





Tab. IV.II.3-32: N1s-Detailspektren; aufgenommen nach kovalenter Bindung des Erstantikörpers und der Umsetzung mit dem spezifischen Antigen.

In der Abb. IV.II.3-32 sind die nach Bindung des 1. Antikörpers und der Umsetzung mit dem spezifischen Antigen aufgenommenen N1s-Detailspektren gezeigt.

Die gesamte N1s-Intensität nimmt von 220 Einheiten um den Faktor 1,7 auf 373 Einheiten nach Bindung des spezifischen Antigens zu.

Die Schichtdicken der Adsorbatlagen wurden über die Abschwächung der Au4f-Intensität nach Gleichung (104) bestimmt und sind zusammen mit den LSPR-basierenden Werten in der Tabelle IV.II.3-25 aufgeführt.

Stufe	XPS	LSPR
	Schichtdicke /Å	Schichtdicke /Å
EG17NH2	40,51	37,49
+ 1. Antikörper	57,29	55,59
+ 2. Antikörper	63,58	76,17

Tab. IV.II.3-25: Röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelte und anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechnete Schichtdicken der angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Bis auf den für die 2. Antikörperlage ermittelten Werten stimmen die Schichtdicken gut mit den LSPR-basierenden Daten überein; für diese Stufe wird röntgenphotoelektronenspektroskopisch eine um etwa 13 Å niedrigere Schichtdicke erhalten. LSPR-spektroskopisch werden die Schichtdicken jedoch nicht unterschätzt. In dem betrachteten Bereich von Schichtdicken kann die Sensorantwort demnach als näherungsweise linear interpretiert werden.

Enzymkinetische ELISA-Messungen

Die Massenbelegung der Antikörper wurde ebenfalls enzymkinetisch ermittelt. Die ermittelten Massenbelegungen sind in der Tabelle IV.II.3-26 aufgeführt; die rechte Spalte enthält den auf Basis der ELISA-Werte ermittelten Eichwert bezüglich der Massenbelegung.

<i>Stufe</i>	<i>Massenbelegung</i>		<i>ELISA-Eichwert</i>
	<i>LSPR</i> <i>/ ng/cm²</i>	<i>ELISA</i> <i>/ ng/cm²</i>	<i>/ ng/(cm²*nm)</i>
+ 1. Antikörper	155,85	170,06	38,30
+ 2. Antikörper	332,98	341,75	36,01

Tab. IV.II.3-26: Enzymkinetisch mittels des ELISAs und anhand der LSPR-Verschiebung bestimmte Massenbelegung der Antikörper; ELISA-basierender Eichwert bzgl. der Massenbelegung (rechte Spalte).

Beide Methoden (ELISA und LSPR) führen zu ähnlichen Massenbelegungen, wodurch die Gültigkeit der in Abschnitt 2 ermittelten Eichwertfaktoren bestätigt wird.

3.1.2.3 Antikörper-Kopplungen an EG31NH₂-terminierte Oberflächen

Die Funktionalisierungsschritte dieses Ansatzes sind in der Abbildung IV.II.3-33 schematisch dargestellt.

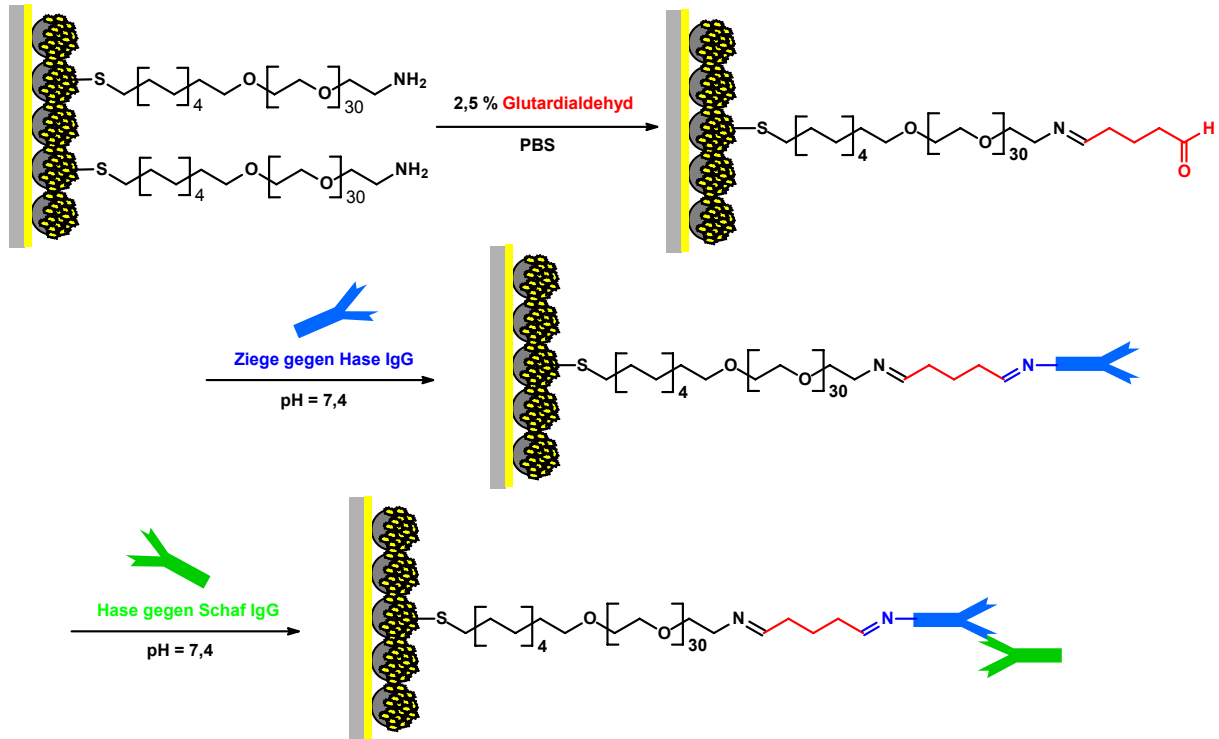


Abb. IV.II.3-33: Kovalente Bindung von Antikörpern an EG31NH₂-terminierte Nanopartikeloberflächen und Umsetzung mit dem spezifischen Antigen.

LSPR-Messungen

In der Abbildung IV.II.3-34 sind die von einer Probe nach den verschiedenen Funktionalisierungsstufen aufgenommenen LSPR-Spektren dargestellt; rechts ist der Detail-Ausschnitt der 400nm-Resonanz gezeigt.

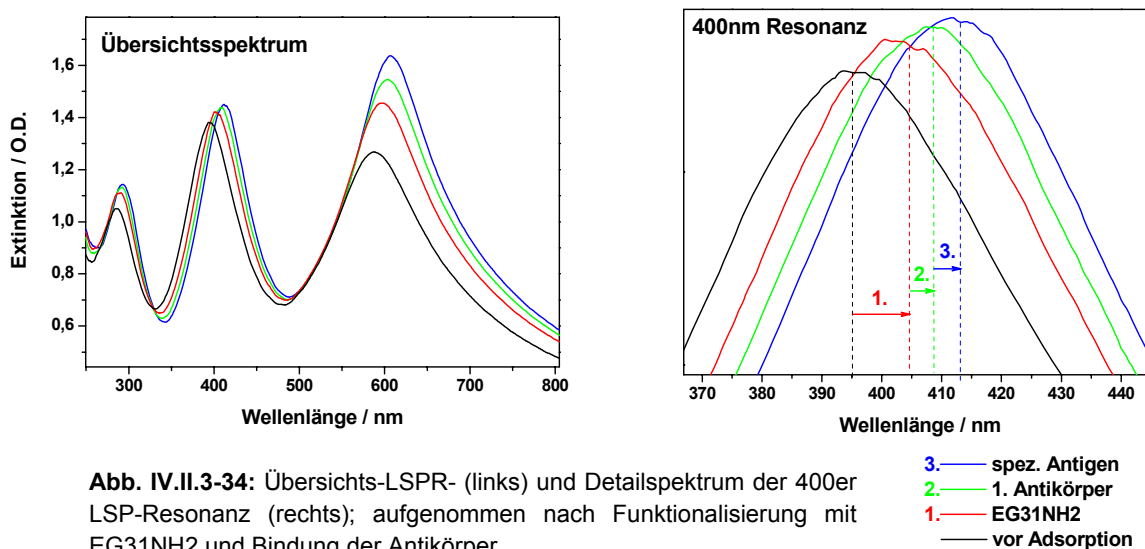


Abb. IV.II.3-34: Übersichts-LSPR- (links) und Detailspektrum der 400er LSP-Resonanz (rechts); aufgenommen nach Funktionalisierung mit EG31NH₂ und Bindung der Antikörper.

3. — spez. Antigen
 2. — 1. Antikörper
 1. — EG31NH₂
 — vor Adsorption

In der Tabelle sind die Verschiebungsbeträge angegeben; diese beziehen sich auf die jeweilige Vorstufe (1 - 3) und entsprechen einer Mittelwertbildung aus 6 bis maximal 12 ausgewerteten Spektren verschiedener Probenspots.

Stufe	LSPR bei 300 nm		LSPR bei 400 nm		LSPR bei 600 nm	
	$\Delta\lambda_{max}$	SD	$\Delta\lambda_{max}$	SD	$\Delta\lambda_{max}$	SD
EG31NH ₂	3,39	0,63	9,29	0,75	11,47	1,96
1AK	1,8	1,13	4,44	0,47	7,00	4,07
2AK	1,64	0,27	4,48	0,58	4,92	3,25

Tab. IV.II.3-27: Mittlere LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm und zugehörige Standardabweichung nach Funktionalisierung mit EG17NH₂ und Bindung der Antikörper.

Zur quantitativen Auswertung der LSPR-Daten wurde auch hier die 400nm Resonanz herangezogen. Die normierten Verschiebungsbeträge sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Stufe	LSPR bei 300 nm	LSPR bei 400nm	LSPR bei 600 nm
	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$
EG31NH ₂	1	2,74	3,38
1. Antikörper	1	2,47	3,89
2. Antikörper	1	2,73	3,00

Tab. IV.II.3-28: Auf die Verschiebung der 300er-Resonanz normierte LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm.

Auch in dieser Kopplungsreihe ergibt sich eine ähnliche Rangfolge zwischen den Sensitivitäten der 3 LSP-Resonanzen. Die Einheitlichkeit der normierten Werte deutet weiterhin auf einen proportionalen Zusammenhang zwischen ihrer Reaktion gegenüber Änderungen der Massenbelegung.

Mit Hilfe der in Abschnitt 2 ermittelten Eichwertfaktoren wurden Schichtdicke und Massenbelegung der jeweiligen Adsorbatlagen ermittelt. Die berechneten Werte sind in der Tabelle IV.II.3-29 aufgeführt; sie entsprechen dem Anstieg von Schichtdicke und Massenbelegung, die mit der angegebenen Funktionalisierung verbunden sind.

Stufe	Schichtdicke /Å	Massenbelegung / ng/cm ²
EG31NH2	37,85	283,97
1. Antikörper	18,10	155,79
2. Antikörper	18,25	157,14

Tab. IV.II.3-29: Anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechneter und mit den angegebenen Funktionalisierungen verbundener Zuwachs an Schichtdicke und Massenbelegung.

Die Schichtdicken der Adsorbatlagen wurden zusätzlich röntgenphotoelektronenspektroskopisch über die Abschwächung der Substratlage (Au) bestimmt.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

In der Abbildung IV.II.3-35 sind von jeder Funktionalisierungsstufe einige der angepassten C1s- und O1s-Detailspektren dargestellt. Die Ladungsaufspaltung beträgt in den gezeigten Spektren etwa 3,3 eV.

Für den EG31NH2-Basisfilm führt die Spektrenanpassung zu einem Ether-C/O-Verhältnis von 2,03, welches mit dem Sollwert übereinstimmt; Verunreinigungen der Oberflächen können somit ausgeschlossen werden können. Die Gesamtintensität der zusätzlichen, auf die immobilisierten Proteine zurückzuführenden Kohlenstofftypen steigt nach der Bindung des 1. Antikörpers von einer Gesamtintensität von 663 Einheiten um den Faktor 1,1 nach Bindung des 2. Antikörpers auf eine Intensität von 738 Einheiten an. Laut der LSPR-Daten verdoppelt sich die Proteinschichtdicke nach diesem Umsetzungsschritt jedoch, so dass die Kopplungsrate des 2. Antikörpers XP-spektroskopisch unterschätzt wird. Ursache ist, dass der Schichtdickenbeitrag der 2. Proteinlage (18,25 Å) (Schichtdickenbeitrag des Erstantikörpers 18,10 Å) einen zusätzlichen Abschwächungsbeitrag leistet, der die Signalintensitäten reduziert; daher nimmt auch die gesamte C1s-Etherintensität nach der spezifischen Bindung des Zweitantikörpers von 868 auf 623 Einheiten ab.

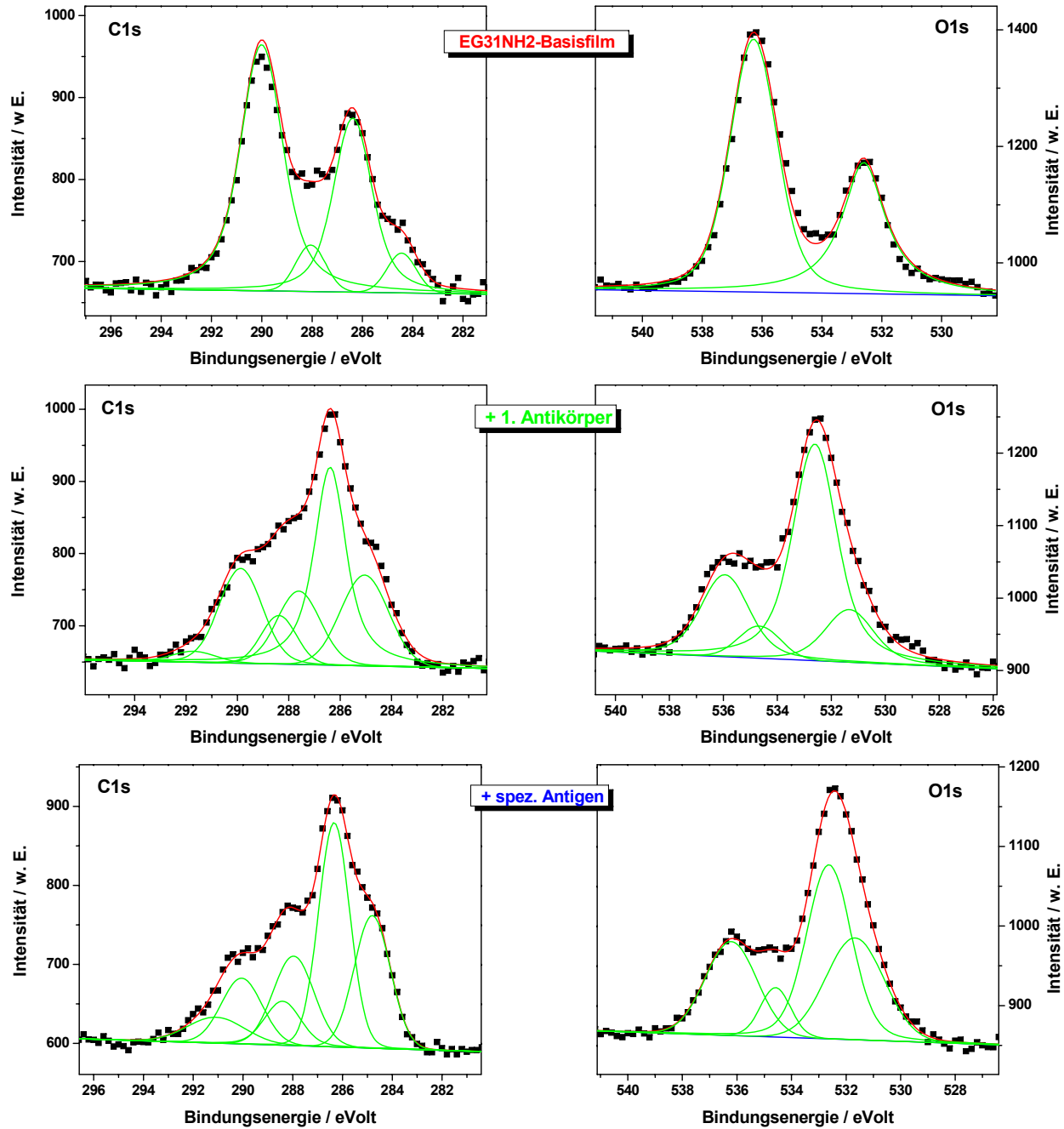
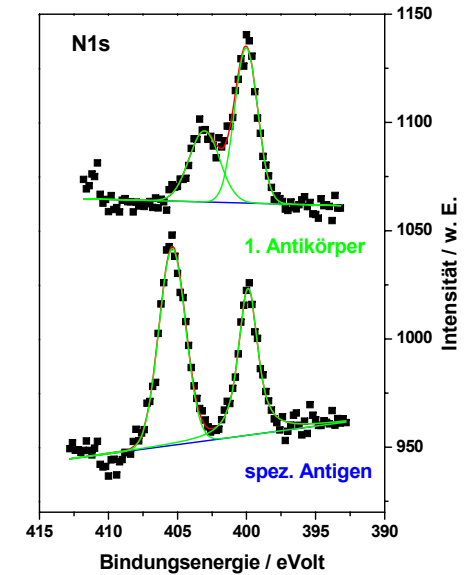


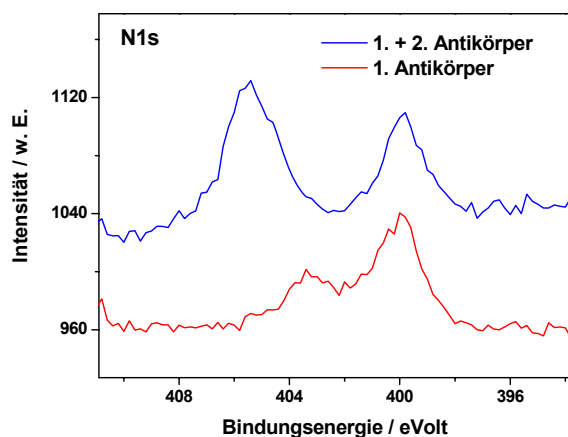
Abb. IV.II.3-35:

Integration von Antikörper-Antigen-Assays in EG31NH₂-terminierte Basisfilme.

Angepasste C1s-, O1s- und N1s-Detailspektren; aufgenommen nach Funktionalisierung mit dem Basisfilm EG31NH₂ (oben), nach kovalenter Bindung des Erstantikörpers (Mitte) und der Umsetzung mit dem spezifischen Antigen (unten).



Analog zum Verlauf der C1s-Intensität steigt die Intensität der Carbonyl-gebundenen Sauerstoffe der Proteine nach Bindung des 1. Antikörpers von 280 um den Faktor 1,5 auf 430 Einheiten bei Umsetzung mit dem spezifischen Antigen an, wohingegen die Intensität des Ether-O1s-Signals von 1067 Einheiten um etwa 301 reduziert wird. Das durch Anpassung der C1s- und O1s-Signale ermittelte Ether-C/O-Verhältnis beträgt sowohl nach Kopplung des Erst- als



Tab. IV.II.3-36: N1s-Detaillspektren; aufgenommen nach kovalenter Bindung des Erstantikörpers und Umsetzung mit dem spezifischen Antigen.

auch des zusätzlichen Zweitantikörpers in der gezeigten Anpassung 2,0 und stimmt mit dem Sollwert überein.

In der Abb. IV.II.-36 ist der auf die Immobilisierung der Proteine zurückzuführende Verlauf der N1s-Intensität dargestellt. Die Umsetzung mit dem spezifischen Antigen führt zu einem Anstieg der gesamten N1s-Intensität von 241 um den Faktor 1,6 auf 376 Einheiten.

Anhand der Abschwächung der Au4f-Intensität konnten die Schichtdicken der jeweiligen Adsorbatlagen nach Gleichung (104) ermittelt werden. Diese sind zusammen mit den LSPR-basierenden Werten in der Tabelle IV.II.3-30 aufgeführt.

<i>Stufe</i>	<i>XPS</i> <i>Schichtdicke /Å</i>	<i>LSPR</i> <i>Schichtdicke /Å</i>
EG31NH2	43,03	37,85
+ 1. Antikörper	59,83	55,95
+ 2. Antikörper	70,08	74,25

Tab. IV.II.3-30: Röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelte und anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechnete Schichtdicken der angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Die mittels der verschiedenen Methoden (XPS, LSPR) erhaltenen Schichtdicken stimmen gut überein, wodurch die Gültigkeit der in Abschnitt 2 bestimmten LSPR-Eichwertfaktoren bestätigt wird.

Enzymkinetische ELISA-Messungen

Eine enzymkinetische Auswertung nach Michaelis-Menten führt zu den in der Tabelle IV.II.3-31 aufgeführten Massenbelegungen; zum Vergleich sind ebenfalls die Werte angegeben, welche auf Grundlage der LSPR-Daten ermittelt wurden. In der rechten Spalte ist der LSPR-Eichwertfaktor bezüglich der Massenbelegung angegeben, welcher mittels der ELISA-Daten berechnet wurde.

Stufe	Massenbelegung		ELISA-Eichwert
	LSPR / ng/cm²	ELISA / ng/cm²	/ ng/(cm²*nm)
+ 1. Antikörper	155,79	140,61	31,67
+ 2. Antikörper	312,93	325,52	36,52

Tab. IV.II.3-31: Enzymkinetisch mittels des ELISAs und anhand der LSPR-Verschiebung bestimmte Massenbelegung der Antikörper; ELISA-basierender Eichwert bzgl. der Massenbelegung (rechte Spalte).

Die ermittelten Eichwertfaktoren liegen in einem sehr ähnlichen Größenbereich; zudem stimmt dieser ELISA-Eichwert auch gut mit dem XPS-basierendem Faktor aus Abschnitt 2 (35,1 ng/(cm²*nm)) überein.

3.1.2.4 Gesamtbetrachtung

Auch in den vorstehend beschriebenen Antikörper-Bindungsstudien an proteinresistenten Matrizen ergab sich eine gute Übereinstimmung bezüglich der Ergebnisse der unterschiedlichen Analysemethoden. Die röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelten Schichtdicken und die mittels eines ELISAs erhaltenen Massenbelegungen der Antikörper stimmen gut mit den LSPR-basierenden Werten überein, wodurch die in Abschnitt 2 bestimmten LSPR-Eichwertfaktoren bestätigt werden.

In dem betrachteten Bereich von Massenbelegungen und Schichtdicken kann daher auch hier zur quantitativen Analyse näherungsweise von einer linearen LSPR-Antwort ausgegangen werden. Die Basisfilmschichtdicke beträgt in den beschriebenen Experimenten etwa 40 Å; da auch hier ein aus 2 Antikörper-Lagen bestehender Sandwich-Immunoassay ausgebildet wird, ergeben sich lokale Maximal-Schichtdicken von etwa 24 nm. Innerhalb dieses Abstandsbereiches führt eine vereinfachende lineare Interpretation somit zu guten Übereinstimmungen mit den experimentellen Ergebnissen.

Die folgenden Diagramme fassen die Ergebnisse der Abschnitte 3.1.2.1 bis 3.1.2.3 zusammen. Diese stellen eine mittels der verschiedenen Methoden (XPS, ELISA, LSPR) vollzogene Analyse der Antikörper-Bindungen für die unterschiedlichen Basisfilme dar. Der durch

Anpassung der XP-Spektren erhaltene Verlauf der Protein-C1s und -N1s-Intensität ist in der Abbildung IV.II.3-37 gezeigt; die enzymkinetisch ermittelten Antikörper-Massenbelegungen sowie die LSPR-spektroskopisch ermittelten Schichtdicken sind in der Abb. IV.II.3-38 dargestellt.

Die unterschiedlichen Methoden führen auch hier zu einem qualitativ sehr ähnlichen Verlauf, wodurch die Auswertungen bestätigt werden.

Ein Vergleich mit den analogen Diagrammen der nicht-proteinresistenten Basisfilme aus Abschnitt 3.1.1.1 bis 3.1.1.3 zeigt, dass die Verwendung der proteinresistenten Beschichtungen – mit Ausnahme des EG30COOH – mit Erstantikörper-Bindungsrate verbunden ist, die im Durchschnitt etwa 1,7-fach niedriger liegen als diejenigen der nicht-proteinresistenten Matrizes. Dagegen weist die EG30COOH-Beschichtung eine Bindungsrate auf, die derjenigen der nicht-proteinresistenten Basisfilme sehr ähnlich ist; die Ursache der hohen Antikörper-Bindung an diesem Basisfilm ist unbekannt.

Eine wie in Kapitel IV.I diskutierte Abhängigkeit der Antikörper-Kopplungsrate von der Endgruppenfunktionalität und mittleren Kettenlänge der PEG-Thiole ist hier allerdings nicht erkennbar. Es wird vermutet, dass die Ursache auf den unterschiedlichen Bedeckungsgrad der präparierten Monolagen zurückgeführt werden kann, der neben der Endgruppenfunktionalität und der mittleren Kettenlänge einen weiteren Parameter darstellt, der die Proteinresistenz einer PEG-Beschichtung bestimmt. Die präparierten Nanopartikeloberflächen weisen eine sehr inhomogene Oberflächenstruktur auf, wodurch die Ordnung der PEG-Ketten in einen helikalen Zustand erschwert wird und amorphe PEG-Strukturen ausgebildet werden; daher resultieren hier Bindungsrate, die von den in Kapitel IV.I erzielten abweichen.

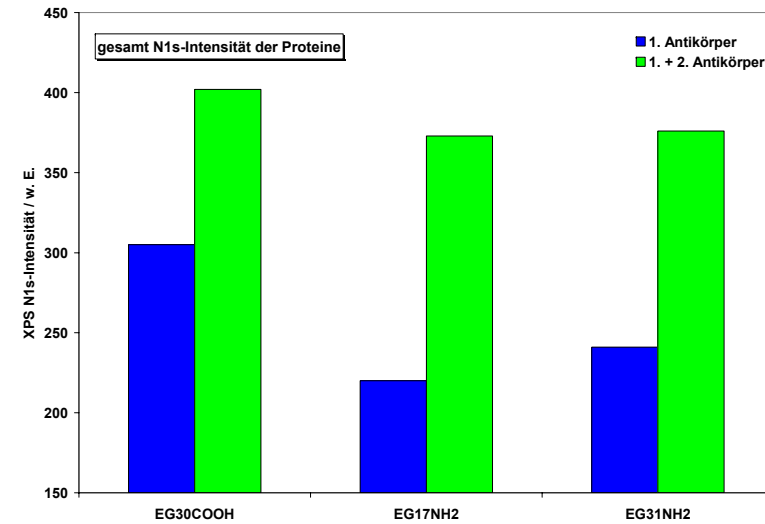
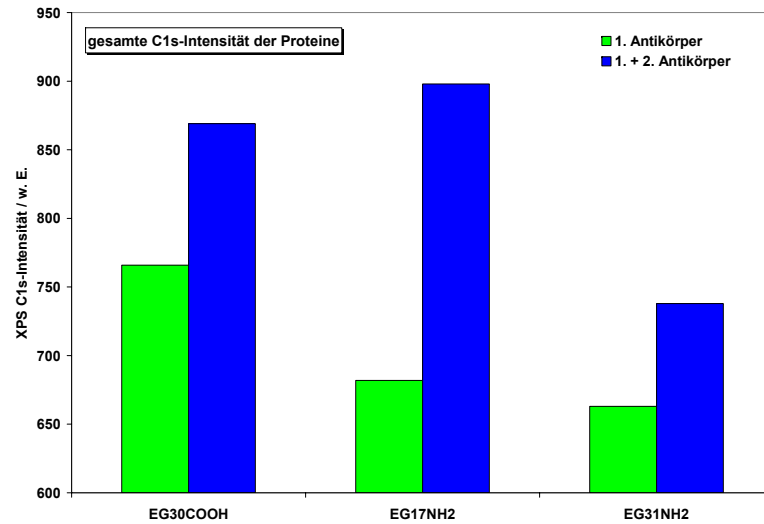


Abb. IV.II.3-37: Gesamte C1s-Intensität (links) und N1s-Intensität (rechts) der Proteine; ermittelt durch Anpassung der nach Bindung des 1. und des spezifischen Antigens an die verschiedenen Basisfilme EG30COOH, EG17NH₂ und EG31NH₂) aufgenommenen XP-Spektren.

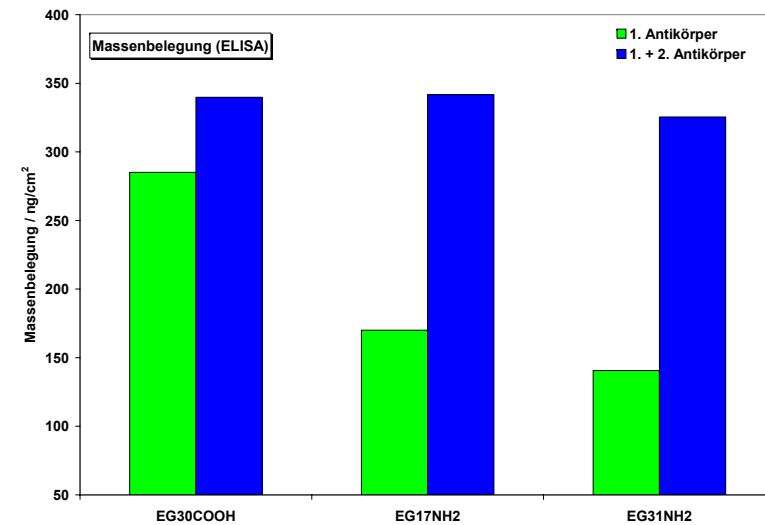
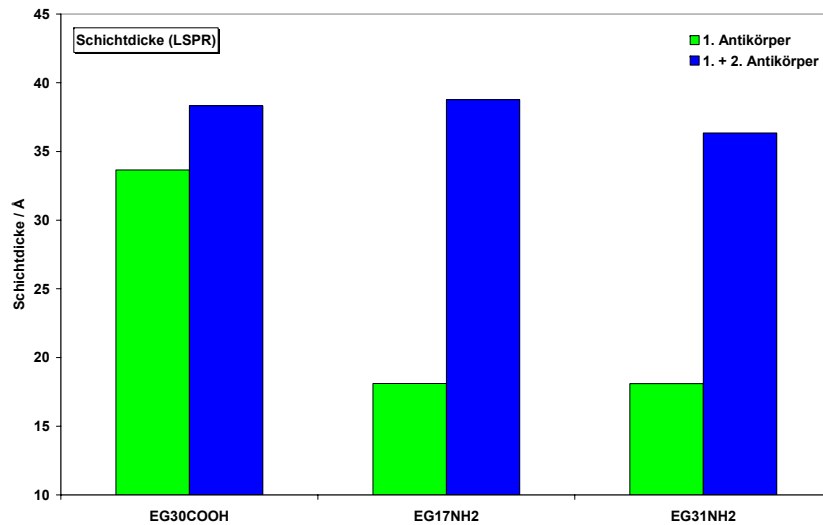


Abb. IV.II.3-38: LSPR-spektroskopisch ermittelter Schichtdickenanstieg (links) und enzymkinetisch ermittelte Antikörper-Massenbelegung (rechts); ermittelt nach Bindung des Erst- und des spezifischen Zweitantikörpers an die verschiedenen Basisfilme (EG30COOH, EG17NH₂ und EG31NH₂).

3.2 Integration von Peptid-Assays in die optisch aktiven Oberflächen

Zur Integration von Peptid-Assays wurden die optisch aktiven Sensoroberflächen zunächst mit proteinresistenten PEG-Matrizen funktionalisiert, in welche verschiedene Peptidepitope integriert wurden, deren Sequenzen von epitopspezifischen Antikörpern erkannt werden können. Anschließend wurde zum Nachweis dieser Bindung mit einem Peroxidase-markierten Zweitantikörper versetzt und die gebundene Antikörper-Menge mittels eines Festphasen-ELISAs quantifiziert.

Nach jedem Funktionalisierungsschritt wurden zur Detektion dieser biospezifischen Wechselwirkungen LSPR-Spektren aufgenommen und Schichtdicke und Massenbelegung der Adsorbatlagen anhand der beobachteten Resonanz-Verschiebung ermittelt.

Jede Reaktionsstufe wurde zudem röntgenphotoelektronenspektroskopisch charakterisiert und die Schichtdicken anhand der Abschwächung der Au4f-Substratintensität bestimmt.

Die Massenbelegung des Peroxidase-markierten Zweitantiköpers konnte zudem mittels eines Oberflächen-modifizierten ELISAs ermittelt werden.

3.2.1 Integration von Peptidepitopen in EG31NH₂-terminierter Basisfilme

In der Abbildung IV.II.3-39 sind die einzelnen Funktionalisierungsschritte dargestellt.

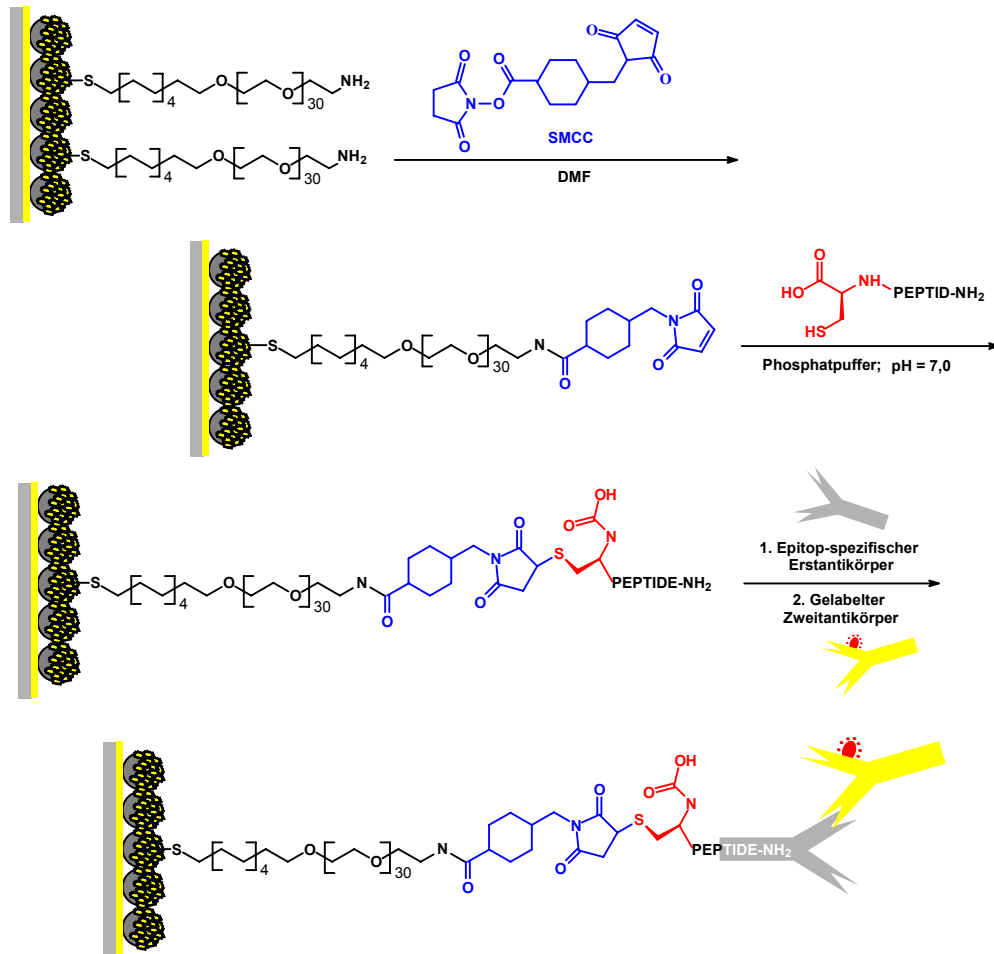


Abb. IV.II.3-39: Kovalente Fixierung von Peptidepitopen an EG31NH₂-terminierte Nanopartikeloberflächen sowie die Umsetzung mit dem epitopspezifischen und markierten Zweitantikörper.

Die Oberflächen wurden zunächst unter Ausbildung selbstaggregierender Monolagen mit dem aminoterminierten PEG-Thiol EG31NH₂ beschichtet (2). Nach Einführung des Linkermoleküls SMCC¹¹ (3) konnten die thiolierten Peptidepitope durch eine Addition an den Maleimido-Rest des Linkers kovalent gebunden werden (4).

Es wurden zwei unterschiedliche Peptidsequenzen verwendet. Bei der hier als Epitop 2 bezeichneten Peptidsequenz handelt es sich um ein Dekapeptid mit folgender Aminosäuresequenz



diese Peptidsequenz wird auch als HA-Epitop bezeichnet.

¹¹ 4-(N-Maleimidomethyl)cyclohexancarboxylic acid N-hydroxysuccinimide ester

Die unter der Bezeichnung Epitop 5 verwendete Peptidsequenz stellt ein Nonapeptid folgender Aminosäuresequenz dar



sie wird auch als Flag-Epitop bezeichnet.

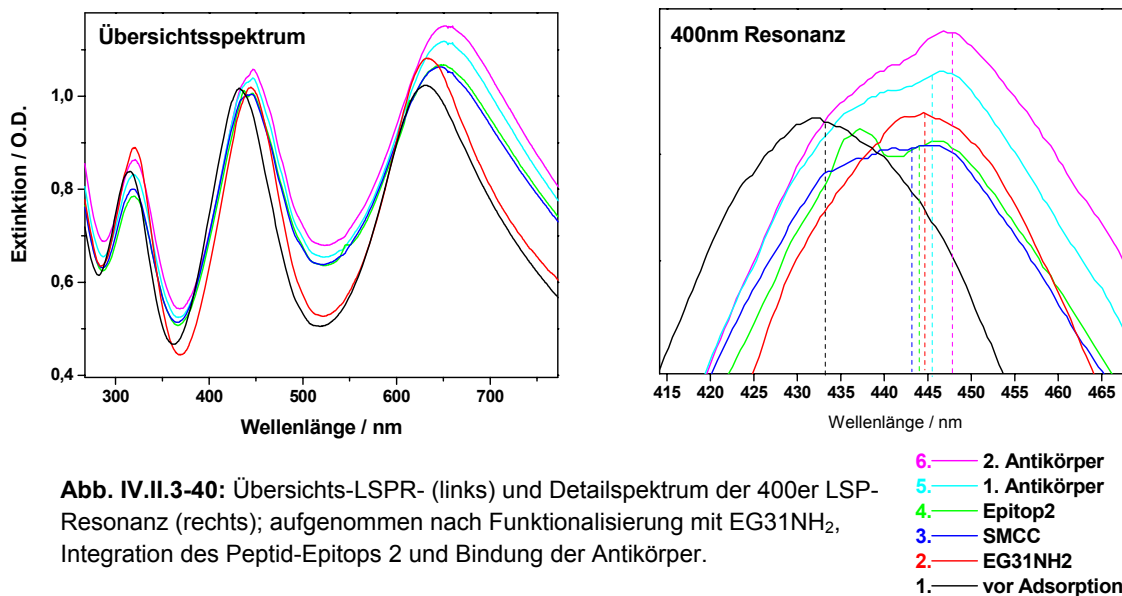
Beide Peptidepitope besitzen einen carboxyterminalen Cysteinrest (**C**); dieser wurde eingeführt, um über dessen freie Thiolgruppe eine kovalente Bindung an den Maleimido-Rest des Linkers SMCC zu ermöglichen.

Anschließend wurde mit dem jeweiligen Epitop-spezifischen Antigen versetzt (5). Im Fall des Epitops 2 ist dies der anti-HA-Antikörper; für das Epitop 5 der anti-Flag-Antikörper; beide Antikörper entstammen der Maus. Als Peroxidase markierter Zweitantikörper wurde daher ein Ziege-gegen-Maus-Antikörper verwendet (6).

LSPR-Messungen

Nach jeder Kopplungsstufe wurden Extinktionsspektren aufgenommen und die Position des Extinktionsmaximums der 400er Resonanzlinie bestimmt.

In der Abbildung IV.II.3-40 ist für Epitop 2 ein typisches Übersichtsspektrum und der Detailausschnitt der 400er Resonanz gezeigt.



Da die Verschiebungen insgesamt nur gering ausfallen, ist die Bestimmung des Absorptionsmaximums mit einem größeren Fehler verbunden; negativ wirken sich hierbei zusätzlich die größere Halbwertsbreite der Resonanzen sowie ein schlechtes Signal/Rausch-Verhältnis aus.

Die Abbildung IV.II.3-41 stellt zur Verdeutlichung der Verschiebungstendenzen einen an einer geeigneten Stelle gezogenen horizontalen Querschnitt durch die gemessenen

Extinktionsspektren dar. Da die Halbwertsbreiten der Resonanzen ähnlich sind, gibt dieser ebenfalls einen repräsentativen Eindruck der Verschiebungstendenzen.

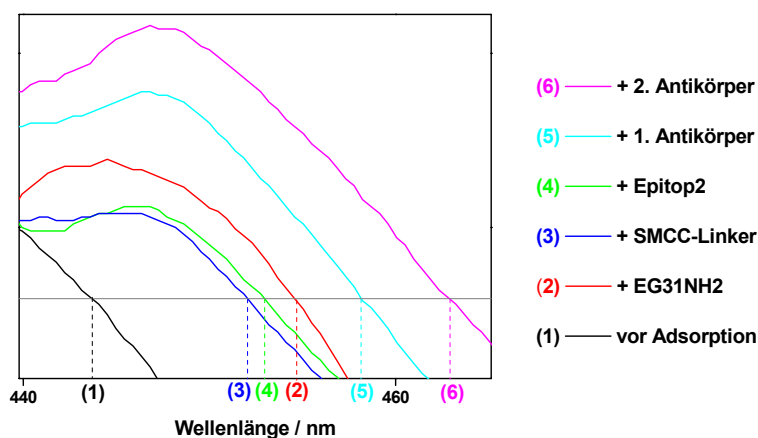


Abb. IV.II.3-41: Horizontaler Querschnitt (grau) durch die Oberflächenplasmonenresonanz bei 400 nm nach den verschiedenen Kopplungsstufen (1 – 6).

Nach Adsorption des EG31NH2 wird eine deutliche Verschiebung in den längerwelligen Bereich beobachtet; die restlichen Kopplungsreaktionen, insbesondere die Bindung der Antikörper, führen jedoch zu nur geringen Verschiebungsbeträgen.

In der Tabelle IV.II.3-32 sind für Epitop 2 die Verschiebungen der 400er-Resonanz aufgeführt. Diese wurden benutzt, um mit Hilfe der Eichwertfaktoren aus Abschnitt 2 Schichtdicke und Massenbelegung der Adsorbatlagen zu bestimmen; diese Werte sind ebenfalls in der Tabelle angegeben.

Stufe	LSPR (400nm)	Schichtdicke	Massenbelegung
	$\Delta\lambda_{max} / nm$	/Å	/ ng/cm ²
EG31NH2	10,22	41,63	358,32
SMCC	-1,16	-4,73	-40,73
Epitop 2	0,57	2,33	20,08
1. Antikörper	1,83	7,46	64,19
2. Antikörper	2,51	10,23	88,04

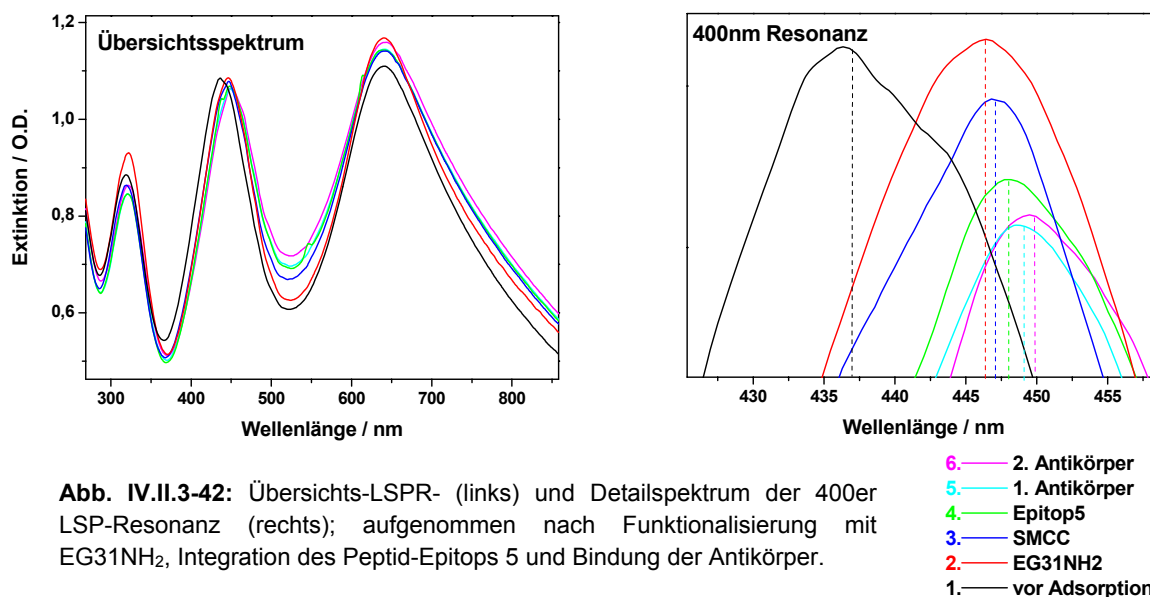
Tab. IV.II.3-32: Mittlere LSPR-Verschiebungen und mit den angegebenen Funktionalisierungen verbundener Zuwachs an Schichtdicke und Massenbelegung für eine Kopplungsreihe an Epitop 2.

Die Einführung des Linkermoleküls SMCC führt zu einem geringfügigen back-shift. Dieser ist wahrscheinlich auf eine mit den Waschschrinen verbundene partielle Ablösung der PEG-Matrix zurückzuführen. Nach Bindung des Peptidepitops 2 wird jedoch wieder eine Verschiebung in den längerwelligen Bereich beobachtet; ebenso führen auch die Bindung des 1. epitopspezifischen und des Peroxidase-markierten Zweitantikörpers zu positiven Verschiebungsbeträgen, wie sie für eine Erhöhung der Massenbelegung zu erwarten sind.

Laut Abschnitt 2 dieses Kapitels entspricht im Fall des EG31NH₂ ein Verschiebungsbetrag von 10,82 nm einem Bedeckungsgrad von 30,0%, der sich auf vollständig geordnete Alkanthiolmonolagen bezieht. Hier wird für die Adsorption des EG31NH₂ eine Resonanzverschiebung von 10,22 nm detektiert, woraus sich ein Bedeckungsgrad von 28,34% berechnet. Mit Hilfe dieses Wertes und des Platzbedarfs pro Alkanthiolkette (21,4 Å²) ergibt sich hieraus für das Epitop 2 (Molgewicht = 1221 g/mol) eine Massenbelegung von 281,67 ng/cm² für den Fall einer 1:1-Umsetzung mit den vorhandenen Aminogruppen. Auf Basis der Eichwertfaktoren wurde für die Bindung des Epitops 2 jedoch eine Massenbelegung von nur 20,08 ng/cm² berechnet; die Umsatzrate der Aminogruppen beträgt somit nur 7,13%. Beachtet man, dass es sich hier um eine Umsetzung an einer polymeren Matrix amorpher Ordnung handelt, so ist diese auf den ersten Blick niedrig erscheinende Umsatzrate jedoch verständlich, da ein Großteil der Amino-Endgruppen in dem polymeren Knäuel vergraben ist und für eine Reaktion somit nicht zur Verfügung steht.

Infolge der geringen Verschiebungsbeträge führte die Auswertung der 300er und 600er Resonanzlinie zu keinen brauchbaren Ergebnissen, da große Halbwertsbreiten (600er-Linie) und geringe Verschiebungsbeträge (300er Linie) eine verlässliche Bestimmung des Absorptionsmaximums verhinderten. Auf eine Analyse dieser LSP-Resonanzen wurde daher verzichtet.

In Abbildung IV.II.3-42 sind für die Kopplungsreihe an Epitop 5 ein typisches Übersichtsspektrum sowie der Detailausschnitt der 400er Resonanz gezeigt.



Auch hier fallen die Verschiebungsbeträge insgesamt nur gering aus. In der Abbildung IV.II.3-43 ist zur Verdeutlichung der Verschiebungstendenzen ein horizontaler Querschnitt durch die Extinktionsspektren gezeigt.

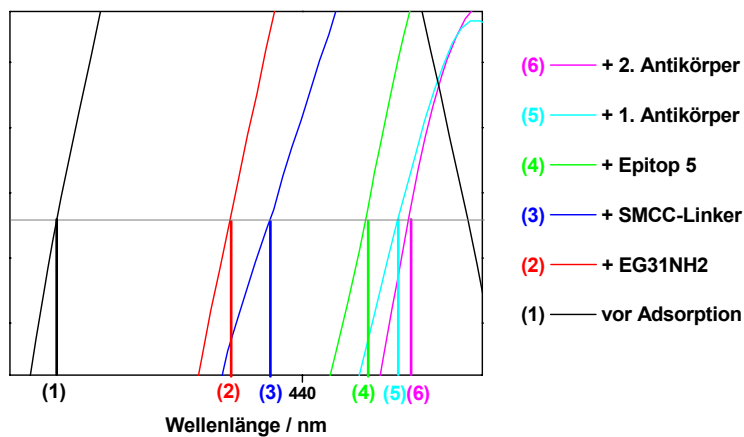


Abb. IV.II.3-43: Horizontaler Querschnitt (grau) durch die Oberflächenplasmonenresonanz bei 400 nm nach den verschiedenen Kopplungsstufe (1 – 6).

Die Tabelle IV.II.3-33 enthält die für Epitop 5 erhaltenen Verschiebungsbeträge der 400er-Resonanz. Diese wurden benutzt, um mit Hilfe der Eichwertfaktoren aus Abschnitt 2 Schichtdicke und Massenbelegung der Adsorbatlagen zu bestimmen; diese Werte sind ebenfalls in der Tabelle angegeben.

<i>Stufe</i>	<i>LSPR (400nm)</i> $\Delta\lambda_{max} / \text{nm}$	<i>Schichtdicke</i> $/\text{\AA}$	<i>Massenbelegung</i> $/ \text{ng/cm}^2$
EG31NH2	9,43	38,42	330,76
SMCC	0,61	2,48	21,35
Epitop 5	1,37	5,58	48,05
1. Antikörper	0,91	3,71	31,92
2. Antikörper	0,69	2,81	24,20

Tab. IV.II.3-33: Mittlere LSPR-Verschiebungen und mit den angegebenen Funktionalisierungen verbundener Zuwachs an Schichtdicke und Massenbelegung für eine Kopplungsreihe an Epitop 5.

Für die Einführung des Linkermoleküls SMCC wird hier kein back-shift, sondern ein kleiner Verschiebungsbetrag in den längerwelligen Bereich festgestellt. Die Bindung des Peptidepitops 5 führt ebenfalls zu einem kleinen Verschiebungsbetrag in den längerwelligen Bereich. Der für die Adsorption des EG31NH2 erhaltene Verschiebungsbetrag von 9,43 nm entspricht laut den Ergebnissen aus Abschnitts 2 einem Bedeckungsgrad von etwa 26,15%. Unter Berücksichtigung dieses Wertes und des bekannten Platzbedarfs pro Alkanthiolkette ($21,4 \text{ \AA}^2$) ergibt sich für die Kopplung des Linkermoleküls SMCC (Molgewicht = 331 g/mol) eine Massenbelegung von $70,46 \text{ ng/cm}^2$ für den Fall einer 1:1-Umsetzung der vorhandenen Aminogruppen. Die mittels der Eichwertfaktoren berechnete Massenbelegung des Linkers beträgt jedoch nur $21,35 \text{ ng/cm}^2$. Demnach konnte in diesem Schritt eine Umsatzrate von 30,3% erzielt werden. Für das Epitop 5 (Molgewicht 1132 g/mol) sollte somit eine Massenbelegung von $73,01 \text{ ng/cm}^2$ resultieren, falls alle SMCC-Einheiten mit dieser thiolierten Peptidsequenz abreagieren. Die mit Hilfe der Eichwertfaktoren ermittelte Peptid-Massenbelegung beträgt jedoch nur $48,05 \text{ ng/cm}^2$; die SMCC-Umsatzrate liegt daher bei 65,7 %.

Bezogen auf die zur Verfügung stehenden Aminogruppen ergibt sich in dieser Versuchsreihe somit eine Peptid-Kopplungsrate von 19,9 %. Wenn man beachtet, dass es sich um eine relativ lange Peptidsequenz mit 9 Aminosäurebausteinen handelt, die Kopplung an der Polymermatrix sterisch gehindert und ein Großteil der Aminogruppen in dem polymeren Knäuel vergraben ist, so scheint diese Umsatzrate recht hoch. Für das kleine Linkermolekül SMCC erhält man jedoch eine etwas höhere Bindungsrate (30,3%), da dieses leichter in die Polymermatrix diffundieren und dort reagieren kann.

Für die Bindung des 1. epitopspezifischen und des 2. Antikörpers ergeben sich allerdings analog zu Epitop 2 auch für das Epitop 5 nur sehr geringe Änderungen der Resonanzlage. Berücksichtigt man den Bedeckungsgrad des Basisfilms (EG31NH2) und den Anteil der mit den Peptiden umgesetzten Aminogruppen, so wurde für Epitop 5 eine etwa 2,6-fach höhere Oberflächenbedeckung als für Epitop 2 erzielt. Trotzdem werden hier deutlich niedrigere Bin-

dungsraten für den epitopspezifischen Antikörper (und folglich auch für den Zweitantikörper) als im Fall des HA-Epitops erhalten.

Ein ähnliches Ergebnis ergab sich auch bei den Vorversuchen auf Au-bedampften Si-wafern; hier wurden ebenfalls für Epitop 5 geringere Bindungsraten der Antikörper als im Fall des Peptidepitops 2 festgestellt. Es wird daher vermutet, dass diese Peptidsequenz (Flag-Epitop) für sterisch anspruchsvolle Kopplungsreaktionen an der Oberfläche weniger gut geeignet ist.

Eine erfolgreiche Erkennung erfordert eine bestimmte Konformation und Orientierung der Bindungspartner; durch die Oberflächen-Fixierung ist die Mobilität der Epitope gegenüber einer Reaktion in Lösung jedoch wesentlich eingeschränkt, wodurch die Zugänglichkeit zur bindenden Region des makromolekularen Antikörpers erschwert wird. Die Bindungstasche des Flag-spezifischen Antikörpers scheint daher schlechter zugänglich und für sterisch anspruchsvolle Bindungsstudien an Oberflächen somit weniger gut geeignet zu sein als die erkennende Region des HA-spezifischen Antikörpers.

Insgesamt ergeben beide Versuchsreihen, sowohl die Antikörper-Kopplungen an Epitop 2 als auch an Epitop 5, im Vergleich zu den in Abschnitt 3.1 beschriebenen kovalenten Antikörper-Immobilisierungen jedoch nur geringe Bindungsraten. Ursache ist, dass die Ausbildung der 1. Proteinlage bei den Epitop-Ansätzen auf eine spezifische Erkennung zueinander passender Komplementär-Regionen der Biomoleküle angewiesen ist; deren Effektivität ist aus oben genannten Gründen bei einer Reaktion an fester Phase jedoch wesentlich erschwert, so dass hier niedrigere Bindungsraten zu erwarten sind. Dagegen ist die direkte kovalente Immobilisierung der IgG-Moleküle auf keinerlei Spezifität angewiesen; da die Antikörper eine Vielzahl zur kovalenten Bindung einsetzbarer Carboxy- und Aminogruppen aufweisen, besteht hier eine Vielzahl möglicher Bindungsstellen; Restriktionen bezüglich Orientierung und Zugänglichkeit zweier Bindungspartner liegen bei diesem Ansatz nicht vor. Zudem handelt es sich bei den epitop-spezifischen Antikörpern um monoklonale Antikörper, die im Gegensatz zu den bei den Antikörper-Bindungsstudien verwendeten polyklonalen Antikörpern nur eine Bindungsstelle für das spezifische Antigen aufweisen.

Da die Versuche vor einer Eichung der Sensoroberflächen durchgeführt wurden, vermutete man die Ursache der geringen Verschiebungsbeträge jedoch zunächst in einer mit den extensiven Waschschritten verbundenen teilweisen Ablösung der PEG-Matrix. Die beschriebenen Bindungsstudien wurden daher in ein Array-Format übertragen, indem die Peptidepitope mit einem Spotroboter in definierten Abständen auf den Oberflächen immobilisiert wurden; anschließend wurde die Sensoroberfläche in Abständen von 50 μm abgerastert, wobei an jedem Punkt LSPR-Spektren aufgenommen (LSPR-Imaging; s. Abschnitt 4). Die unfunktionalisierten Zwischenräume dienen in diesem Fall als Referenzwert zur Ermittlung der Verschiebungsbeträge; in einem solchen Ansatz sollte sich daher der Effekt einer Ablösung der PEG-Matrix nicht bemerkbar machen.

Zur Kontrolle der einzelnen Funktionalisierungsschritte und zur Bestimmung der Schichtdicken über die Abschwächung der Au-Substratlage wurden XP-Spektren von den Oberflächen aufgenommen.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

In der Abbildung IV.II.3-44 sind die angepassten C1s- und O1s-Detailspektren dargestellt, welche nach der Adsorption von EG31NH₂ von den Nanopartikeloberflächen aufgenommen wurden.

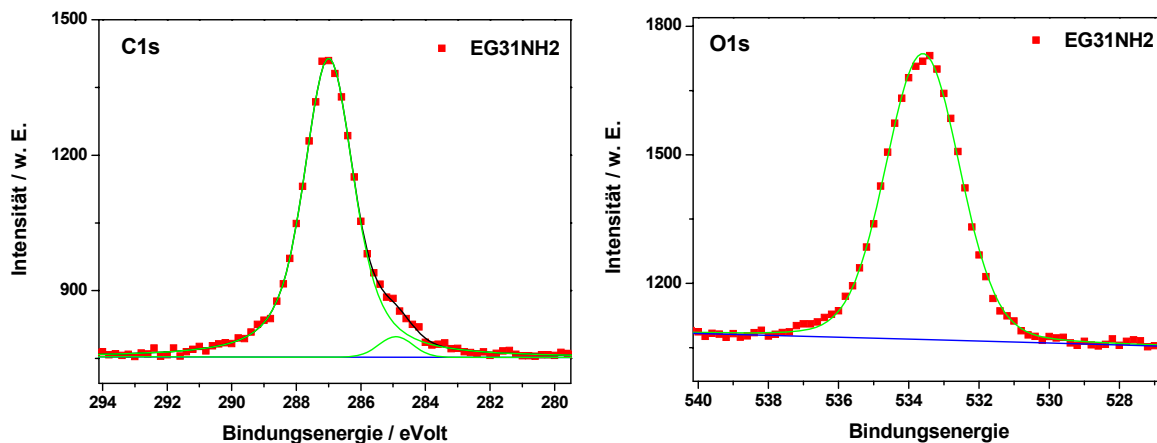
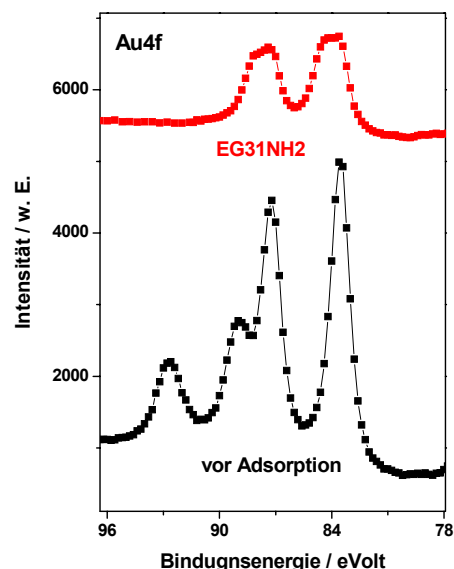


Abb. IV.II.3-44: C1s- (links) und O1s-Detailspektrum (rechts); aufgenommen nach Funktionalisierung der Nanopartikeloberflächen mit EG31NH₂.

Bei den gezeigten Spektren trat während der Messung keine Probenaufladung auf. Das durch Anpassung der Signale erhaltene Ether-C1s/O1s-Verhältnis beträgt 2,17 und stimmt mit dem Sollwert von 2,03 gut überein.

Eine effektive Ausbildung der Thiol-Monolage ist ebenfalls anhand der Au4f-Spektren erkennbar; so nimmt die Au4f-Substratintensität nach Funktionalisierung der Sensoroberflächen mit dem Thiol EG31NH₂ deutlich ab (Abb. IV.II.3-45). Die nach Einführung des Linkermoleküls SMCC aufgenommenen C1s- und O1s-Detailspektren sind in der Abbildung IV.II.3-46 dargestellt.

Abb. IV.II.3-45: Au4f-Detailspektren; aufgenommen vor (schwarz) und nach der Adsorption von EG31NH₂.



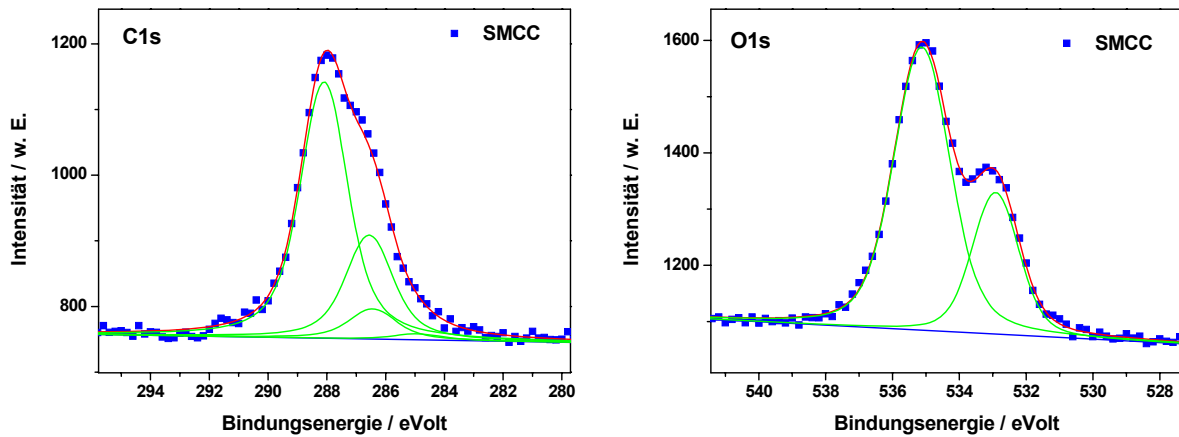


Abb. IV.II.3-46: C1s- (links) und O1s-Detailspektrum nach Anbindung des Linkers SMCC an die EG31NH₂-terminierten Nanopartikeloberflächen.

Bei der Aufnahme dieser Spektren trat eine Ladungsaufspaltung von etwa 1,8 eV auf; das Ether-C1s/O1s-Verhältnis der jeweiligen zueinander gehörigen Einzelsignale stimmt bei der gezeigten Anpassung mit dem Sollwert von 2,03 überein.

Die Einführung des Linkermoleküls führt zu einem Anstieg der C1s-Alkyl-Intensität von 60 auf 140 Einheiten; dagegen nimmt die gesamte Etherintensität von 1625 um 225 auf 1400 Einheiten ab. Eine Abnahme der Ether-Intensität in dieser Größenordnung ist für die Einführung des kleinen Linkermoleküls SMCC nicht zu erwarten; insgesamt ergibt sich anstatt einer Zu- eine Abnahme der gesamten C1s-Intensität um 145 Einheiten, welche auf eine teilweise Ablösung des PEG-Matrix zurückgeführt werden muß.

In der Abbildung IV.II.3-47 sind für Epitop 2 die C1s-Detailspektren dargestellt, welche nach Bindung dieser Peptidsequenz und der Umsetzung mit dem epitopspezifischen Erst- und Zweitantikörper aufgenommen wurden.

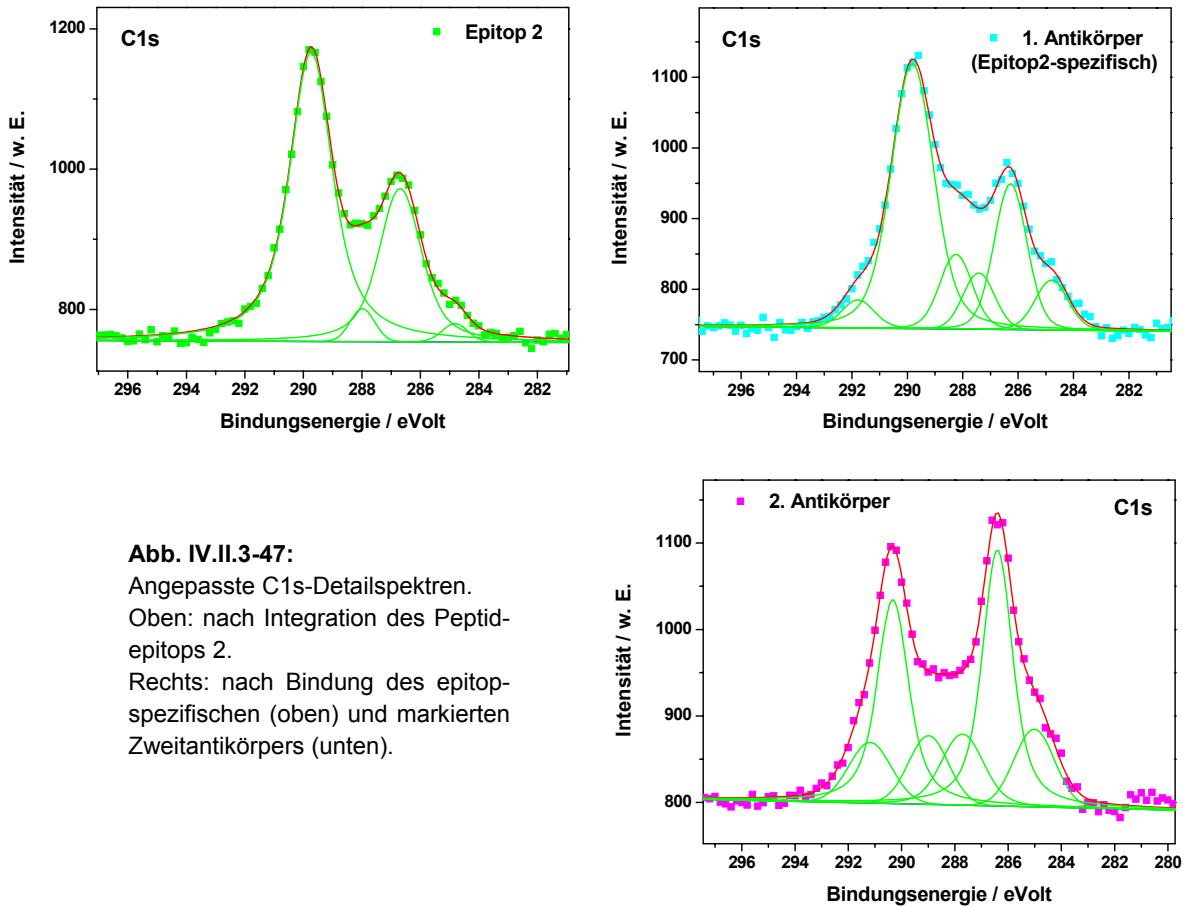


Abb. IV.II.3-47:

Angepasste C1s-Detailspektren.
 Oben: nach Integration des Peptid-epitops 2.
 Rechts: nach Bindung des epitop-spezifischen (oben) und markierten Zweitantikörpers (unten).

Die Immobilisierung der Proteine führt zum Auftreten zusätzlicher Signallagen bei 285,1 (C-N) und 288,3 (C=O) eV. Nach Einführung des Peptidepitops 2 ist bereits eine kleine Schulter bei 285,1 eV zu erkennen, so dass von einer effektiven Peptid-Bindung ausgegangen werden kann; ihre gesamte C1s-Intensität (inklusive des Aufspaltungsbetrags) beträgt 253 Einheiten. Nach Umsatz mit dem epitopspezifischen Erstantikörper ist ebenfalls das proteinspezifische Signal bei 288,3 eV deutlich zu erkennen. Die gesamte C1s-Intensität der Proteine beträgt in der gezeigten Anpassung 450 Einheiten; dagegen nimmt die gesamte Ether-C1s-Intensität von 1253 (Epitop 2) auf 1142 Einheiten nach Bindung des Erstantikörpers ab. Die Umsetzung mit dem Zweitantikörper bewirkt eine weitere Abnahme auf 993 Einheiten, wobei die gesamte C1s-Intensität der Proteine auf 638 Einheiten zunimmt. Die Ladungsaufspaltung beträgt in der gezeigten Anpassung etwa 3,5 eV.

In der Abbildung IV.II.3-48 sind die angepassten C1s-Detailspektren gezeigt, welche nach Immobilisierung des Epitops 5 und der anschließenden Umsetzung mit den Antikörpern aufgenommen wurden.

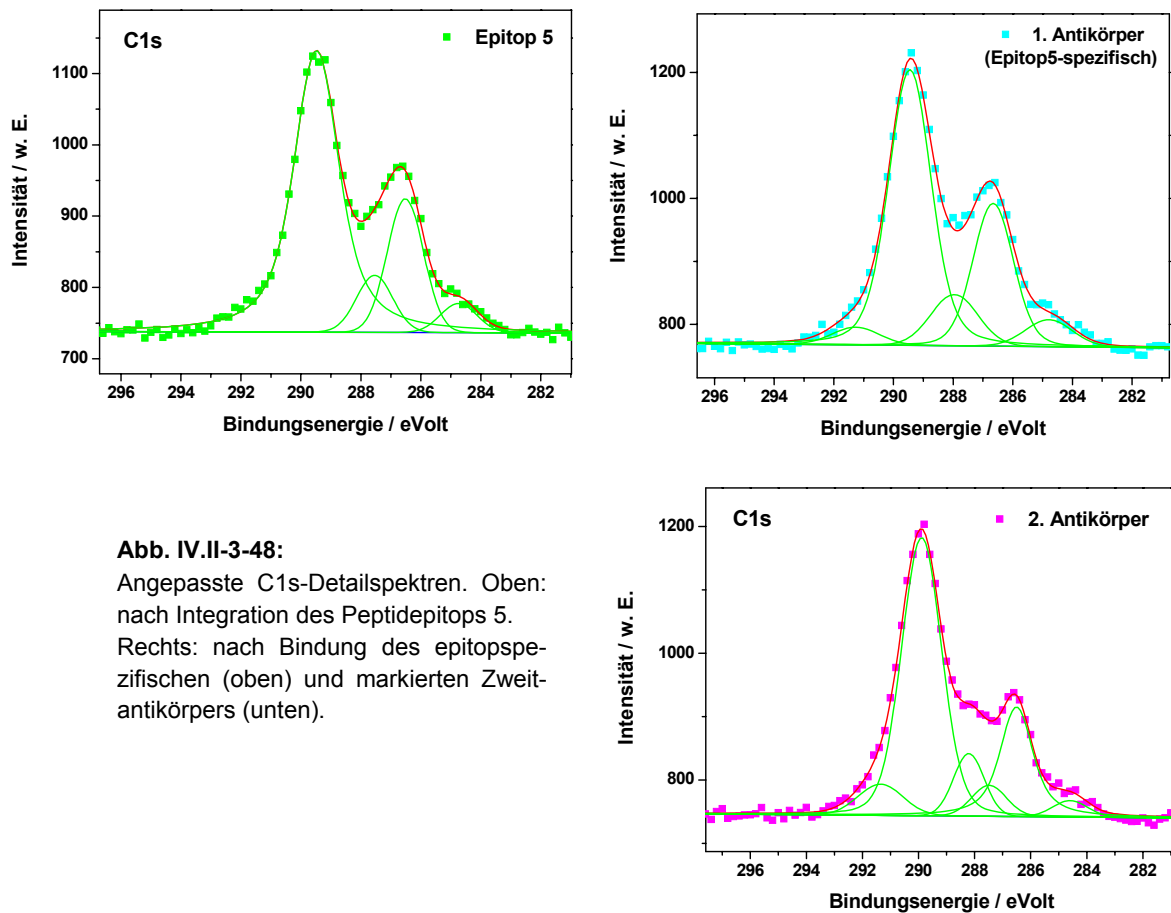


Abb. IV.II-3-48:

Angepasste C1s-Detailspektren. Oben: nach Integration des Peptidepitops 5. Rechts: nach Bindung des epitopspezifischen (oben) und markierten Zweitantikörpers (unten).

Auch hier treten nach Immobilisierung der Biomoleküle zusätzliche Signallagen bei 285,1 und 288,3 eVolt auf. Bereits nach Kopplung des Peptidepitops 5 ist eine Schulter bei 285,1 eVolt deutlich erkennbar. Die Intensität (inklusive des Aufspaltungsbetrags) dieser Signallage beläuft sich auf 182 Einheiten; die Anpassung der Spektren führte zu einer Ladungsaufspaltung von 2,8 eVolt. Nach Bindung des epitopspezifischen Antikörpers ist ebenfalls das Protein-Signal bei 288,3 eVolt erkennbar; die gesamte C1s-Intensität der Proteine beträgt nach dieser Stufe 299 Einheiten. Durch Anpassung der Spektren wurde eine Ladungsaufspaltung von 3,2 eVolt ermittelt, so dass für die Proteine hier insgesamt nur 3 Signallagen anzupassen sind (2 Signale fallen zusammen). Nach Bindung des Zweitantikörpers steigt die gesamte C1s-Intensität der Proteine nur geringfügig auf etwa 348 Einheiten an.

Die Funktionalisierung der SMCC-terminierten Oberflächen mit den Peptiden und Antikörpern kann ebenfalls anhand der N1s-Spektren analysiert werden. Die Abbildung IV.II.3-49 zeigt den mit der Bindung dieser Biomoleküle verbundenen Anstieg der N1s-Intensität sowohl für Epitop 2 (links) als auch Epitop 5 (rechts).

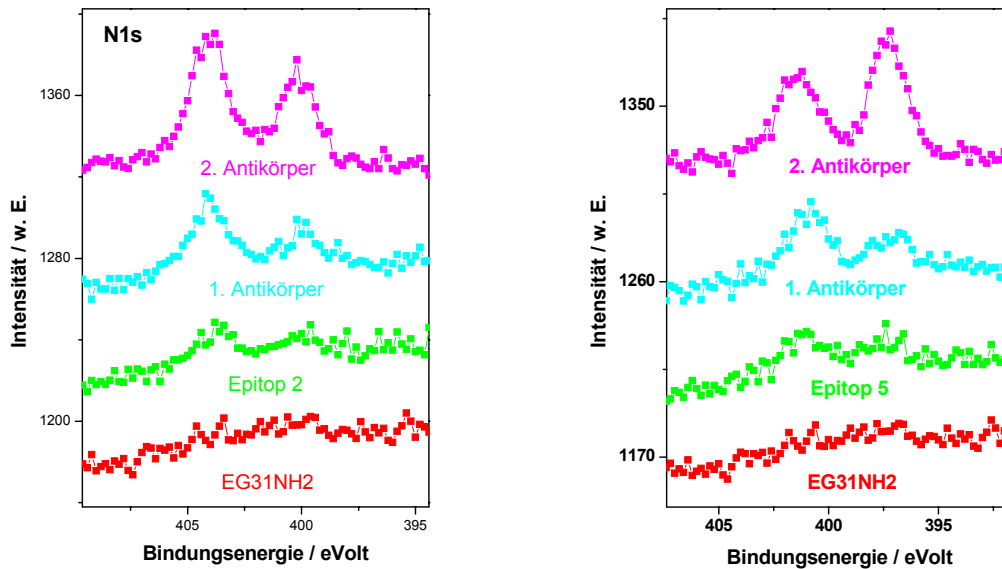


Abb. IV.II.3-49: N1s-Detailspektren. Links: für eine Kopplungsreihe unter Verwendung des Peptidepitops 2. Rechts: für eine Kopplungsreihe unter Verwendung des Peptidepitops 5.

Bereits die Umsetzung mit den relativ kurzen Peptidsequenzen (Dekapeptid im Fall von Epitop 2 und des Nonapeptids Epitop 5) führt zu einem erkennbaren Anstieg der N1s-Intensität. Die Bindungen des spezifischen Erst- und Zweitantikörpers ergeben allerdings im Vergleich zu einer kovalenten Antikörper-Immobilisierung nur einen geringen Anstieg der N1s-Intensität.

Die Immobilisierung des Peptidepitops 2 verursacht eine Zunahme der N1s-Intensität von 21,4 (EG31NH₂) auf 54 Einheiten. Nach Bindung es anti-HA-Antikörpers beträgt sie 126 Einheiten und steigt nach Umsetzung mit dem spezifischen Antigen weiter bis auf 248 Einheiten an.

Für die Bindung des Epitops 5 ergibt sich ein ähnlich großer Anstieg der N1s-Intensität auf 88 Einheiten. Die Antikörper-Kopplungen führen allerdings zu einem geringeren N1s-Intensitätsanstieg als im Fall des Epitops 5. Nach der Umsetzung mit dem 1. Antikörper beträgt diese 109 Einheiten, nach Behandlung mit dem spezifischen Antigen nimmt sie bis auf 187 Einheiten zu.

In der Abbildung IV.II.3-51 ist der Anstieg der N1s-Intensität für beide Epitope graphisch dargestellt; zum Vergleich ist in Abb. IV.II.3-50 außerdem der LSPR-spektroskopisch ermittelte Schichtdickenanstieg angegeben.

Beide Methoden (LSPR- und XPS-Messungen) führen zu einem ähnlichen Verlauf, wodurch die oben dargestellten Auswertungen bestätigt werden. Die integrierten XP-Intensitäten können jedoch nur zur qualitativen Interpretation der beschriebenen Bindungsstudien herangezogen werden.

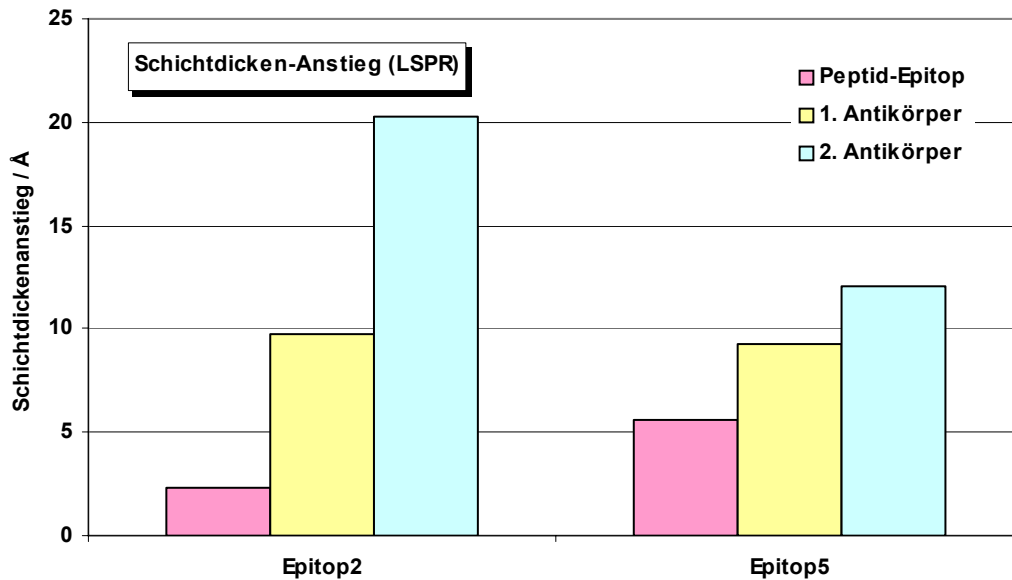


Abb. IV.II.3-50: LSPR-spektroskopisch ermittelter Schichtdickenanstieg für eine Kopplungsreihe unter Verwendung von Peptidepitop 2 (links) und Peptidepitop 5 (rechts).

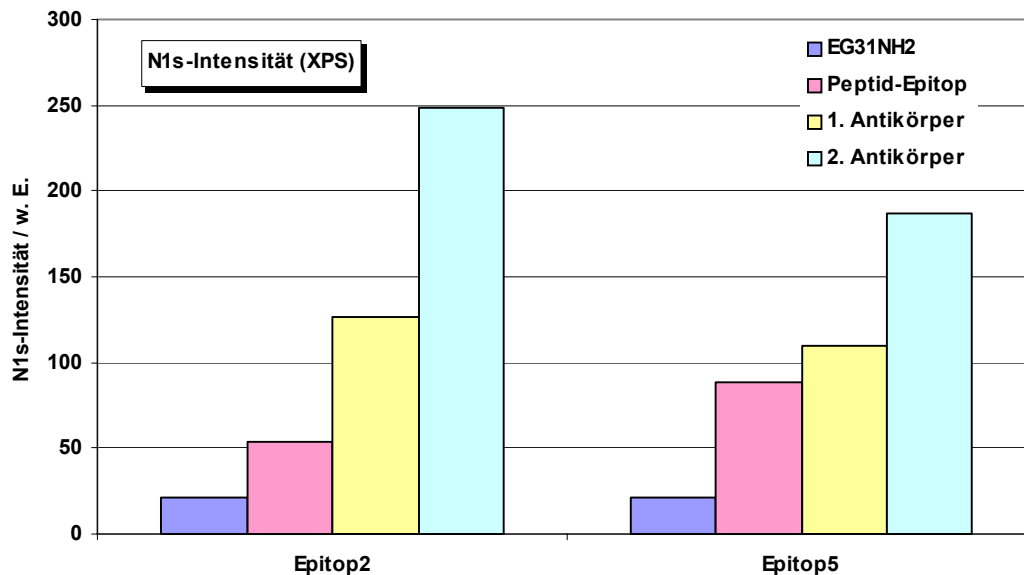


Abb. IV.II.3-51: Verlauf der gesamten N1s-Intensität für eine Kopplungsreihe unter Verwendung von Peptidepitop 2 (links) und Peptidepitop 5 (rechts).

Die Schichtdicken der verschiedenen Kopplungsstufen wurden röntgenphotoelektronenspektroskopisch über die Abschwächung der Au-Substratlage ermittelt. Die erhaltenen Werte sind für beide Epitope in der Tabelle IV.II.3-34 aufgeführt und den Werten gegenübergestellt, welche mittels der LSPR-Messungen erhalten wurden.

<i>Method</i>	<i>Epitop 2</i>		<i>Epitop 5</i>	
	<i>XPS</i>	<i>LSPR</i>	<i>XPS</i>	<i>LSPR</i>
<i>Schichtdicke</i>	<i>/Å</i>	<i>/Å</i>	<i>/Å</i>	<i>/Å</i>
Eg31NH2	42,2	41,6	42,2	38,4
SMCC	40,4	36,9	40,4	40,9
Epitope	41,8	39,2	42,1	46,5
1. Antikörper	43,6	46,7	42,6	50,2
2. Antikörper	52,6	56,9	45,5	53,0

Tab. IV.II.3-34: Röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelte und LSPR-basierende Schichtdicken der angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Die XP-basierenden Schichtdicken fallen insgesamt geringer aus als die LSPR-spektroskopisch ermittelten. Das kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass die LSPR-Verchiebungen in diesen Bindungsstudien insgesamt sehr gering ausfielen und teilweise nahe des aufzulösenden Bereiches liegen; ihre Bestimmung ist daher mit einem größeren Fehler verbunden. Die mittels beider Methoden erhaltenen Schichtdicken liegen jedoch in einem ähnlichen Bereich und es ergibt sich ein ähnlicher Trend bezüglich des Verlaufs der ermittelten Adsorbatschichtdicken.

Nach Umsetzung der Oberflächen mit dem Linker SMCC wird eine geringfügige Abnahme der Schichtdicken festgestellt, welche auf eine Ablösung (eventuell zuvor physisorbierter Bestandteile) der PEG-Matrix zurückgeführt werden kann; dies wird durch die C1s-Spektren bestätigt, welche eine zu hohe Abnahme der Ether-C1s-Intensität nach der Umsetzung mit dem Linker zeigen.

Für die Immobilisierung der Peptidepitope und die Bindung der Antikörper ergeben die XP- ebenso wie die LSPR-Messungen nur geringe Schichtdickenanstiege. Für die Stufe EG31NH2 und SMCC wurde nur eine Probe vermessen, so dass hier für Epitop 2 und 5 dieselben Schichtdicken angegeben sind.

Da ein Peroxidase-markierter Zweitantikörper verwendet wurde, konnte die Massenbelegung dieses Antikörpers zusätzlich anhand enzymkinetischer Messungen ermittelt werden.

Enzymkinetische ELISA-Messungen

Die Massenbelegung des Peroxidase-markierten Zweitantikörpers wurde über einen Oberflächen-modifizierten ELISA ermittelt werden. Die Abbildung IV.II.3-52 zeigt den UV-spektroskopisch detektierten Anstieg der Konzentration des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS.

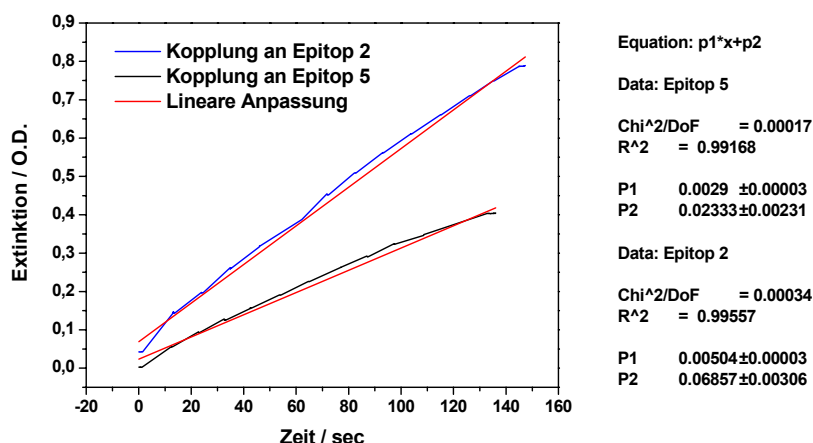


Abb. IV.II.3-52:

UV/Vis-spektroskopisch detektierter Konzentrationsanstieg des enzymatisch gebildeten Radikalkations ABTS; Anpassung nach Michaelis-Menten zur Bestimmung der Massenbelegung des POD-markierten Zweitantikörpers für eine Kopplungsreihe unter Verwendung von Epitop 2 (blau) und Epitop 5 (schwarz).

Die erhaltenen Massenbelegungen sind in der Tabelle IV.II.3-35 aufgeführt. Sie wurden verwendet, um mit Hilfe des in Abschnitt 2 bestimmten Eichwertfaktors ($35,1 \text{ ng}/(\text{cm}^2 \cdot \text{nm})$) die theoretisch zu erwartende LSPR-Verschiebung für diese Funktionalisierungsstufe zu berechnen. Die auf diese Weise ermittelten Werte sind ebenfalls in der Tabelle enthalten; zum Vergleich sind auch die tatsächlich beobachteten LSPR-Verschiebungen angegeben.

Stufe	Massenbelegung		LSPR-Verschiebung	
	ELISA / ng/cm^2	LSPR / ng/cm^2	ELISA /nm	LSPR /nm
Epitop 2	85,32	88,04	2,43	2,51
Epitop 5	46,10	24,20	1,31	0,69

Tab. IV.II.3-35: Enzymkinetisch ermittelte und LSPR-basierende Massenbelegung des Zweitantikörpers; beobachtete und lt. der ELISA-Massenbelegung zu erwartende LSPR-Verschiebung.

Die enzymkinetisch bestimmten Massenbelegungen führen zu theoretischen LSPR-Verschiebungen, die gut mit den tatsächlich beobachteten übereinstimmen. Diese fallen insgesamt nur gering aus und liegen teilweise nahe des aufzulösenden Bereiches ($\pm 0,5 \text{ nm}$).

Interpretation und Fazit

Die beschriebenen Stufen zur Erzeugung der Peptidassays (s. Abb. IV.II.3-39) wurden mittels XPS- und LSPR-Messungen charakterisiert; die Bindungsrate des Zweitantikörpers konnte zusätzlich anhand eines ELISAs ermittelt werden.

Die unterschiedlichen Methoden führten zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich Schichtdicke und Massenbelegung der jeweiligen Funktionalisierungsstufen; insbesondere konnte nachgewiesen werden, dass die geringen LSPR-Verschiebungen auf niedrige Kopplungsraten der eingesetzten Biomoleküle zurückzuführen sind. Die erzielten Bindungsraten liegen teilweise nahe der Detektionsgrenze der präparierten Sensoroberflächen. Die Versuche wurden mehrmals wiederholt; höhere Kopplungsraten konnten jedoch nicht erreicht werden.

Es wird vermutet, dass der biomolekulare Erkennungsschritt durch die sterischen Ansprüche der Oberflächenreaktion erschwert wird, so dass im Gegensatz zu einer kovalenten Antikörper-Bindung hier nur geringe Erstantikörper-Adsorptionsraten resultieren.

Da die Peptidepitope in der polymeren Matrix teilweise vergraben sind, ist die Zugänglichkeit der makromolekularen Antikörper und somit auch der Erkennungsschritt sterisch gehindert.

4 LSPR-Imaging strukturierter Beschichtungen

4.1 Spotten von Peptid-Arrays

Es wurde zunächst vermutet, dass die bei den Peptid-Assays (s. Abschnitt 3) erzielten niedrigen LSPR-Verschiebungen in einer teilweisen Ablösung der polymeren EG-Matrix begründet sind. Sie wurden daher in ein Array-Format übertragen und die Oberflächen in Abständen von 50 μm abgerastert, wobei an jedem Punkt LSPR-Spektren aufgenommen wurden. Die unfunktionalisierten Zwischenräume dienen hierbei als Referenz zur Bestimmung der LSPR-Verschiebung. Die Darstellung der Spektren erfolgt in Form eines farbigen Bildes, wobei der Betrag der Resonanzverschiebung mit einer bestimmten Farbskala korreliert (LSPR-Imaging). Die Effekte einer teilweisen Ablösung der PEG-Matrix machen sich in einem solchen Rasterspektrum somit nicht bemerkbar.

4.1.1 EG31NH₂-terminierte Basisfilme

Die Funktionalisierungsstufen zur Erzeugung von Peptid-Arrays sind in der Abbildung IV.II.4-1 schematisch dargestellt; sie entsprechen weitgehend denen des Abschnitts 3.2.

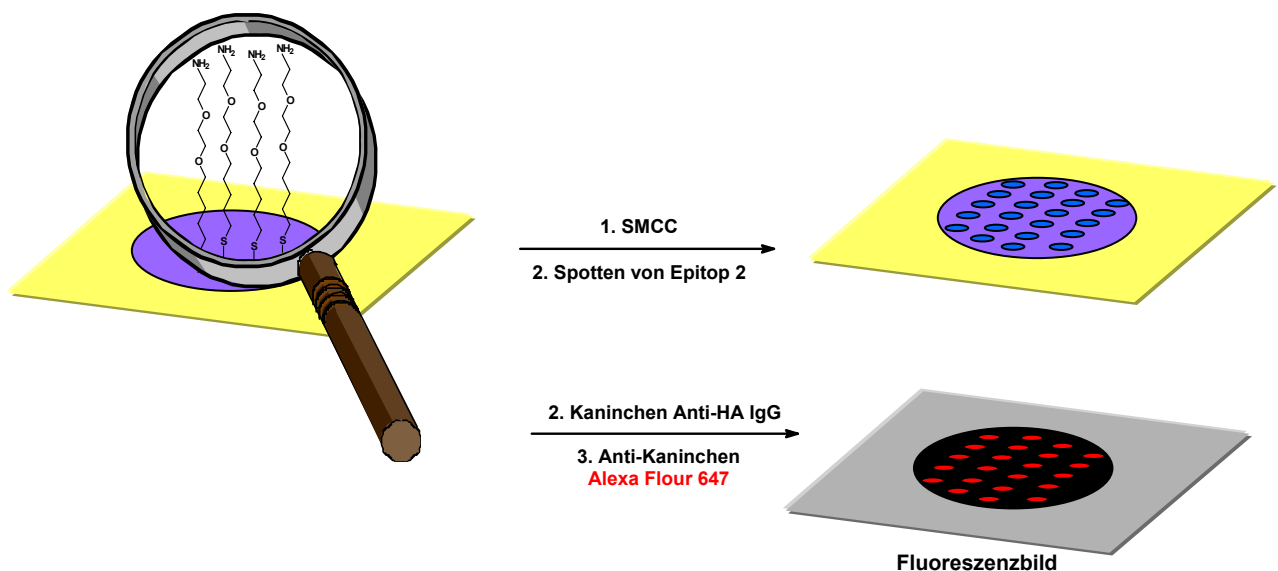


Abb. IV.II.4-1: Schematische Darstellung der Integration von Peptidarrays in die EG31NH₂-terminierten Nanopartikeloberflächen unter Verwendung eines Spot-Roboters und Visualisierung des Bindungsmusters durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper.

Die Oberflächen wurden zunächst unter Ausbildung selbstaggregierender Monolagen mit dem Thiol EG31NH₂ funktionalisiert. Die Aminogruppen dieses Basisfilms wurden zur Immobilisierung der Peptidepitope anschließend mit dem Linker SMCC umgesetzt. Mit Hilfe eines Spotroboters wurde nun das Epitop 2 (HA-Epitop), für welches im Vergleich zu Epitop 5 (Flag-Epitop) in flächigen Vorversuchen höhere Bindungsraten der spezifischen Antikörper erzielt werden konnten, in Abständen von 500 µm und einem Probenvolumen von 1 nL pro Spot im Array-Format auf die Oberflächen aufgebracht.

Die Versuche wurden unter einer Verdopplung des Spotabstandes auf 1mm wiederholt. Anschließend wurden die Oberflächen für eine Stunde mit einer Mercaptoethanol-haltigen Lösung behandelt, um nicht-umgesetzte Linker-Funktionalitäten zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit dem epitopspezifischen Erstantikörper (Kaninchen anti-HA). Zur Visualisierung der erzeugten Strukturen wurde mit dem spezifischen und fluoreszenzmarkierten anti-Kaninchen-(Alexa-Fluor® 647) Antikörper umgesetzt.

4.1.1.1 *Fluoreszenzscanning*

Die Abbildung IV.II.4-2 (links) zeigt die bei einem Spotabstand von 500 µm erhaltenen Fluoreszenzaufnahmen. Eine Struktur ist nicht zu erkennen, da die wässrige Peptidlösung infolge der hohen Hydrophilie der verwendeten PEG-Matrix auf der Oberfläche zusammenläuft. Da eine weitere Reduktion des Probenvolumens technisch nicht möglich ist, wurden die Versuche unter Verdopplung des Spotabstandes auf 1 mm (s. Abb. IV.II.4-2 rechts) wiederholt. Hierbei konnte eine Separation erzielt werden; allerdings trat auch hier eine Verbreiterung der Spotgröße auf.

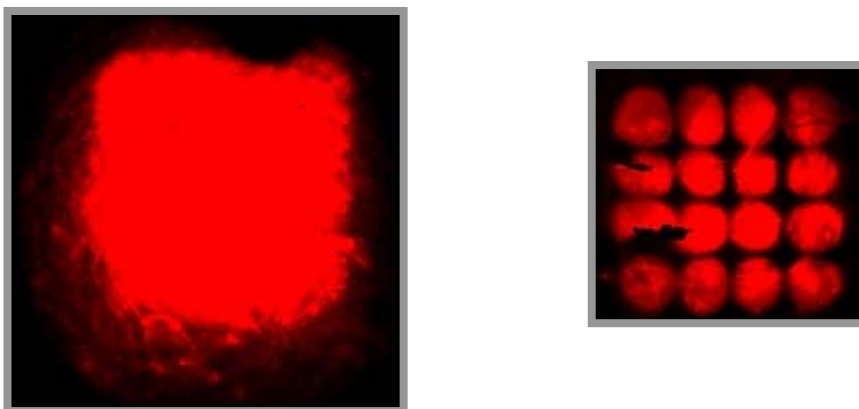


Abb. IV.II.4-2: Fluoreszenzbilder der in die EG31NH₂-terminierten Nanopartikeloberflächen integrierten Peptidarrays. Links: Spotabstand 500 µm. Rechts: Spotabstand 1mm; Spotvolumen 1 nL.

Diese Oberfläche wurde in Abständen von 50 µm abgerastert, um ein LSPR-Bild zu erzeugen.

4.1.1.2 LSPR-Imaging

Die Abbildung zeigt das LSPR-Rasterbild, das von der in Abbildung IV.II.4-2 (rechts) dargestellten Oberfläche (Spotabstand 1 mm) erhalten wurden.

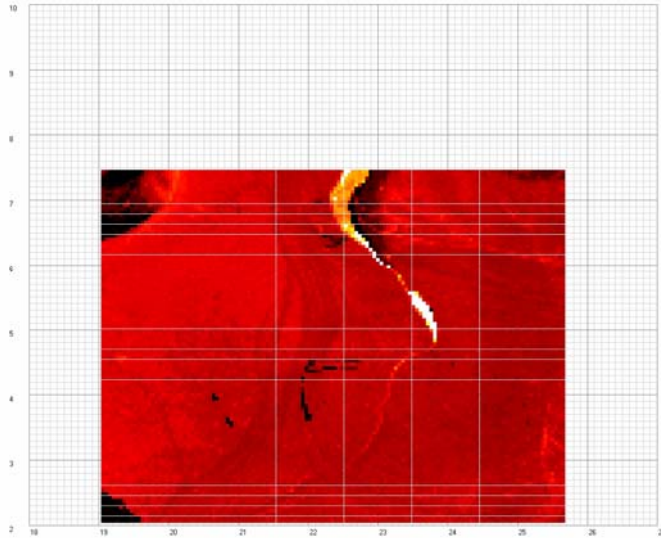


Abb. IV.II.4-3:

LSPR-Bilder; aufgenommen nach Integration der Peptidpitope in eine EG31NH₂-Matrix und Umsetzung mit den Antikörpern; Spotabstand 1mm.

Die fluoreszenzspektroskopisch visualisierte Struktur konnte mit dieser Methode nicht wiedergefunden werden; stattdessen ergibt sich ein sehr homogenes Bild von der Oberfläche; größere lokale Differenzen bezüglich der Position der LSP-Resonanzen bestehen somit nicht.

Die Funktionalisierungen führen daher zu Massenbelegungen, welche unterhalb der Detektionsgrenze der Sensoroberflächen liegen; die bereits in Abschnitt 3.2 bei den flächigen Vorversuchen (Peptid-Assays) gezogenen Schlussfolgerungen werden mit diesem Array-Ansatz daher bestätigt. Die anfängliche Vermutung einer Ablösung der PEG-Matrix kann somit ausgeschlossen werden, da beim Abrastern der Oberfläche die unfunktionalisierten Zwischenräume zur Referenzierung genutzt werden, so dass solche Effekte keinen Einfluß auf das Aussehen des erzeugten Rasterbildes ausüben. Die in den Biofunktionalisierungen erzielten Umsatzraten sind mit Massenbelegungen verbunden, die unterhalb der Detektionsgrenze der LSPR-Methode liegen.

4.1.2 EG17NH₂-terminierte Basisfilme

Die unter 4.1.1 beschriebenen Array-Versuche wurden auf analoge Weise unter Verwendung des kürzerkettigen Thiols EG17NH₂ durchgeführt. Auch hier wurde das Peptidtop 2 zum einen in Abständen von 500 µm und in einer weiteren Versuchsreihe in Abständen von 1 mm in einem Array-Format mit Hilfe eines Spotroboters auf die Oberflächen aufgebracht.

4.1.2.1 *Fluoreszenzscanning*

In der Abbildung IV.II.4-4 sind die Fluoreszenzaufnahmen gezeigt, welche bei Anwendung eines Array-Abstandes von 500 µm (links) und 1 mm Abständen (rechts) erhalten wurden. Bei diesem kürzerkettigen PEG-Thiol ist auch bei dem geringeren Abstand von 500 µm bereits eine Struktur erkennbar.

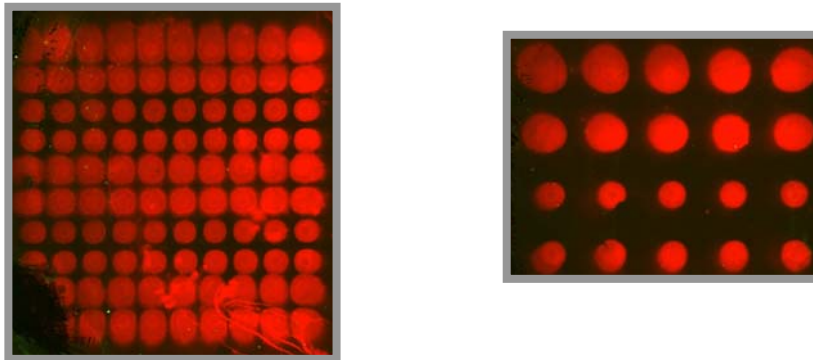


Abb. IV.II.4-4: Fluoreszenzbilder der in die EG17NH₂-terminierten Nanopartikeloberflächen integrierten Peptidarrays. Links: Spotabstand 500 µm. Rechts: Spotabstand 1mm; Spotvolumen 1 nL. Die Strukturen sind teilweise verbreitert, da die wässrige Peptidlösung auf der hydrophilen PEG-Oberfläche verläuft.

Die beschichteten Oberflächen zeichnen sich demnach durch eine geringere Hydrophilie als die EG31NH₂-terminierten Oberflächen aus, so dass eine Spot-Separation bereits bei Anwendung kleinerer Abstände erzielt werden kann. Allerdings tritt auch bei dieser PEG-Matrix eine Verbreiterung des Spotmusters auf.

4.1.2.2 LSPR-Imaging

In der Abbildung IV.II.4-5 sind die LSPR-Bilder dargestellt, welche von der 500 μm (links) und 1 mm (rechts) Struktur aufgenommen wurden.

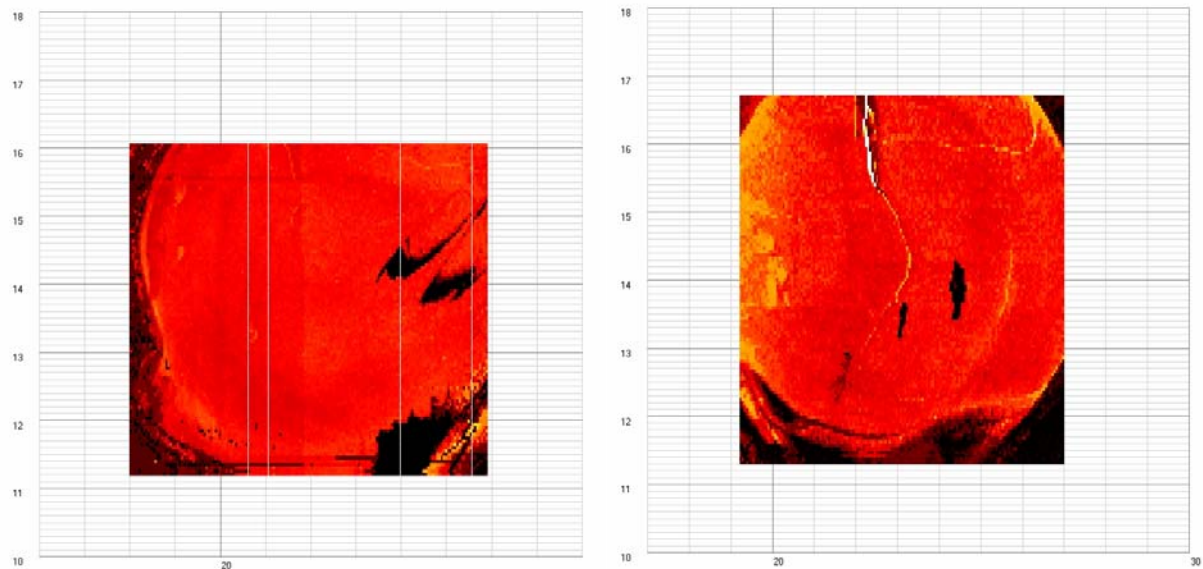


Abb. IV.II.4-5: LSPR-Bilder; aufgenommen nach Integration der Peptidepitope in eine EG17NH₂-Matrix und der Umsetzung mit den Antikörpern. Links: Spotabstand 500 μm ; Rechts: Spotabstand 1 mm.

Auch in diesem Fall konnten die fluoreszenzspektroskopisch bereits nachgewiesenen Peptid-Muster nicht wiedergefunden werden; von den Oberflächen wird auch in dieser Versuchsreihe ein sehr homogenes LSPR-Bild erhalten. Daher gelten auch hier die bereits in Abschnitt 4.1.1 geschilderten Schlussfolgerungen; die erzielten Bindungsraten liegen in diesen Anwendungen unterhalb der Detektionsgrenze der präparierten Nanosensor-Oberflächen.

4.1.3 Fazit zur Integration von Peptidarrays

Die Integration von Peptidarrays in die aminoterminierten PEG-Matrizen war mit mehreren Komplikationen verbunden. Zum einen zeigte sich, dass ein Spotten von Peptidepitopen aus wässriger Lösung nur bedingt möglich ist, da die PEG-Beschichtungen eine hohe Hydrophilie aufweisen, so dass sich die wässrige (Peptid-)Lösung auf der Oberfläche verbreitet. Durch Verwendung kürzerkettiger PEG-Thiole konnte dieses Problem teilweise umgangen werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung multifunktionaler Moleküle, so dass höhere Oberflächenkonzentrationen des hydrophoben SMCC-Linkers eingebaut werden können [246]. Analog zu den in Abschnitt 3.2 beschriebenen Peptidassays konnten auch in diesem Array-Ansatz aus denselben Gründen nur geringe Kopplungsraten der Antikörper erzielt werden. In den vorstehend beschriebenen Experimenten waren diese zu gering, um mittels

LSPR-Imaging nachgewiesen werden zu können; Fluoreszenzaufnahmen der Oberflächen zeigten jedoch, dass die beschriebenen Biofunktionalisierungen erfolgreich waren.

4.2 Photochemische Strukturierung

Da ein Spotten von Peptidpitopen zur Integration von Peptid-Arrays zum einen aufgrund der hohen Hydrophilie der funktionalisierten PEG-Oberflächen nur bedingt möglich (Erhöhung der Abstände zwischen den Spots) und mit Massenbelegungen verbunden war, welche unterhalb der Detektionsgrenze der verwendeten Sensoroberflächen liegen, wurde nach einem anderen Ansatz gesucht, um Oberflächenstrukturen zu erzeugen, welche mittels LSPR-Imaging visualisiert werden können.

Man entschied sich für eine photochemische Strukturierung, da diese zum einen eine ausreichend sensitive Methode zur Behandlung der mechanisch sehr sensiblen Nanopartikeloberflächen darstellt und eine effektive Strukturierung organischer Oberflächenbeschichtungen ermöglicht.

Die Vorstellung war hierbei, die Oberflächen zunächst mit einer ersten Thiolmonolage flächig zu funktionalisieren und diese anschließend durch UV-Bestrahlung über eine Photomaske in strukturierter Form oxidativ zu entfernen.

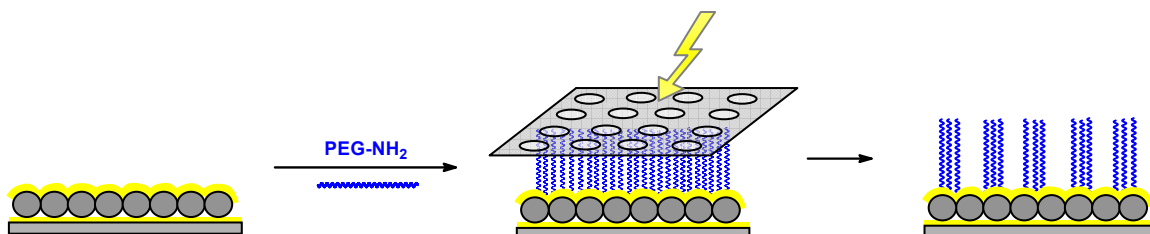


Abb. IV.II.4-6: Schematische Darstellung der photochemischen Strukturierung organischer Monolagen. Die Bestrahlung der Oberflächen über eine Photomaske bewirkt eine oxidative Desorption an den exponierten Stellen.

Anschließend können die so erzeugten Lochmuster mit einer anderen Thiolverbindung aufgefüllt werden, so dass strukturierte Oberflächen unterschiedlicher chemischer Funktionalitäten resultieren. Auf diese Weise können Biomoleküle in definierter Struktur an die Oberfläche gebunden werden.

4.2.1 Vorversuche

Zunächst sollte in Vorversuchen geklärt werden, ob es möglich ist, die mit einer Thiollage funktionalisierten Oberflächen durch UV-Bestrahlung in ausreichendem Maße oxidativ zu reinigen, um diese erneut als Substrat zur Ausbildung selbstaggregierender Monolagen verwenden zu können.

Ein weiterer Schwerpunkt betraf dabei die Bestimmung der optimalen Bestrahlungsdauer. Diese sollte möglichst kurz gewählt werden, weil davon auszugehen ist, dass längere Bestrahlungszeiten die laterale Auflösung dieser Strukturierungsmethode herabsetzen. Da die aufgelegte Photomaske die Oberflächen nicht luftdicht abschließt, dringt das gasförmige Ozon teilweise auch in diese Zwischenräume ein und führt hier ebenfalls zu einem oxidativen Abbau; daher ist eine minimale Bestrahlungszeit anzuwenden, um diesen ungewollten Prozess weitgehend zu unterdrücken.

4.2.1.1 *Ermittlung der optimalen Bestrahlungsdauer*

Eine optimale Bestrahlungszeit liegt vor, wenn die organische Beschichtung der mit UV-Licht bestrahlten Regionen effektiv abgebaut wird, die unter der Photomaske befindliche Beschichtung durch das gasförmige Ozon jedoch weitgehend unbeschädigt bleibt. Unter dem 1. Aspekt wären somit möglichst lange Bestrahlungszeiten förderlich; hinsichtlich des 2. Punktes wirken sich diese jedoch negativ aus.

Es wurde daher in flächigen Vorversuchen versucht eine minimale Bestrahlungszeit zu bestimmen, bei der bereits eine effektive oxidative Desorption adsorbierter Monolagen stattfindet. Hierzu wurden die Nanopartikeloberflächen mit dem polymeren EG-Thiol EG31NH₂, für welches hohe Massenbelegungen zu erwarten sind, beschichtet und flächig für unterschiedliche Zeiten bestrahlt. Eine Charakterisierung erfolgte durch Aufnahme von LSPR-Spektren und der Analyse des nach der Bestrahlung resultierenden back-shifts der bei etwa 400nm auftretenden LSP-Resonanz.

Nach Ermittlung der optimalen (minimalen) Bestrahlungszeit, wurden die Versuche unter Verwendung von Photomasken wiederholt, um das Ausmaß des Abbaus der unter der Maske befindlichen Monolage analysieren zu können.

LSPR-Messungen

In der Abbildung IV.II.4-7 sind die LSPR-Spektren dargestellt, welche vor und nach einer 5-minütigen flächigen Bestrahlung der EG31NH₂-terminierten Oberflächen aufgenommen wurden. Gezeigt ist jeweils ein Übersichtsspektrum sowie als Detailausschnitt die 400er Resonanzlinie.

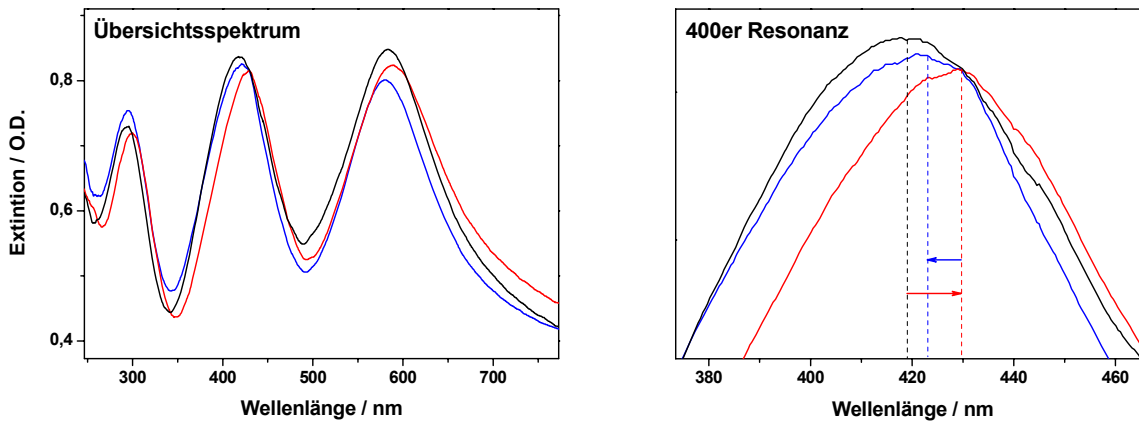


Abb. IV.II.4-7: LSPR-Spektren. Aufgenommen vor und nach der Adsorption von EG31NH₂ sowie nach einer 5-minütigen UV-Bestrahlung der funktionalisierten Oberfläche. Links: Übersichtsspektrum. Rechts: Detailausschnitt der LSP-Resonanz bei etwa 400 nm.

— 5 min UV
 — EG31NH₂
 — vor Adsorption

Die Adsorption des EG31NH₂ führte hier zu einer mittleren Verschiebung von 10,4 nm ins Rote. Nach einer 5-minütigen UV-Bestrahlung wird die Ursprungsposition der LSP-Resonanz nicht erreicht; der back-shift beträgt im Durchschnitt nur etwa 8,1 nm. Dies entspricht einem 78%-igem Abbau der organischen Monolage. Die Versuche wurden daher unter einer Erhöhung der Bestrahlungszeiten wiederholt.

Die Abbildung IV.II.4-8 zeigt die im Fall einer 10-minütigen UV-Bestrahlung resultierenden LSPR-Spektren.

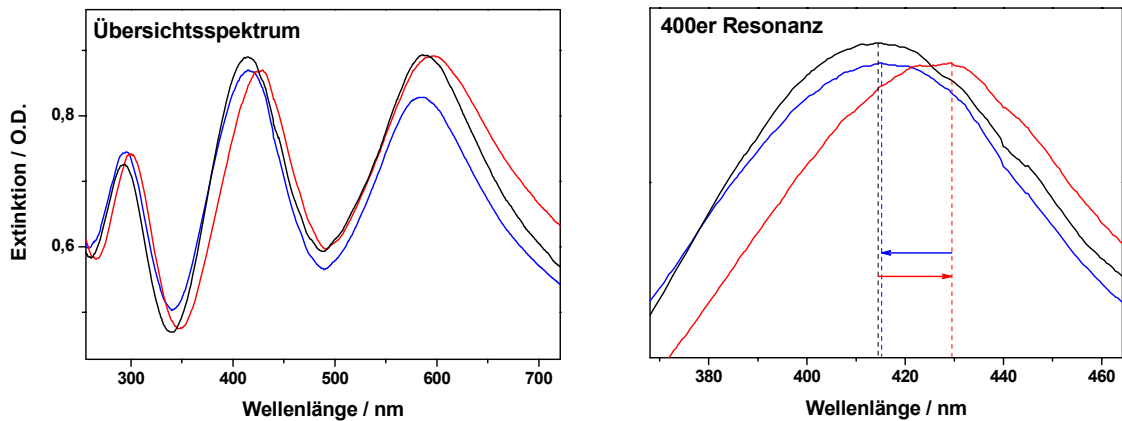


Abb. IV.II.4-8: LSPR-Spektren. Aufgenommen vor und nach der Adsorption von EG31NH₂ sowie nach einer 10-minütigen UV-Bestrahlung der funktionalisierten Oberfläche. Links: Übersichtsspektrum. Rechts: Detailausschnitt der LSP-Resonanz bei etwa 400 nm.

— 10 min UV
 — EG31NH₂
 — vor Adsorption

Für die Adsorption des EG31NH₂ wurde hier ein mittlerer Verschiebungsbetrag von 11,5 nm ermittelt. Nach der UV-Bestrahlung wird nahezu die vor der Adsorption festgestellte LSP-Resonanzlage erreicht; der durchschnittliche back-shift liegt bei 10,6 nm, so dass von einem 93%-igem Filmabbau ausgegangen werden kann. In den folgenden Bestrahlungsversuchen wurde daher eine Bestrahlungszeit von 10 Minuten eingehalten.

Anschließend wurde das Ausmaß der Rück-Verschiebung bei Verwendung der Photomasken analysiert, um eine Aussage über den Grad des Filmabbaus der unter der Maske befindlichen Beschichtung treffen zu können. Hierzu wurden flächige (nicht-ortsaufgelöste) LSPR-Spektren aufgenommen und auf diesem Weg eine mittlere Verschiebung für die Oberflächen bestimmt. Der bei der Aufnahme der Spektren involvierte Probenbereich liegt dabei in einer Größenordnung von etwa 10 mm² (determiniert durch die Größe des ausgeleuchteten Probenbereichs); das von der Oberfläche aufgenommene Spektrum entspricht somit einer Mittelung über einen Probenbereich dieser Größe.

Die Abbildung IV.II.4-9 zeigt ein typisches LSPR-Detailspektrum, welches vor und nach einer 10-minütigen Bestrahlung der EG31NH₂-terminierten Oberflächen über eine Photomaske mit einem Lochdurchmesser von 1 mm und einem Loch-zu-Loch – Abstand von 1,5 mm erhalten wurden.

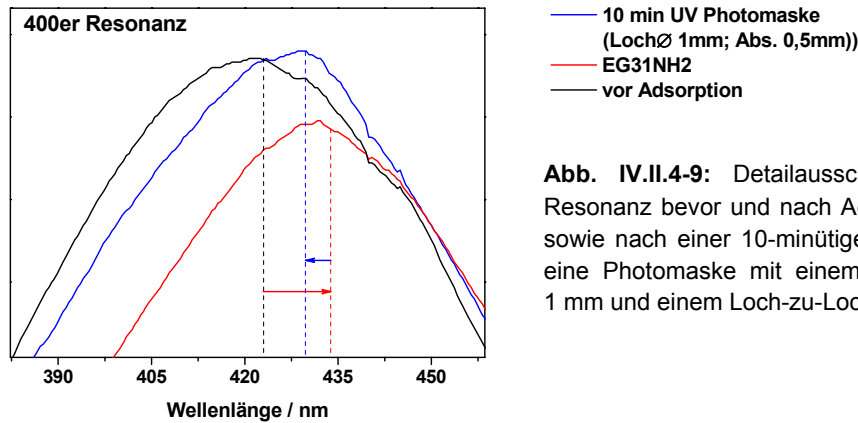


Abb. IV.II.4-9: Detailausschnitt der 400er LSP-Resonanz bevor und nach Adsorption von EG31NH₂ sowie nach einer 10-minütigen UV-Bestrahlung über eine Photomaske mit einem Lochdurchmesser von 1 mm und einem Loch-zu-Loch-Abstand von 0,5 mm.

Die Adsorption des EG31NH₂ führt zu mittleren Verschiebungen von etwa 10,8 nm ins Rote. Der back-shift nach der 10-minütigen UV-Bestrahlung beträgt hier nur 3,67 nm. Im Gegensatz zu einer flächigen Bestrahlung (92%-iger Filmabbau) ergibt sich bei Verwendung der beschriebenen Photomaske somit nur ein mittlerer Filmabbau von 34%. Die Verwendung der Photomaske führt dazu, dass nur etwa 34,9 % der Probenfläche bestrahlt werden; bei einem 92%-igem Filmabbau und einer ursprünglichen Verschiebung von 10,8 nm (durch Adsorption von EG31NH₂) sollte sich somit ein theoretischer Verschiebungsbetrag von 3,47 nm ergeben.

Dieser theoretische Verschiebungsbetrag liegt sehr nahe an dem praktisch beobachteten Wert von 3,67 nm. Der tatsächlich gemessene back-shift liegt somit etwas höher; im Fall eines vollständigen Abbaus der bestrahlten Regionen sollte eine Verschiebung von 3,77 nm resultieren.

Bei einer Beurteilung dieser Werte muss allerdings beachtet werden, dass die Ausmaße der verwendeten Strukturierung (1 mm Lochdurchmesser und 0,5 mm Abstand zwischen 2 Löchern) und die Größe des involvierten Probenbereiches (Durchmesser des ausgeleuchteten Probenbereiches ~ 3,5 mm) hier in einer ähnlichen Größenordnung liegen, so dass die Aufnahme eines einzelnen Spektrums gegebenenfalls keinen repräsentativen Mittelwert für die Oberfläche darstellt; ein Verschiebungsbetrag ist in diesem Fall nur bei einer Mittelwertbildung über eine ausreichende Anzahl von an verschiedenen Stellen aufgenommener Spektren repräsentativ. Die hier angegebenen Verschiebungsbeträge entsprechen jedoch einer Mittelung über 8 Spektren, welche an unterschiedlichen Stellen der Probe aufgenommen wurden. Daher zeigen die vorstehend beschriebenen Ergebnisse, dass ein oxidativer Abbau

der von der Maske bedeckten Beschichtung bei einer Bestrahlungszeit von 10 Minuten unterbleibt; ansonsten hätte sich ein back-shift von über 3,77 nm ergeben.

Fazit zur Ermittlung der optimalen Bestrahlungsdauer

Mittels der beschriebenen Vorversuche konnte nachgewiesen werden, dass eine Bestrahlungszeit von 10 Minuten eine effektive oxidative Desorption einer adsorbierten EG31NH₂-Monolage (Schichtdicke ca. 40 Å) ermöglicht, wobei die von der Photomaske abgedeckte organische Beschichtung jedoch nahezu unbeschädigt bleibt. In den nachfolgend beschriebenen photochemischen Strukturierungsversuchen wurde daher eine Bestrahlungszeit von 10 Minuten eingehalten.

4.2.1.2 Re-Funktionalisierung nach oxidativer Desorption von Thiol-Monolagen

Desorption von EG6OH, Refunktionalisierung mit EG17NH₂ und Integration von Antikörpern

In der Abb. IV.II.4-10 sind die einzelnen Schritte dieses Ansatzes dargestellt.

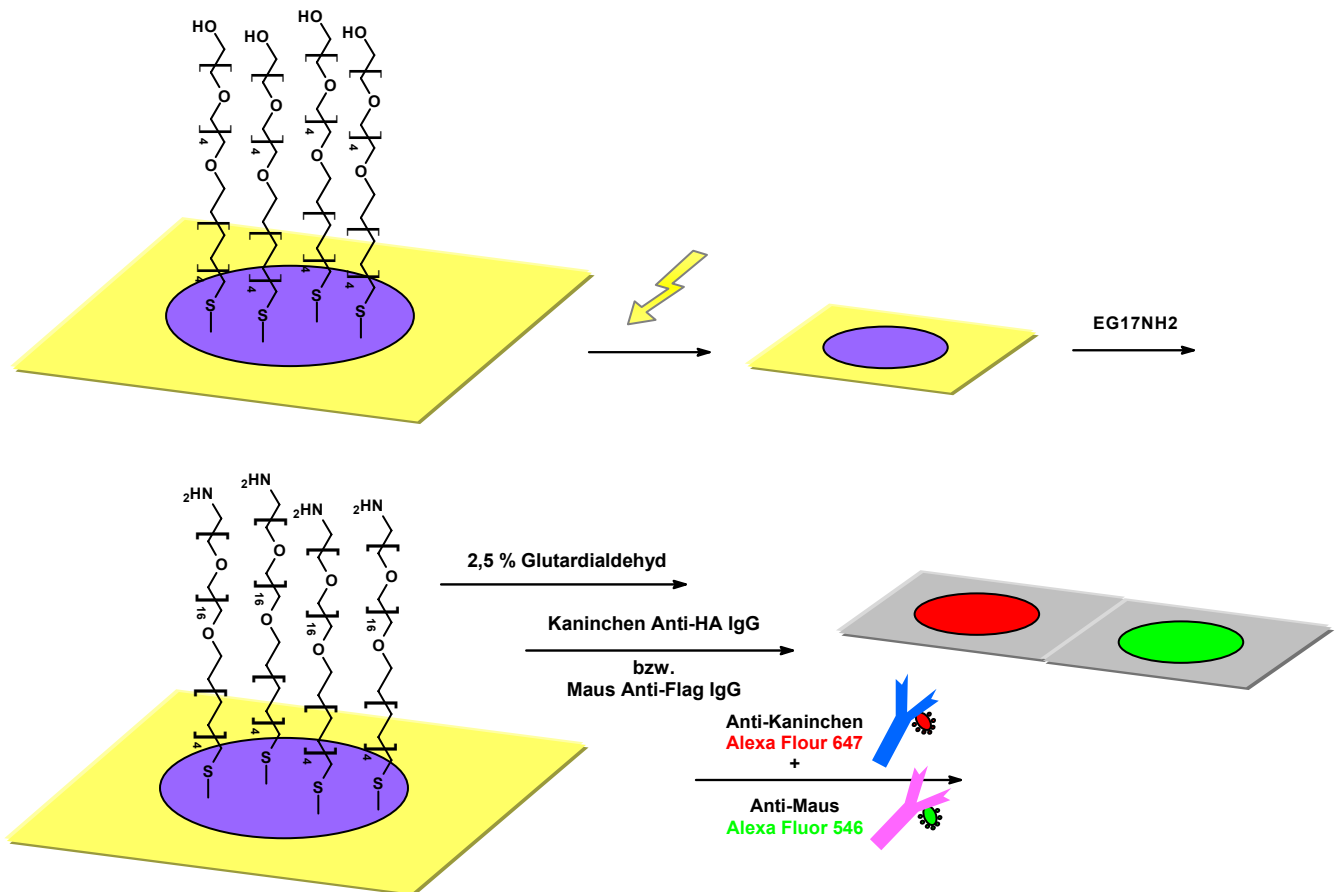


Abb. IV.II.4-10: Schematische Darstellung der Refunktionalisierung von EG6OH-funktionalisierten Nanopartikeloberflächen. Oxidative Desorption der organischen Monolage, Adsorption von EG17NH₂ unter Ausbildung selbstaggregierender Monolagen und Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper.

Die Sensoroberflächen wurden zunächst unter Ausbildung selbstaggregierender Monolagen mit dem Thiol EG6OH (1) funktionalisiert, welche anschließend durch eine 10 minütige UV-Bestrahlung oxidativ entfernt wurde (2). Die Oberflächen wurden in einem nächsten Schritt mit dem Thiol EG17NH₂ beschichtet (3), so dass nach Einführung des Linkers Glutardialdehyd fluoreszenzmarkierte Antikörper gebunden werden konnten (4).

LSPR-Messungen

Nach jeder der beschriebenen Funktionalisierungsstufen (1-4) wurden LSPR-Spektren aufgenommen und die Absorptionsmaxima der LSP-Resonanzen bestimmt. In der Abb. IV.II.4-11 sind ein typisches Übersichtsspektrum und als Detail-Ausschnitt die Resonanz bei 400 nm dargestellt.

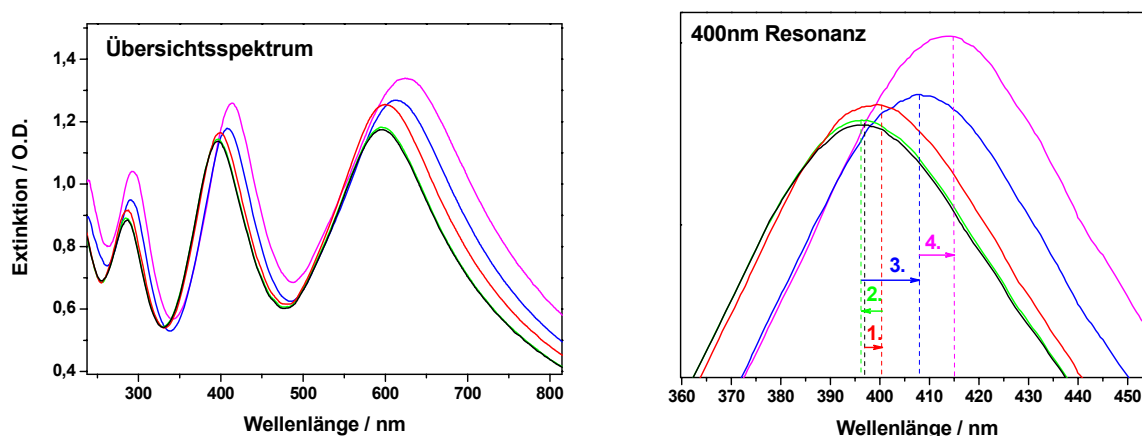


Abb. IV.II.4-11: Übersichts-LSPR- (links) und Detailspektrum der 400er LSP-Resonanz (rechts); aufgenommen nach Funktionalisierung mit EG6OH, oxidativer Desorption der organischen Monolage, Refunktionalisierung mit EG17NH₂ und Kopplung fluoreszenzmarkierter Antikörper.

4. — Antikörper
 3. — EG17NH₂
 2. — 10 min UV
 1. — EG6OH
 — vor Adsorption

Die Tabelle IV.II.4-1 enthält die auf die jeweilige Vorstufe bezogenen LSPR-Verschiebungen; sie entsprechen einer Mittelwertbildung aus 6 bis max. 12 ausgewerteten Spektren verschiedener Nanopartikel-Spots.

Stufe	LSPR bei 300 nm		LSPR bei 400 nm		LSPR bei 600 nm	
	$\Delta\lambda_{max}$	SD	$\Delta\lambda_{max}$	SD	$\Delta\lambda_{max}$	SD
EG6OH	0,87	0,42	2,76	0,94	4,04	1,66
UV	-0,75	0,50	-2,87	0,94	-4,93	2,39
EG17NH ₂	6,14	1,07	9,65	1,38	16,84	2,66
1AK	1,90	0,24	5,17	0,23	9,61	1,72

Tab. IV.II.4-1: Mittlere LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm und zugehörige Standardabweichung für die angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Anhand der Spektren ist zu erkennen, dass die LSP-Resonanzen nach der UV-Bestrahlung wieder zurück in den kürzerwelligen Bereich verschoben sind und nahezu die Position des unfunktionalisierten Zustandes erreichen. Die anschließende Beschichtung der Sensoroberflächen mit EG17NH₂ führt erneut zu einer Verschiebung in den längerwelligen Bereich mit einem recht hohen mittleren Verschiebungs-Betrag von etwa 9,7 nm (400er-Resonanz).

Beide Tatsachen sprechen für einen vollständigen oxidativen Abbau der zuvor adsorbierten EG6OH-Monolage sowie einer effektiven Monolagen-Ausbildung des im 2. Schritt adsorbierten EG17NH₂-Thiols.

Die nach Gleichung (113) berechneten normierten Verschiebungen sind in der Tabelle IV.II.4-2 angegeben.

Stufe	LSPR bei 300 nm	LSPR bei 400nm	LSPR bei 600 nm
	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$
EG6OH	1	3,17	4,64
UV	-1	-3,80	-6,57
EG17NH₂	1	1,57	2,74
1. Antikörper	1	2,72	5,06

Tab. IV.II.4-2: Auf die Verschiebung der 300er-Resonanz normierte LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm.

Die erhaltenen Werte fallen für die einzelnen Resonanzen weniger einheitlich aus; allerdings ergibt sich auch hier dieselbe Rangfolge zwischen den Verschiebungsbeträgen bzw. Sensitivitäten der 3 LSP-Resonanzen (s. Abschnitt 3.1).

Mit Hilfe der in Abschnitt 2 ermittelten Eichwertfaktoren konnte die Schichtdicke und Massenbelegung der einzelnen Adsorbatlagen bestimmt werden. In der Tabelle sind die berechneten Werte angegeben; diese beziehen sich jeweils auf die unmittelbare Vorstufe des Funktionalisierungsschemas der Abbildung IV.II.4-10.

Stufe	Schichtdicke	Massenbelegung
	/Å	/ ng/cm ²
EG6OH	11,25	96,81
UV	-11,62	-100
EG17NH₂	39,33	338,57
1. Antikörper	21,06	181,25

Tab. IV.II.4-3: Anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechneter und mit den angegebenen Funktionalisierungen verbundener Zuwachs an Schichtdicke und Massenbelegung.

Zur Charakterisierung der einzelnen Funktionalisierungsstufen wurden XP-Spektren von den Oberflächen aufgenommen.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

In der Abb. IV.II.4-12 sind die XP-Spektren dargestellt, welche nach Beschichtung der Oberflächen mit einer EG6OH-Monolage aufgenommen wurden.

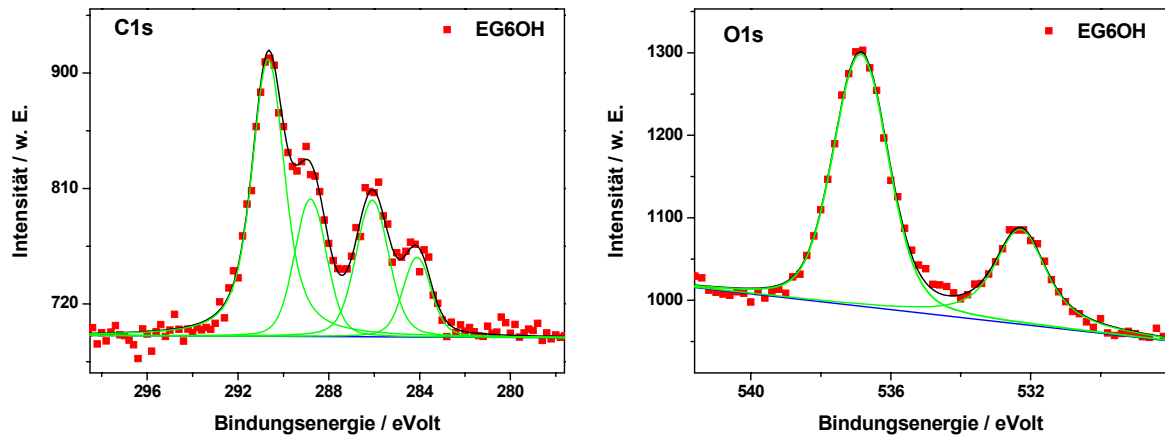


Abb. IV.II.4-12: C1s- (links) und O1s-Detailspektrum (rechts); aufgenommen nach Funktionalisierung der Nanopartikeloberflächen mit EG6OH.

Bei 284,1 eV werden die Alkyl-Kohlenstoffe detektiert, während der Signallage bei 286,1 eV die Ether-Kohlenstoffe zugeordnet werden können. Die Ladungsaufspaltung beträgt im gezeigten C1s-Detailspektrum 4,6 eV.

Den O1s-Ether-Atomen entspricht im nicht-aufgeladenen Zustand die Signallage bei 532,2 eV; die Anpassung der Spektren führte hier ebenfalls zu einer Ladungsaufspaltung von 4,6 eV. Das Ether-C1s/O1s der gezeigten Anpassung beträgt 1,86 und entspricht somit dem Sollwert.

Die Abbildung IV.II.4-13 zeigt die Au4f- und C1s-Detailspektren, welche vor und nach der UV-Bestrahlung der Proben aufgenommen wurden.

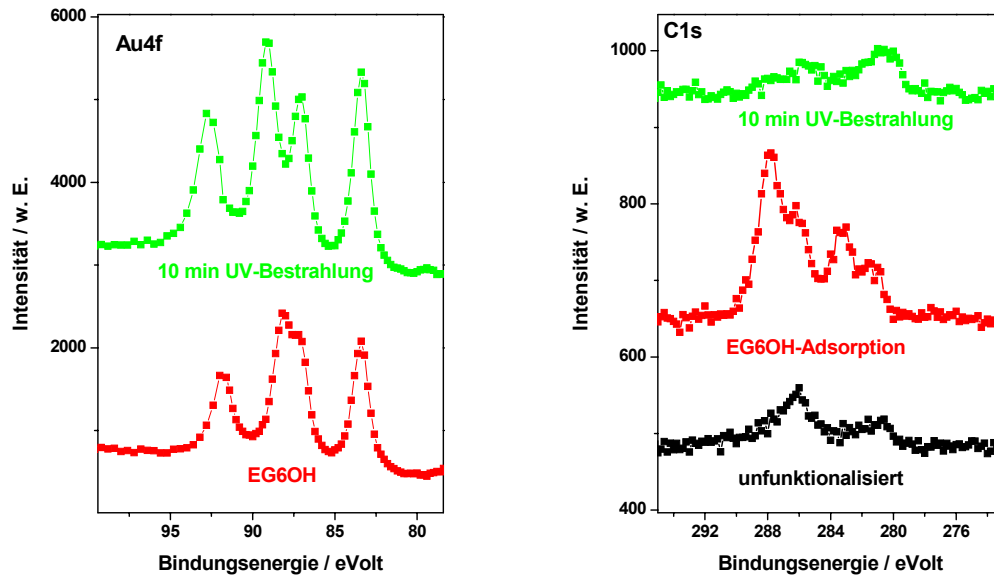


Abb. IV.II.4-13: Au4f- und C1s-Detailspektren; aufgenommen vor (schwarz) und nach (rot) Adsorption von EG6OH sowie nach einer 10-minütigen UV-Bestrahlung (grün) der funktionalisierten Oberflächen.

Die Bestrahlung der Oberflächen verursacht einen deutlichen Anstieg der Au4f-Intensität, welche auf einen effektiven Abbau der zuvor adsorbierten EG6OH-Monolage zurückgeführt werden kann. Ebenfalls erkennbar ist eine Zunahme der Ladungsaufspaltung nach dem Bestrahlungsprozess, welche auf einen mit dieser Behandlung verbundenen Austritt von Photoelektronen zurückgeführt werden kann. Die C1s-Intensität nimmt dagegen nach der UV-Behandlung drastisch ab; allerdings verbleibt ein kleiner Restbetrag an C1s-Alkyl-Intensität. XP-Aufnahmen von unfunktionalisierten Oberflächen zeigten selbst nach mehrstündiger UV-Bestrahlung stets einen ähnlich großen Restbetrag an C1s-Alkyl-Intensität. Es wird vermutet, dass dieser auf organische Verbindungen zurückzuführen ist, welche bei der Herstellung der Nanopartikeloberflächen eingesetzt wurden (Thioglykolat, PEI) und sich noch unter der oberen Goldbeschichtung befinden. Sie sind somit durch die beschriebene Ozon-Behandlung nicht entfernbar und leisten einen inhärenten Beitrag zur C1s-Alkyl-Intensität.

Die Abbildung IV.II.4-14 zeigt die nach Adsorption von EG17NH₂ aufgenommenen XP-Spektren.

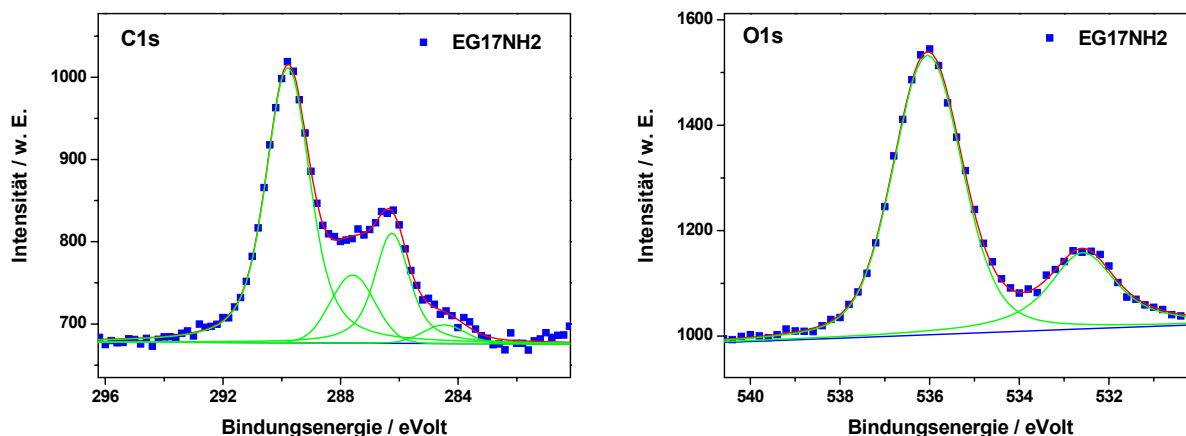


Abb. IV.II.4-14: C1s- (links) und O1s-Detailspektrum (rechts); aufgenommen nach Re-Funktionalisierung der UV-bestrahlten Nanopartikeloberflächen mit dem Thiol EG17NH₂.

Die gesamte C1s-Intensität beträgt 1370 Einheiten; nach der EG6OH-Adsorption betrug sie 1025 Einheiten. Durch Anpassung der Spektren wurde ein Ether-C1s/O1s-Verhältnis von 2,06 erhalten, das mit dem Sollwert übereinstimmt; die Ladungsaufspaltung beträgt 3,4 eV. Die XP-Spektren zeigen somit, dass die Oberflächen durch die UV-Behandlung in ausreichendem Maße gereinigt werden, um für anschließende Funktionalisierungen unter Ausbildung selbstaggregierender Monolagen verwendet werden zu können.

Nach Einführung des Linkermoleküls Glutardialdehyd wurden die Probenspots der Sensorplatte mit 2 verschiedenartig fluoreszierenden Antikörpern funktionalisiert. Hierzu wurden der grün fluoreszierende anti-Maus-Antikörper **AlexaFluor® 546** und der rot fluoreszierende anti-Maus-Antikörper **AlexaFluor® 647** verwendet. Die XP-Spektren dieser Funktionalisierungsstufe sind in der Abbildung IV.II.4-15 gezeigt.

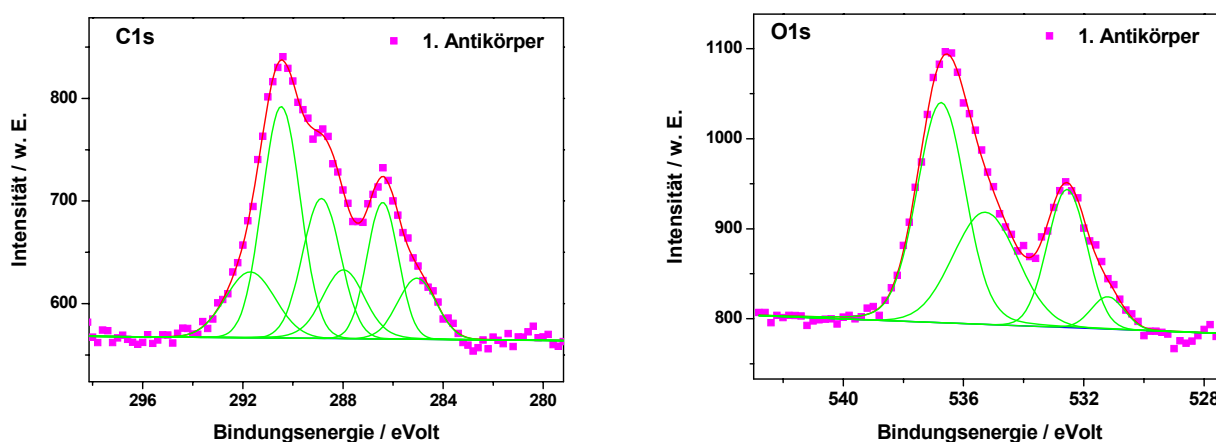
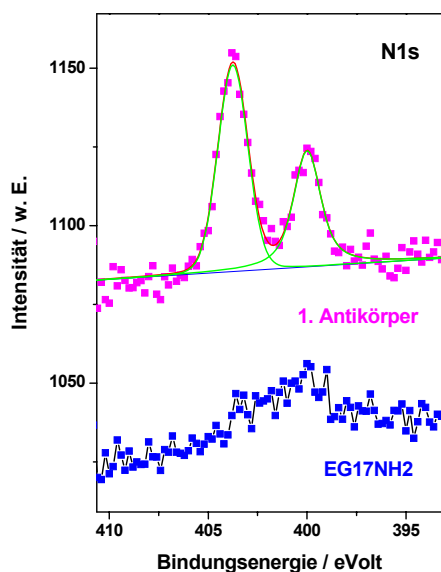


Abb. IV.II.4-15: Nach Bindung von Antikörpern an die EG17NH₂-terminierten Nanopartikeloberflächen aufgenommene C1s- (links) und O1s-Detailspektren (rechts).

Nach Bindung der Antikörper nimmt die gesamte Ether-C1s-Intensität von 1260 auf 635 Einheiten ab; die gesamte C1s-Intensität der bei 285,1 (C-N) und 288,3 eV (C=O) auftretenden Protein-Signale beträgt dagegen 680 Einheiten. Die Ether-O1s-Intensität wird ebenfalls von 1529 auf 770 Einheiten reduziert; auch hier entstehen nach Bindung der Proteine zusätzliche Signallagen deren Intensität sich auf 382 Einheiten beläuft. Die durch Anpassung der Signale ermittelte Ladungsaufspaltung beträgt etwa 3,9 eV und führt zu einem Ether-C1s-O1s-Verhältnis von 2,06, das dem Sollwert entspricht.



Die N1s-Spektren sind in der Abbildung IV.II.4-16 dargestellt. Nach kovalenter Bindung des Antikörpers ist ein deutlicher Anstieg der N1s-Intensität auf 211 Einheiten erkennbar, welcher den Stickstoffatomen der gebundenen Biomoleküle zuzuordnen ist.

Abb. IV.II.4-16:

N1s-Detaillenspektrum des EG17NH₂-terminierten Basisfilms (blau) und angepasstes N1s-Spektrum nach Bindung des fluoreszenzmarkierten Antikörpers (magenta).

Über die Intensitäts-Abschwächung der Au-Substratlage wurden die Schichtdicken der jeweiligen Adsorbatlagen bestimmt. Diese sind zusammen mit den anhand der LSPR-Messungen erhaltenen Werten in der Tabelle IV.II.4-4 aufgeführt.

	XPS	LSPR
Stufe	Schichtdicke /Å	Schichtdicke /Å
EG6OH	12,65	11,25
UV	0	-0,37
EG17NH₂	41,73	39,33
1. Antikörper	63,58	73,03

Tab. IV.II.4-4: Röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelte und anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechnete Schichtdicken der angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Es ergibt sich insgesamt eine gute Übereinstimmung zwischen den mittels unterschiedlicher Methoden erhaltenen Schichtdicken. Im Bereich höherer Schichtdicken werden diese jedoch röntgenphotoelektronenspektroskopisch unterschätzt; LSPR-spektroskopisch erhält man hier höhere Schichtdicken.

Fluoreszenzbilder

Die Abb IV.II.4-17 zeigt die nach Kopplung der Antikörper aufgenommenen Fluoreszenzbilder. Die einzelnen Probenspots der Platte wurden mit rot (AlexaFluor® 647) und grün (AlexaFluor® 546) fluoreszierenden Antikörpern funktionalisiert.

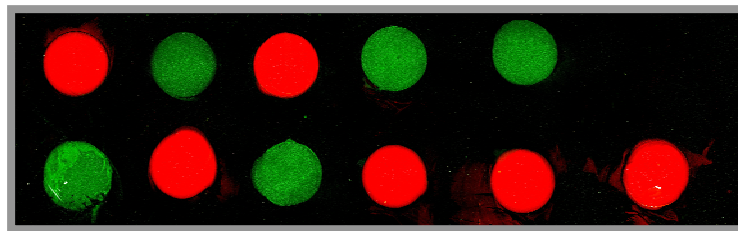


Abb. IV.II.4-17: Fluoreszenzbild. Aufgenommen nach Re-Funktionalisierung der Nanopartikeloberflächen mit EG17NH₂ und kovalenter Bindung der rot (AlexaFluor® 647) und grün (AlexaFluor® 546) fluoreszierenden Antikörper an die Nanopartikelspots.

Das erhaltene Muster zeigt deutlich, dass die Funktionalisierungen erfolgreich waren.

Interpretation und Fazit

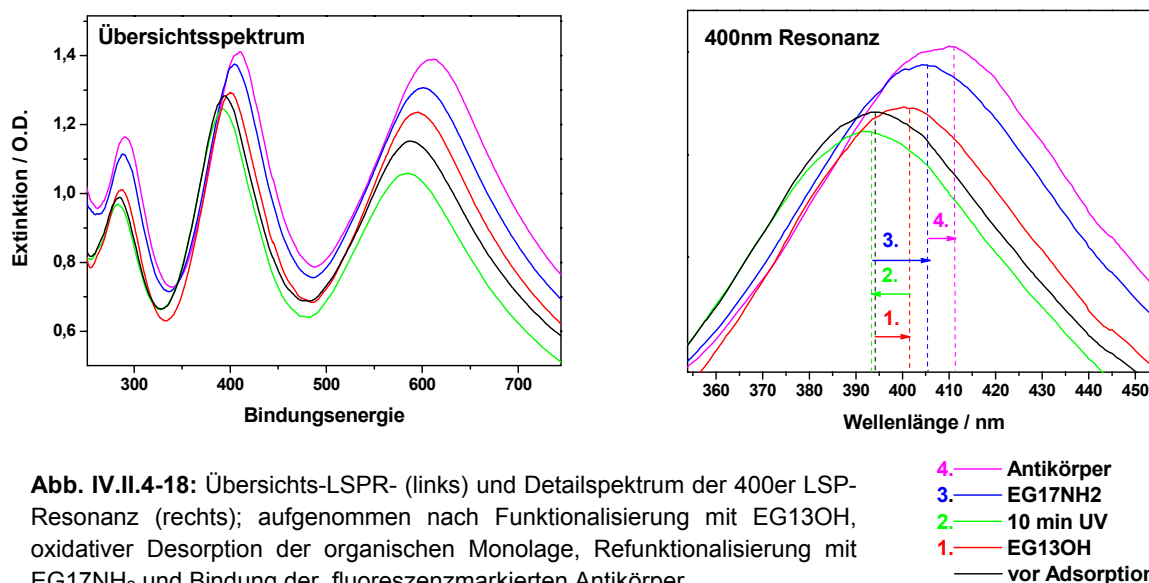
Anhand der beschriebenen Versuche konnte nachgewiesen werden, dass die mit einer organischen Monolage beschichteten Sensoroberflächen durch eine Ozon-Behandlung in ausreichendem Maße oxidativ gereinigt werden, um erneut in Bindungsstudien, insbesondere unter Ausbildung selbstaggregierender Monolagen eingesetzt werden zu können. Sie können daher im Prinzip auf einfache Weise sowie ohne Verlust an Sensitivität und einer Minderung der Bindungskapazität in mehrfachen Anwendungen eingesetzt werden.

Desorption von EG13OH, Refunktionalisierung mit EG17NH₂ und Integration von Antikörpern

Die Funktionalisierungsschritte entsprechen denen der Abbildung IV.II.4-10 mit der Ausnahme, dass zunächst eine Monolage des polymeren Ethylenglykothiois EG13OH anstatt des oligomeren EG6OH adsorbiert wurde (1). Diese wurde ebenfalls durch eine 10 minütige UV-Bestrahlung oxidativ entfernt (2) und die Sensoroberflächen anschließend mit dem Thiol EG17NH₂ funktionalisiert (3); nach Einführung des Linkers Glutardialdehyd wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper angebunden (4).

LSPR-Messungen

Nach jeder der Funktionalisierungsstufen (1-4) wurden LSPR-Spektren aufgenommen und die Position der Extinktionsmaxima bestimmt. Ein typisches Übersichtsspektrum und der Detailausschnitt der 400er Resonanz sind in der Abb. IV.II.4-18 gezeigt.



In der Tabelle IV.II.4-5 sind die auf die jeweilige Vorstufe bezogenen Verschiebungsbeträge aufgeführt; sie entsprechen einer Mittelwertbildung der bei einer Auswertung von 6 bis max. 12 Spektren verschiedener Nanopartikelspots erhaltenen Resonanzverschiebungen.

Stufe	LSPR bei 300 nm		LSPR bei 400 nm		LSPR bei 600 nm	
	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>	$\Delta\lambda_{max}$	<i>SD</i>
EG13OH	2,02	1,29	4,63	1,14	5,13	0,84
UV	-2,52	1,32	-6,35	0,91	-7,11	1,70
EG17NH2	5,66	0,80	10,24	1,16	16,06	1,42
1AK	1,84	0,64	4,60	0,26	8,23	0,98

Tab. IV.II.4-5: Mittlere LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm und zugehörige Standardabweichung für die angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Auch hier führt die UV-Bestrahlung zu einer Rückverschiebung in Richtung der Resonanzposition des unfunktionalisierten Zustandes; im Vergleich zu den Ergebnissen, die bei einer Voradsorption von EG6OH erhalten wurden, wird hier jedoch ein etwas zu großer backshift festgestellt. Dieser könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, dass sich die Oberflächen bereits vor der EG13OH-Adsorption durch geringfügige Oberflächen-Verunreinigungen auszeichneten, die durch die UV-Bestrahlung ebenfalls entfernt werden konnten. Die anschließende EG17NH2-Adsorption führt zu hohen Verschiebungswerten in den längerwelligen Bereich.

Zur quantitativen Auswertung der LSPR-Daten wurde die Resonanzlinie bei etwa 400 nm herangezogen. Die normierten Verschiebungsbeträge sind in der Tabelle IV.II.4-6 aufgeführt.

Stufe	LSPR bei 300 nm	LSPR bei 400nm	LSPR bei 600 nm
	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$	$(\Delta\lambda_{max})_{norm}$
EG13OH	1	2,29	2,54
UV	-1	-2,52	-2,82
EG17NH2	1	1,81	2,84
1. Antikörper	1	2,51	4,49

Tab. IV.II.4-6: Auf die Verschiebung der 300er-Resonanz normierte LSPR-Verschiebungen der LSP-Resonanzen bei 300, 400 und 600 nm.

Die Ergebnisse der Tabelle zeigen auch hier einen ähnlichen Zusammenhang zwischen den Sensor-Sensitivitäten der 3 LSPR-Resonanzen.

Mit Hilfe der Eichwertfaktoren aus Abschnitt 2 wurden Massenbelegung und Schichtdicke der jeweiligen Adsorbatlagen ermittelt. Die berechneten Werte sind in der Tabelle IV.II.4-7 aufgeführt.

<i>Stufe</i>	<i>Schichtdicke</i> /Å	<i>Massenbelegung</i> / ng/cm ²
EG13OH	18,84	162,14
UV	-25,87	-222,73
EG17NH2	41,71	359,09
1. Antikörper	18,73	161,2

Tab. IV.II.4-7: Anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechneter und mit den angegebenen Funktionalisierungen verbundener Zuwachs an Schichtdicke und Massenbelegung.

Von jeder Stufe wurden zur eindeutigen Charakterisierung zusätzlich XP-Spektren aufgenommen.

Röntgenphotoelektronenspektroskopie

In der Abb. IV.II.4-19 sind die XP-Spektren dargestellt, welche nach der Beschichtung der Oberflächen mit einer EG13OH-Monolage aufgenommen wurden.

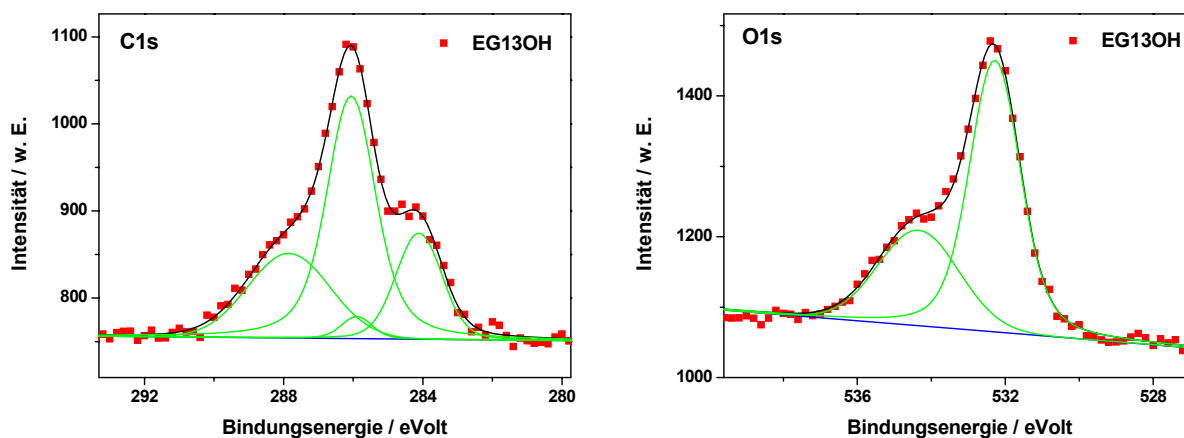


Abb. IV.II.4-19: Angepasste C1s- (links) und O1s-Detailspektren (rechts); aufgenommen nach Funktionalisierung der Nanopartikeloberflächen mit EG13OH.

Bei 284,1 eV werden die C1s-Alkyl-Atome detektiert und bei 286,1 eV die C1s-Ether-Atome. Die Ladungsaufspaltung beträgt im gezeigten C1s-Detailspektrum 1,8 eV.

Den O1s-Ether-Atomen entspricht die Signallage bei 532,3 eV; die Ladungsaufspaltung beträgt hier 2,0 eV. Das Ether-C1s/O1s-Verhältnis der gezeigten Anpassung stimmt mit dem Sollwert von 1,93 überein.

Nach der UV-Bestrahlung der Oberflächen wurden ebenfalls XP-Spektren aufgenommen. In der Abb. IV.II.4-20 sind die Auf4f- und C1s-Detailspektren dargestellt, welche vor und nach der UV-Bestrahlung der Oberflächen aufgenommen wurden.

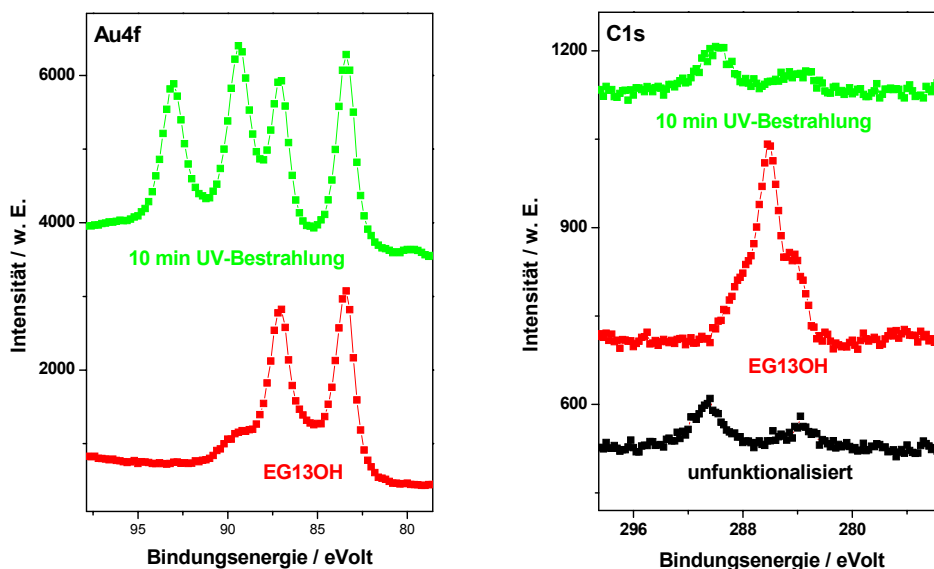


Abb. IV.II.4-20: Au4f- und C1s-Detailspektren; aufgenommen vor (schwarz) und nach (rot) Adsorption von EG13OH sowie nach einer 10-minütigen UV-Bestrahlung (grün) der funktionalisierten Oberflächen.

Auch hier ist nach dem Bestrahlungsprozess eine deutliche Zunahme der Au4f-Intensität zu verzeichnen, welche auf einen Abbau der adsorbierten EG13OH-Monolage zurückzuführen ist; ebenfalls erkennbar macht sich ein Anstieg der Ladungsaufspaltung. Dagegen nimmt die C1s-Intensität nach der UV-Behandlung deutlich ab; allerdings verbleibt auch hier ein kleiner Restbetrag an C1s-Alkyl-Intensität, der näherungsweise dem vor der EG13OH-Adsorption beobachteten Betrag entspricht. Es besteht die Vermutung, dass dieser auf organische Verbindungen zurückzuführen ist, welche sich noch unter der oberen Goldlage befinden und durch die UV-Bestrahlung nicht entfernt werden können.

Die Abbildung IV.II.4-21 zeigt die nach der Adsorption von EG17NH₂ aufgenommenen XP-Spektren.

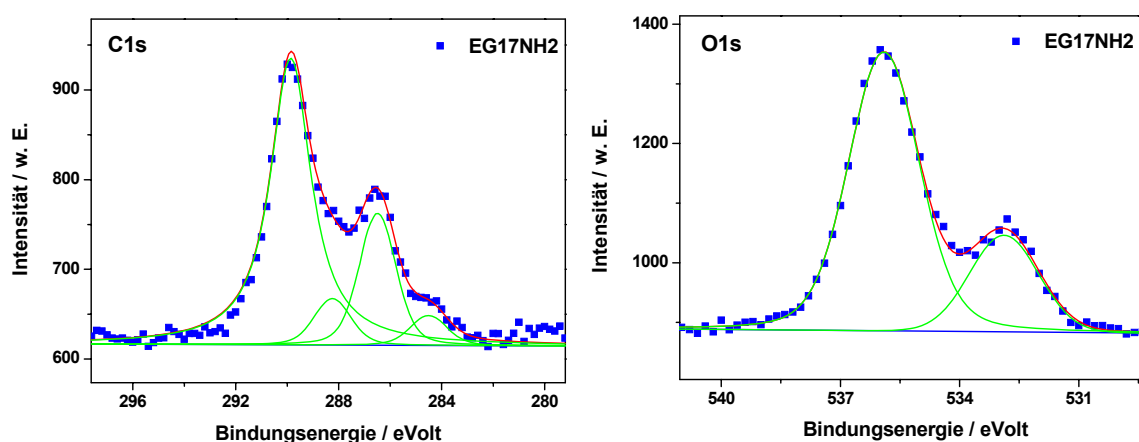


Abb. IV.II.4-21: C1s- (links) und O1s-Detailspektren (rechts); aufgenommen nach der Re-Funktionalisierung der UV-bestrahlten Nanopartikeloberflächen mit dem Thiol EG17NH₂.

Die gesamte C1s-Intensität beträgt 1399 Einheiten; nach der EG13OH-Adsorption betrug sie 1125 Einheiten. Die Spektrenanpassung ergibt ein Ether-C1s/O1s-Verhältnis von 2,06, das dem Sollwert entspricht; die durch Anpassung der Spektren ermittelte Ladungsaufspaltung beträgt bei der gezeigten Probe 3,4 eVolt. Daher kann auch hier gefolgert werden, dass die funktionalisierten Sensoroberflächen durch die UV-Bestrahlung in ausreichendem Maße oxidativ gereinigt werden, um für eine anschließende Beschichtung unter Ausbildung selbstaggregierender Monolagen verwendet werden zu können.

Nach Einführung des Linkermoleküls Glutardialdehyd wurden die Probenspots der Sensorplatte mit den rot bzw. grün fluoreszierenden Antikörpern **AlexaFluor® 647** und **AlexaFluor® 465** funktionalisiert. Die Abb. IV.II.4-22 zeigt die nach kovalenter Bindung der Antikörper aufgenommenen XP-Spektren.

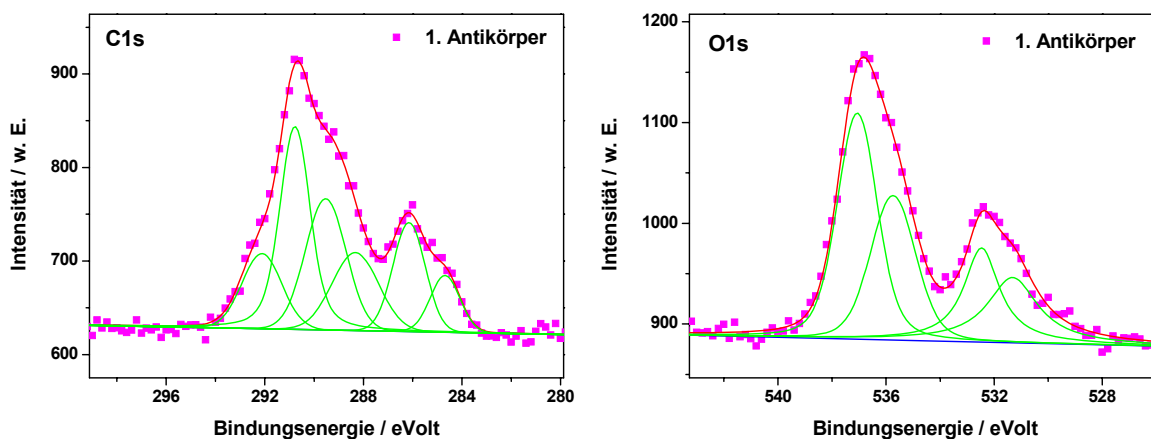


Abb. IV.II.4-22: C1s- (links) und O1s-Detailspektren (rechts); aufgenommen nach Bindung von Antikörpern an die EG17NH₂-terminierten Nanopartikeloberflächen.

Nach Kopplung der Antikörper nimmt die gesamte Ether-C1s-Intensität von 1230 auf 580 Einheiten ab; die gesamte C1s Intensität der zusätzlichen Protein-C1s-Signale bei 285,1 (C-N) und 288,3 eVolt (C=O) beträgt dagegen 740 Einheiten. Die Ether-O1s-Intensität wird ebenfalls von 1490 auf 702 Einheiten reduziert; bedingt durch die Bindung der Antikörper entstehen neue Signallagen, deren Gesamtintensität sich auf 556 Einheiten beläuft. Die Anpassung der Spektren ergibt eine Ladungsaufspaltung von 4,4 eVolt; das Ether-C1s-O1s-Verhältnis der gezeigten Anpassung entspricht dem Sollwert von 2,06.

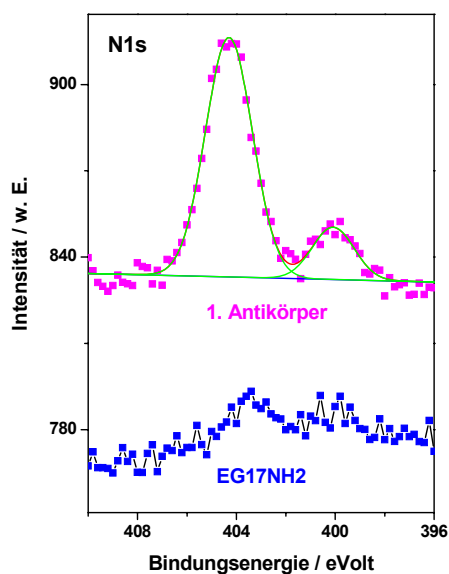


Abb. IV.II.4-23: N1s-Detailsspektrum des EG17NH₂-terminierten Basisfilms (blau) und angepasstes N1s-Spektrum nach Bindung der fluoreszenzmarkierten Antikörper (magenta).

Die N1s-Spektren sind in der Abbildung IV.II.4-23 gezeigt. Nach kovalenter Bindung des Antikörpers ist ein deutlicher Anstieg der N1s-Intensität auf 238 Einheiten erkennbar, der den Stickstoffatomen dieser Biomoleküle zu zuordnen ist.

Nach Gleichung (104) wurden über die Intensitätsabschwächung der Au-Substratlage die Schichtdicken der jeweiligen Adsorbatlagen bestimmt. Diese sind zusammen mit den anhand der LSPR-Messungen erhaltenen Werten in der Tabelle IV.II.4-8 aufgeführt.

Stufe	XPS	LSPR
	Schichtdicke / Å	Schichtdicke / Å
PEG13OH	21,74	18,84
UV	0	-7,04
EG17NH2	42,26	41,71
1. Antikörper	55,2	60,45

Tab. IV.II.4-8: Röntgenphotoelektronenspektroskopisch ermittelte und anhand der LSPR-Verschiebung der 400er Resonanz berechnete Schichtdicken der angegebenen Funktionalisierungsstufen.

Die ermittelten Werte stimmen gut überein. Im Bereich höherer Schichtdicken werden diese jedoch XP-spektroskopisch geringfügig unterschätzt; LSPR-spektroskopisch erhält man hier höhere Beträge. Der lineare Antwortbereich der LSPR-aktiven Sensoroberflächen ist somit in dem betrachteten Bereich von Schichtdicken noch nicht überschritten worden.

Fluoreszenzbilder

Die Abbildung IV.II.4-24 zeigt die Fluoreszenzbilder, welche nach Bindung der Antikörper aufgenommen wurden. Die einzelnen Probenspots der Platte wurden mit rot (AlexaFluor® 647) und grün (AlexaFluor® 546) fluoreszierenden Antikörpern funktionalisiert.

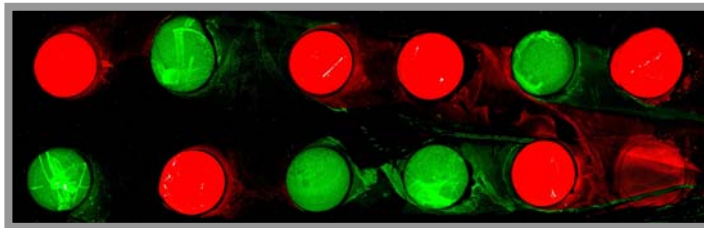


Abb. IV.II.4-24: Fluoreszenzbild. Aufgenommen nach Re-Funktionalisierung der Nanopartikeloberflächen mit EG17NH₂ und kovalenter Bindung der rot (AlexaFluor® 647) und grün (AlexaFluor® 546) fluoreszierenden Antikörper an die Nanopartikelspots.

Das erhaltene Fluoreszenzbild stimmt mit dem Funktionalisierungsmuster der Sensoroberflächen überein.

Interpretation und Fazit

Die Ergebnisse bestätigen somit die Schlussfolgerungen, welche bereits bei den Versuchen unter Voradsorption von EG6OH gezogen wurden.

Bei der hier verwendeten Erstbeschichtung handelt es sich jedoch um ein Polymer, für das eine etwa 9 Å höhere Schichtdicke als für das oligomere EG6OH erhalten wurde. Auch diese fast doppelt so dicke organische Beschichtung konnte durch die Ozon-Behandlung effektiv abgebaut werden.

Fazit zur Refunktionalisierung nach oxidativer Desorption von Thiol-Monolagen

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die LSPR-aktiven Sensoroberflächen durch die UV-Bestrahlung in ausreichendem Maße oxidativ gereinigt werden, um für anschließende Funktionalisierungen unter Ausbildung selbstaggregierender Monolagen verwendet werden zu können. In den nachfolgenden Beschichtungsversuchen konnten hohe Adsorptionsraten der eingesetzten Verbindungen erzielt werden; Auswirkungen der UV-Bestrahlung auf die LSPR-Spektren und die Sensorsensitivitäten (bzw. die Verschiebungsbeträge der LSP-Resonanzen) konnten hierbei nicht festgestellt werden. Die Sensoroberflächen können daher auf einfache Weise (10-minütige UV-Bestrahlung in Sauerstoffatmosphäre) und ohne Verlust an Aktivität mehrfach verwendet werden.

4.3 Photochemische Strukturierung und anschließende Biofunktionalisierung

Es wurden EG31NH₂-terminierte Oberflächen erzeugt, welche durch UV-Bestrahlung über Photomasken strukturiert wurden, indem die organische Monolage an den bestrahlten Regionen oxidativ abgebaut wird. Hierbei wurden 2 verschiedene Photomasken verwendet, die in der Abbildung IV.II.4-25 schematisch dargestellt sind.

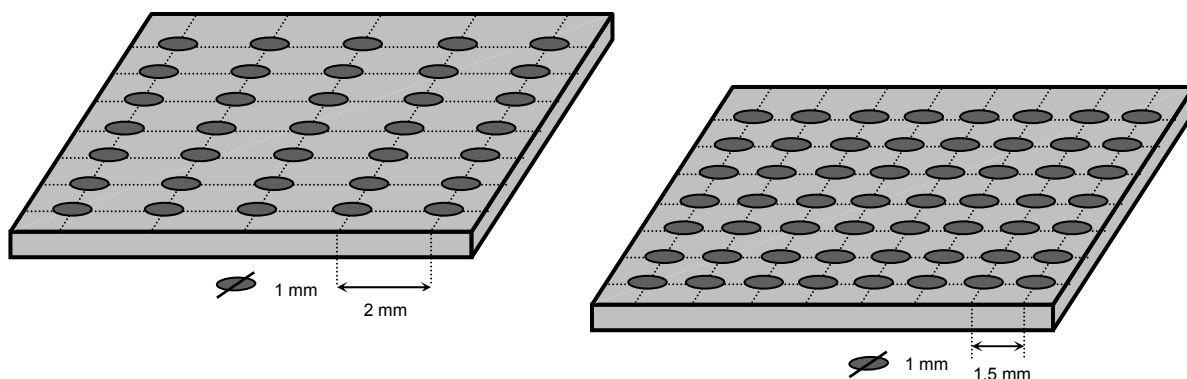


Abb. IV.II.4-25: Schematische Zeichnung der verwendeten Photomasken. Maske A: Lochdurchmesser 1 mm, Loch-zu-Loch-Abstand 1 mm. Maske B: Lochdurchmesser 1 mm, Loch-zu-Loch-Abstand 0,5 mm.

Bei der Maske A (s. Abb. IV.II.4-25 links) beträgt sowohl der Lochdurchmesser als auch der Loch-zu-Loch-Abstand 1 mm. Die Maske B besitzt ebenfalls einen Loch-Durchmesser von 1 mm auf; der Loch-zu-Loch-Abstand beträgt hier jedoch nur 0,5 mm. Nach „Einbrennen“ dieser Muster wurden die Oberflächen in Abständen von 50 μm abgerastert und LSPR-Spektren von jedem Punkt aufgenommen, um ein LSPR-Bild von der strukturierten Oberfläche zu erzeugen (LSPR-Imaging).

Die erzeugten Muster wurden anschließend biofunktionalisiert, um auf diesem Wege visualisiert werden zu können. Hierzu wurden an die aminoterminalen Strukturen entweder markierte Antikörper oder Peptidepitope gebunden, die von epitopspezifischen Antikörpern erkannt und mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern umgesetzt wurden. Die bestrahlten und somit unfunktionalisierten Regionen der Oberflächen können hierbei entweder mit dem Protein BSA¹² blockiert oder mit dem proteinresistenten PEG-Thiol EG22OH aufgefüllt werden, um eine unspezifische Antikörper-Adsorption an diesen Stellen zu unterbinden. Die Visualisierung der erzeugten Strukturen erfolgte durch Aufnahme von Fluoreszenzbildern.

¹² BSA (*engl.*) = Bovine serum albumine

4.3.1 Kopplung von Antikörpern nach Blockierung mit BSA

In der Abbildung IV.II.4-26 sind die einzelnen Präparationsschritte schematisch dargestellt.

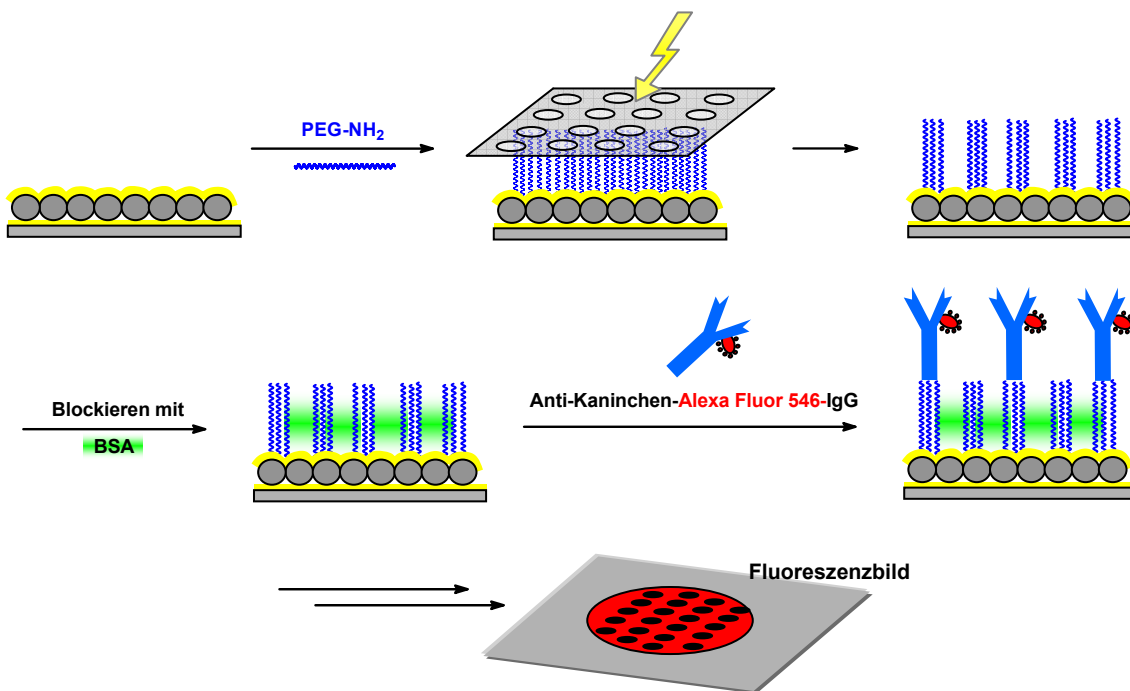


Abb. IV.II.4-26: Schematische Darstellung der photochemischen Strukturierung auf den Nanopartikeloberflächen aufgebracht, organischer Monolagen durch UV-Bestrahlung und oxidativer Desorption an den exponierten Stellen, blockieren der unfunktionalisierten Stellen mit BSA und Visualisierung der erzeugten Struktur durch Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper.

Nach der UV-Bestrahlung der aminoterminierten Oberflächen wurden zunächst LSPR-Bilder aufgenommen; anschließend wurde die erzeugte Struktur auf biochemischem Wege visualisiert. Hierzu wurde zunächst das Linkermolekül Glutardialdehyd eingeführt und nach einer Blockierung des unfunktionalisierten Lochmusters durch eine Behandlung der Oberflächen mit einer 1%-igen BSA-Lösung der fluoreszenzmarkierte anti-Kaninchen-Antikörper **Alexa-Fluor® 647** kovalent gebunden.

Fluoreszenzscanning

Die aufgenommenen Fluoreszenzbilder sind in der Abbildung IV.II.4-27 gezeigt.

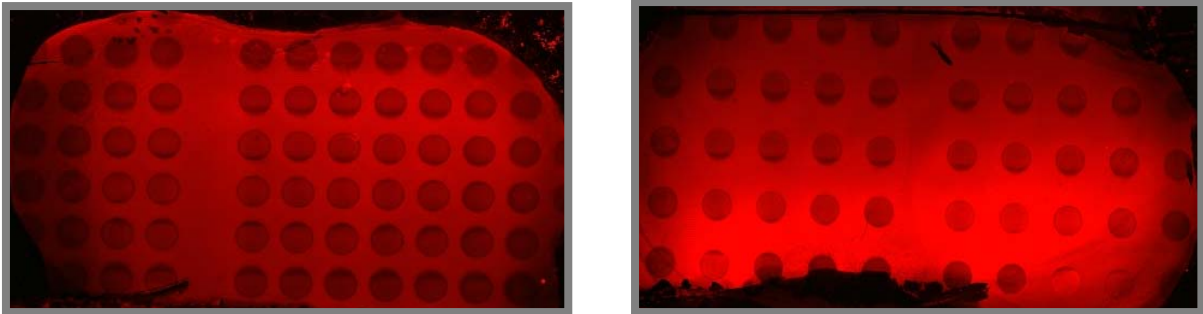


Abb. IV.II.4-27: Fluoreszenzbilder; aufgenommen nach Sättigung der unfunktionalisierten Stellen mit BSA und Bindung des Anti-Kaninchen **Alexa Fluor® 647**-Antikörpers an die photochemisch strukturierten EG31NH₂-terminierten Nanopartikeloberflächen.

Sie entsprechen dem Negativ der bei den Peptid-Arrays erzeugten Fluoreszenzbilder (vgl. Abb. IV.II.4-2 und -4). Die bestrahlten Regionen, welche mit BSA blockiert wurden, erscheinen als schwarz gefärbte Löcher, da der aminoterminierte Film hier oxidativ entfernt wurde und diese Stellen durch die BSA-Behandlung bereits teilweise abgesättigt wurden, so dass eine unspezifische Adsorption der fluoreszenzmarkierten Antikörper weitgehend unterbunden wird. An den unbestrahlten, aminoterminierten Stellen kann dieser dagegen kovalent gebunden werden; diese Bereiche erscheinen daher rot fluoreszierend.

Die erzeugten Muster sind jedoch nicht besonders scharf abgegrenzt. Es wird vermutet, dass die Behandlung der Oberflächen mit der BSA-Lösung nicht ausreicht, um eine unspezifische Adsorption an den unbeschichteten Stellen vollständig zu unterbinden; ebenfalls denkbar wäre an dieser Stelle jedoch auch ein unvollständiger Abbau der organischen Monolage. Letztere Vermutung konnte jedoch durch Versuche ausgeschlossen werden, in denen die Lochmuster vor Kopplung der Antikörper mit einem proteinresistenten PEG-Thiol (EG22OH) aufgefüllt wurden; in diesen Versuchen konnte eine unspezifische Antikörper-Adsorption an den bestrahlten Stellen vollkommen unterdrückt werden (siehe Abschnitt 4.3.3). Restbestandteile der aminoterminierten Monolage liegen somit nicht vor.

LSPR-Imaging

In der Abbildung IV.II.4-28 sind die bei Bestrahlung über die Maske A (links) und B (rechts) erhaltenen LSPR-Bilder dargestellt; zum Vergleich ist ebenfalls ein Ausschnitt der von den Proben erhaltenen Fluoreszenzbilder gezeigt.

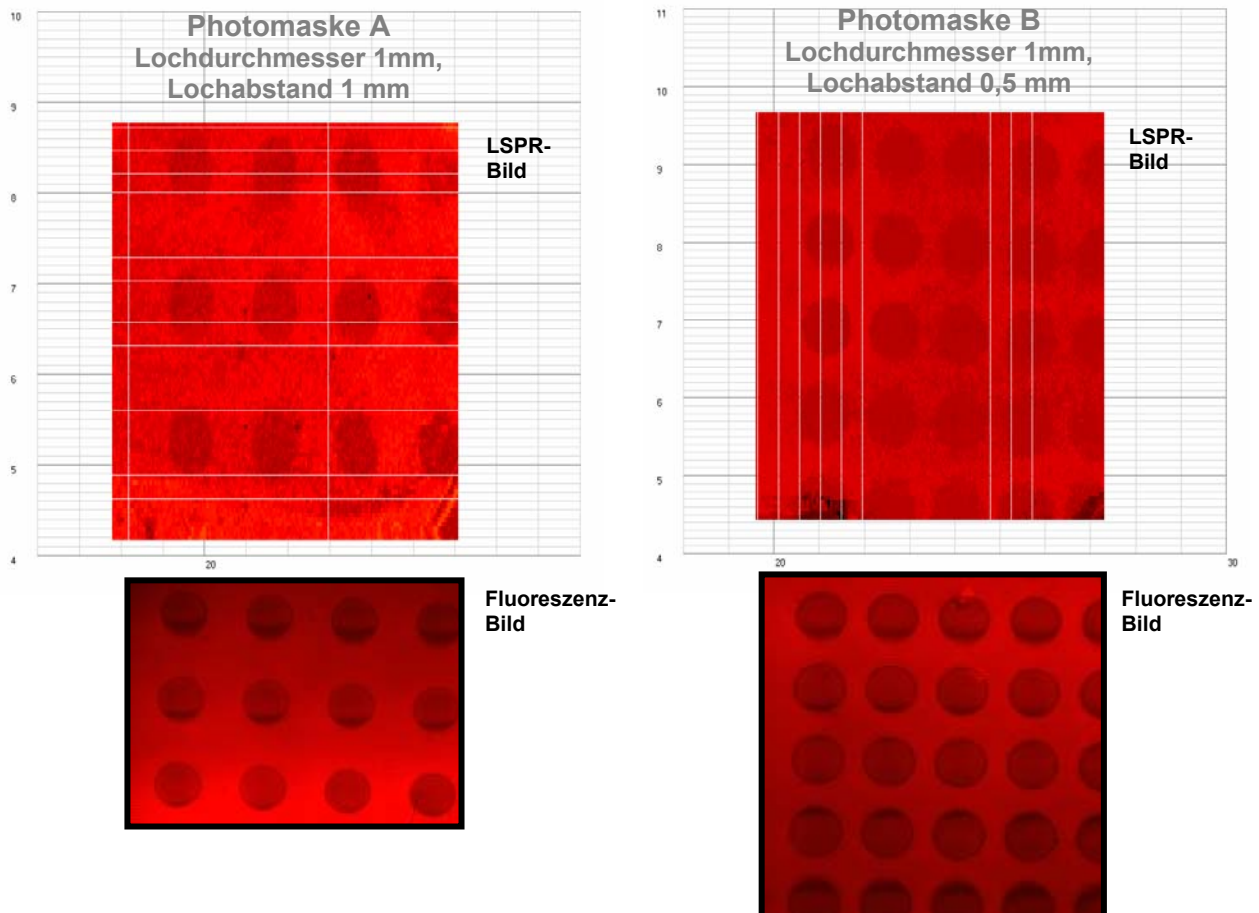


Abb. IV.II.4-28: LSPR- und Fluoreszenzbilder der photochemisch strukturierten und bio-funktionalisierten Nanopartikeloberflächen bei Verwendung der Photomaske A (links) und der Photomaske B (rechts).

Oben: LSPR-Bilder; aufgenommen nach der oxidativen Strukturierung.

Unten: Fluoreszenzbilder; aufgenommen kovalenter Bindung des Anti-Kaninchen **Alexa Fluor® 647**-Antikörpers an die photochemisch strukturierten EG31NH₂-Monolagen.

Die Farbintensität der gezeigten Bilder korreliert mit dem Betrag der LSPR-Verschiebung; je höher die Resonanzverschiebung in den längerwelligen Bereich ist, um so heller werden die betreffenden Bereiche dargestellt. Die hellroten Zwischenräume sind daher gegenüber den dunkleren Lochmustern zu höheren Wellenlängen verschoben. Die weißen Linien in den Abbildungen sind Artefakte der bildlichen Darstellung der prozessierten Daten.

Die Fluoreszenz- und LSPR-Bilder stimmen für beide Masken sehr gut überein. Die Ausmaße der Maske A (Lochdurchmesser 1 mm; Loch-zu-Loch-Abstand 2 mm) und B (Loch-

durchmesser 1 mm; Loch-zu-Loch–Abstand 1,5 mm), insbesondere die Halbierung der Lochabstände der B-Maske sind in den aufgenommenen LSPR-Bildern deutlich zu erkennen.

Die Auswertung der LSRP-Einzelspektren ergab, dass die Resonanzposition der funktionalisierten Zwischenräume der in Abbildung IV.II.4-28 links gezeigten Probe (Photomaske A) im Vergleich zu den bestrahlten Regionen um durchschnittlich 11 nm in den längerwelligen Bereich verschoben ist. Mit Hilfe des in Abschnitt 2 ermittelten Eichwertfaktors von 3,8 Å/nm berechnet sich die Schichtdicke der mit dem Thiol EG31NH₂-funktionalisierten Zwischenräume somit zu etwa 42 Å.

Bei Verwendung der Photomaske B beträgt die Differenz bezüglich der Position der LSP-Resonanzen zwischen den bestrahlten und der unter der Photomaske befindlichen Regionen etwa 13 nm; somit besteht ein Schichtdicken-Unterschied zwischen diesen Regionen von etwa 49 Å.

4.3.2 Kopplung von Peptid-Epitopen nach Blockierung mit BSA

Auch hier wurden nach der UV-Bestrahlung der Oberflächen zunächst LSPR-Bilder aufgenommen. Anschließend wurde das Linkermolekül SMCC an die Aminogruppen der unbestrahlten Regionen gebunden und im folgenden Schritt das Peptidepitop 2 kovalent an diese Regionen gebunden. Zur Absättigung nicht-umgesetzter Linker-Funktionalitäten (Maleimido-Gruppen) wurden die Oberflächen anschließend mit einer Thioethanol-haltigen Lösung behandelt. Vor Umsatz mit dem epitopspezifischen Antikörper fand eine Behandlung mit BSA-Lösung statt, um eine unspezifische Proteinadsorption an den unfunktionalisierten Stellen zu verhindern. Anschließend wurde der Epitop2-spezifische anti-HA-Antikörper gebunden und folgend mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper **Alexa Fluor® 647** versetzt.

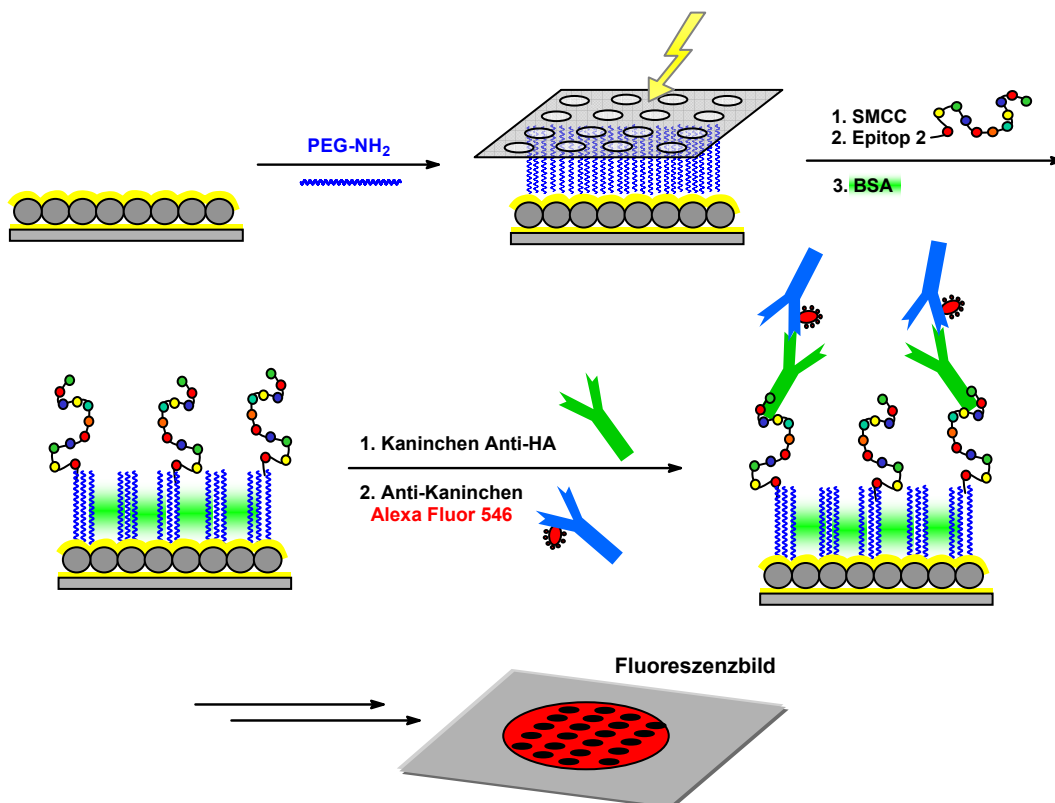


Abb. IV.II.4-29: Schematische Darstellung der photochemischen Strukturierung von E31NH₂-funktionalisierten Nanopartikeloberflächen durch UV-Bestrahlung und oxidativer Desorption an den exponierten Stellen, Kopplung von Peptid-Epitopen an die aminoterminierten Strukturen, Blockieren der unfunktionalisierten Stellen mit BSA und Visualisierung der erzeugten Struktur durch Bindung epitopspezifischer Erst- und fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper.

Fluoreszenzscanning

In der Abbildung IV.II.4-30 sind die Fluoreszenzaufnahmen gezeigt, welche bei einer Bestrahlung der Oberflächen über die Photomasken A (links) und B (rechts) und der anschließenden Bindung der Peptidepitope und Antikörper erhalten wurden.

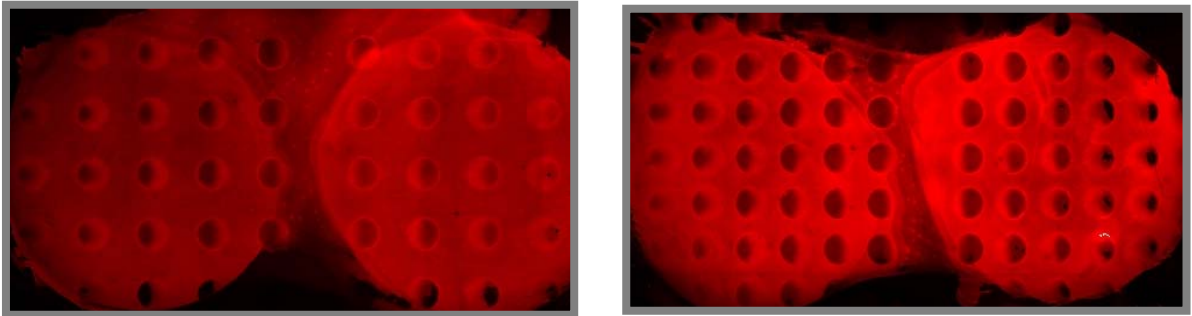


Abb. IV.II.4-30: Fluoreszenzbilder; aufgenommen nach Sättigung der unfunktionalisierten Stellen mit BSA und Bindung des Anti-Kaninchen **AlexaFluor® 647**-Antikörpers an die photochemisch strukturierten und Peptid-funktionalisierten EG31NH₂-terminierten Nanopartikeloberflächen.

Analog zu Abschnitt 4.3.1 führt die BSA-Behandlung der unfunktionalisierten Zwischenräume auch hier nur zu einer unvollständigen Absättigung, so dass eine unspezifische Adsorption der Antikörper auch an diesen Loch-Stellen stattfindet; die erzeugten Strukturen sind daher in den Fluoreszenz-Bildern nicht scharf abgegrenzt.

LSPR-Imaging

In der Abb. IV.II.4-31 sind die LSPR-Bilder gezeigt, welche von den EG31NH₂-terminierten Oberflächen nach der Bestrahlung über die Photomasken A (links) und B (rechts) erhalten wurden, dargestellt. Zum Vergleich ist ebenfalls ein Ausschnitt der von den biofunktionalisierten Oberflächen aufgenommenen Fluoreszenzbilder gezeigt.

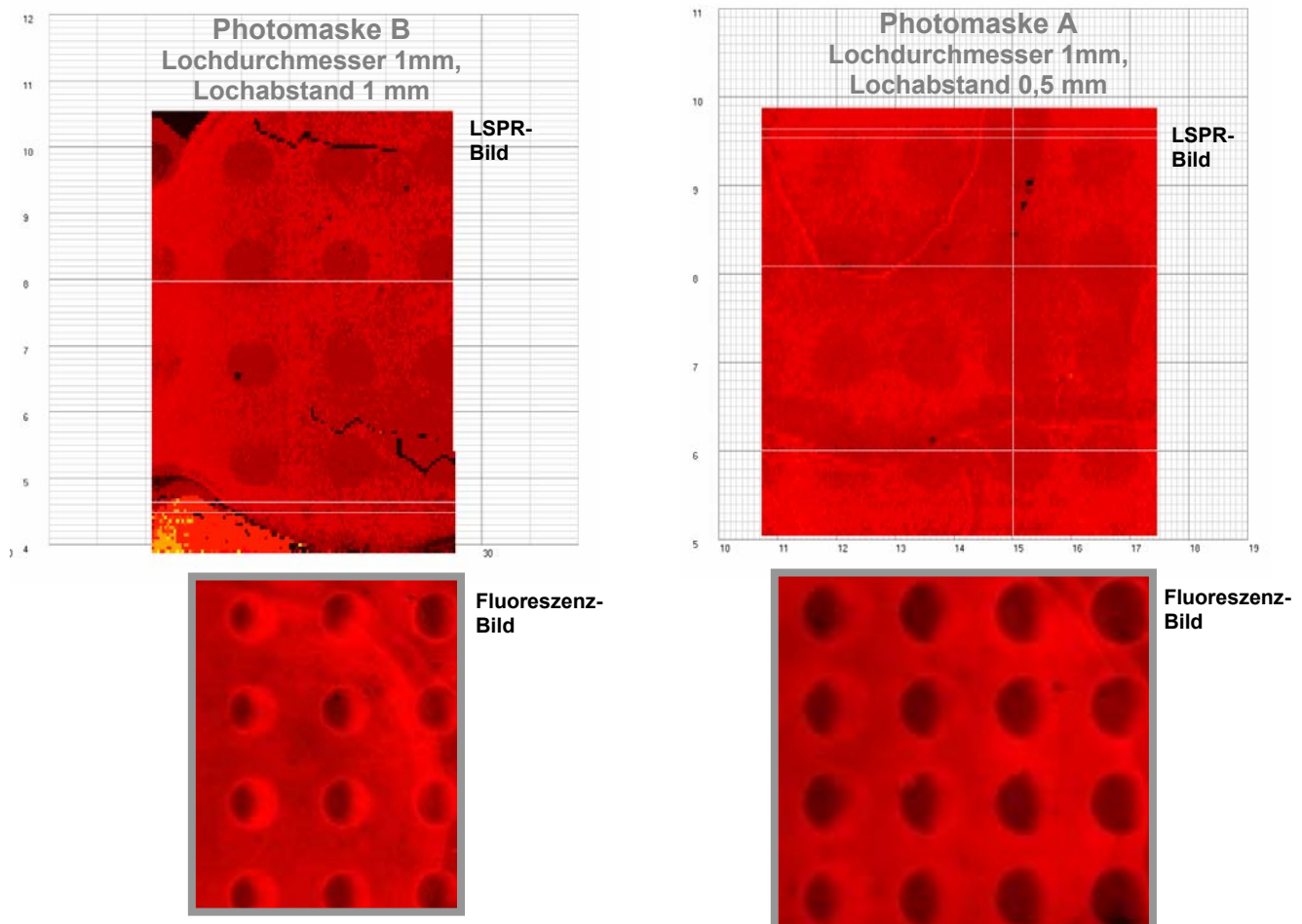


Abb. IV.II.4-31: LSPR- und Fluoreszenzbilder der photochemisch strukturierten und biofunktionalisierten Nanopartikeloberflächen bei Verwendung der Photomaske A (links) und Photomaske B (rechts).

Oben: LSPR-Bilder; aufgenommen nach der oxidativen Strukturierung.

Unten: Fluoreszenzbilder; aufgenommen nach kovalenter Bindung des Anti-Kaninchen **AlexaFluor® 647**-Antikörpers an die photochemisch strukturierten und mit Peptidpitopen funktionalisierten EG31NH₂-Monolagen.

Die unterschiedlichen Ausmaße beider Photomasken sind auch in diesen LSPR-Bildern zu erkennen. Die Strukturen sind allerdings weniger scharf abgegrenzt. Es wird vermutet, dass dies auf Probeninhomogenitäten zurückzuführen ist, welche zu einer lokalen Variation der Sensorsensitivitäten führen. Zwar ergeben die aufgenommenen Fluoreszenzbilder ebenfalls eine unscharfe Abgrenzung für die erzeugten Strukturen, diese ist jedoch auf eine unspezifische

sche Antikörper-Adsorption zurückzuführen, da die Behandlung der Oberflächen mit einer BSA-Lösung nicht ausreicht, um diese zu unterdrücken. Dies konnte bereits durch Versuche gezeigt werden, in denen die Zwischenräume mit dem proteinresistenten PEG-Thiol EG22OH funktionalisiert wurden und in denen sich eine wesentlich schärfere Abgrenzung ergab als bei einer Blockierung mit BSA-Lösung (s. Abs. 4.3.3).

Die Resonanzposition der funktionalisierten Zwischenräume der in Abb. IV.II.4-31 rechts gezeigten Probe (Photomaske A) ist im Gegensatz zu den bestrahlten und daher unfunktionalisierten Regionen um durchschnittlich 11 nm in den längerwelligen Bereich verschoben ist. Die Schichtdicke der mit dem Thiol EG31NH₂-beschichteten Zwischenräume liegt somit bei ungefähr 42 Å.

Bei Verwendung der Photomaske B beträgt die Differenz bezüglich der Position der LSP-Resonanzen zwischen den bestrahlten und der unter der Photomaske befindlichen Regionen etwa 34 nm; somit besteht ein Schichtdicken-Unterschied von etwa 37Å.

4.3.3 Kopplung von Antikörpern nach Refunktionalisierung mit EG22OH

In der Abbildung IV.II.4-32 sind die einzelnen Schritte dieses Ansatzes dargestellt.

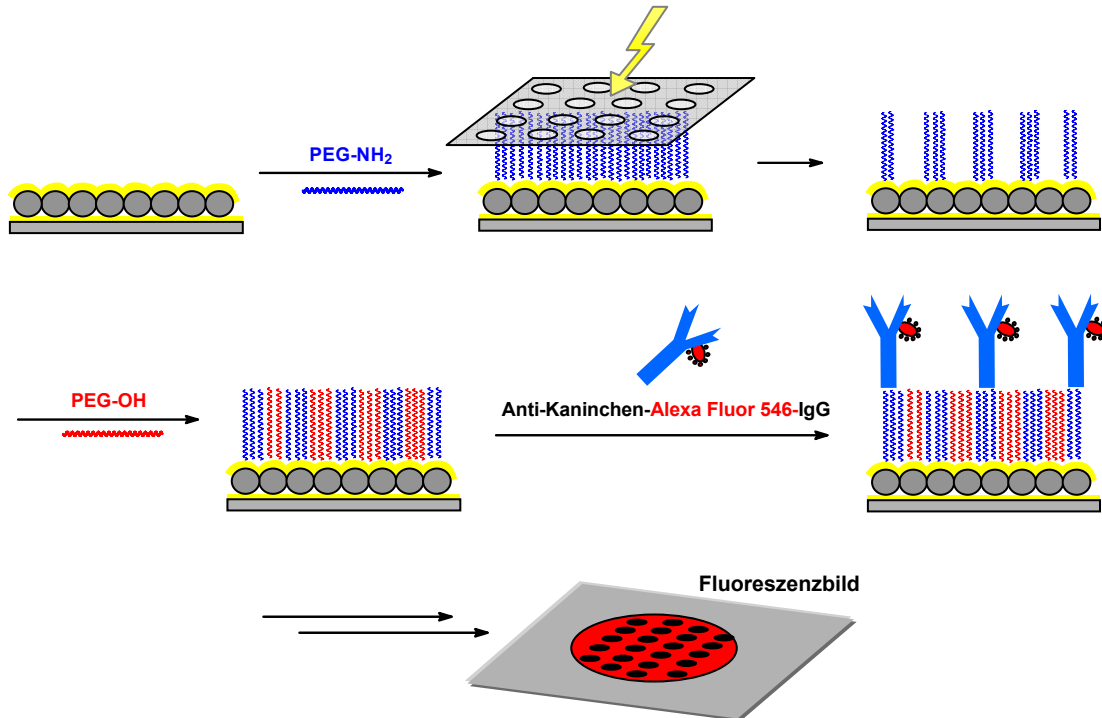


Abb. IV.II.4-32: Schematische Darstellung der photochemischen Strukturierung von E31NH₂-funktionalisierten Nanopartikeloberflächen durch UV-Bestrahlung und oxidativer Desorption an den exponierten Stellen, Refunktionalisierung der exponierten Stellen mit dem Thiol EG22OH und Visualisierung der erzeugten Strukturen durch Bindung fluoreszenzmarkierter Antikörper an die aminoterminierten Strukturen.

Nach der photochemischen Strukturierung der Oberflächen wurden auch hier zunächst LSPR-Bilder aufgenommen. Die Visualisierung der erzeugten Strukturen erfolgte über eine Kopplung fluoreszenzmarkierter Antikörper. Die bestrahlten und somit unfunktionalisierten Regionen wurden hierzu jedoch zunächst durch Adsorption des proteinresistenten PEG-Thiols EG22OH aufgefüllt. Nach Einführung des Linkermoleküls Glutardialdehyd wurde der fluoreszenzmarkierte anti-Kaninchen-Antikörper **Alexa Fluor® 647** kovalent gebunden.

Fluoreszenzscanning

Die Abbildung IV.II.4-33 zeigt die von den biofunktionalisierten Oberflächen aufgenommenen Fluoreszenzbilder.

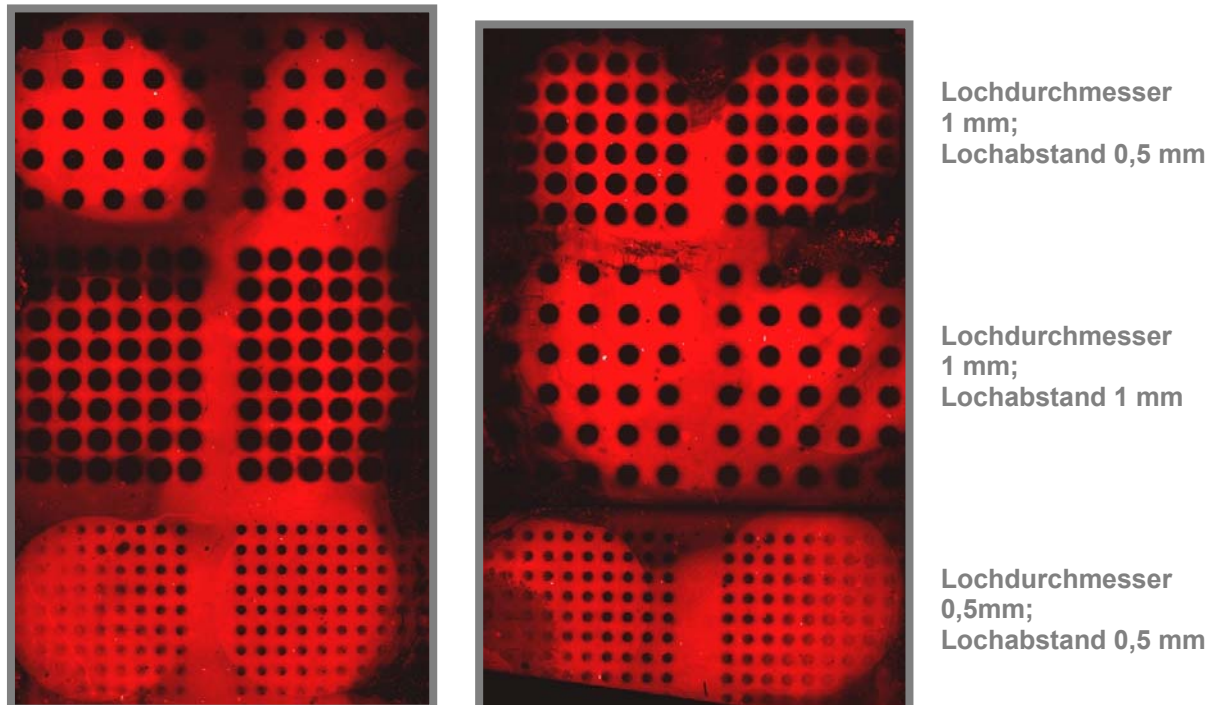


Abb. IV.II.4.33: Fluoreszenzbilder; aufgenommen nach Bindung des Anti-Kaninchen **AlexaFluor® 647**-Antikörpers an die photochemisch strukturierten EG31NH₂-Beschichtungen, nachdem die bestrahlten und somit unfunktionalisierten Regionen der Nanopartikeloberflächen mit dem Thiol EG22OH aufgefüllt wurden.

Die bestrahlten Flächen zeigen keinerlei Antikörper-Adsorption. Die UV-Behandlung muss demnach zu einem effektiven oxidativen Abbau der bestrahlten Regionen geführt haben, so dass diese Stellen mit dem proteinresistenten und OH-terminiertem PEG-Thiol funktionalisiert werden konnten.

Im Vergleich zu den in den Abb. IV.II.4-27 und -30 gezeigten Fluoreszenzbildern sind diese Strukturen wesentlich schärfer abgegrenzt. Es kann daher gefolgert werden, dass die unscharfen Strukturen auf eine unvollständige BSA-Absättigung dieser Bereiche zurückzuführen ist und die fluoreszenzmarkierten Antikörper daher auch an diesen Stellen adsorbieren. Beide Aufnahmen zeigen daher, wie wichtig es ist, eine unspezifische Adsorption zur eindeutigen Analyse von Bindungsmustern zu unterdrücken.

LSPR-Imaging

Die LSPR-Bilder, welche nach der Bestrahlung der Oberflächen durch die Photomasken A (links) und B (rechts) erhalten wurden, sind in den Abbildungen IV.II.4-34 gezeigt; zum Vergleich ist außerdem ein Ausschnitt der erhaltenen Fluoreszenzbilder gezeigt.

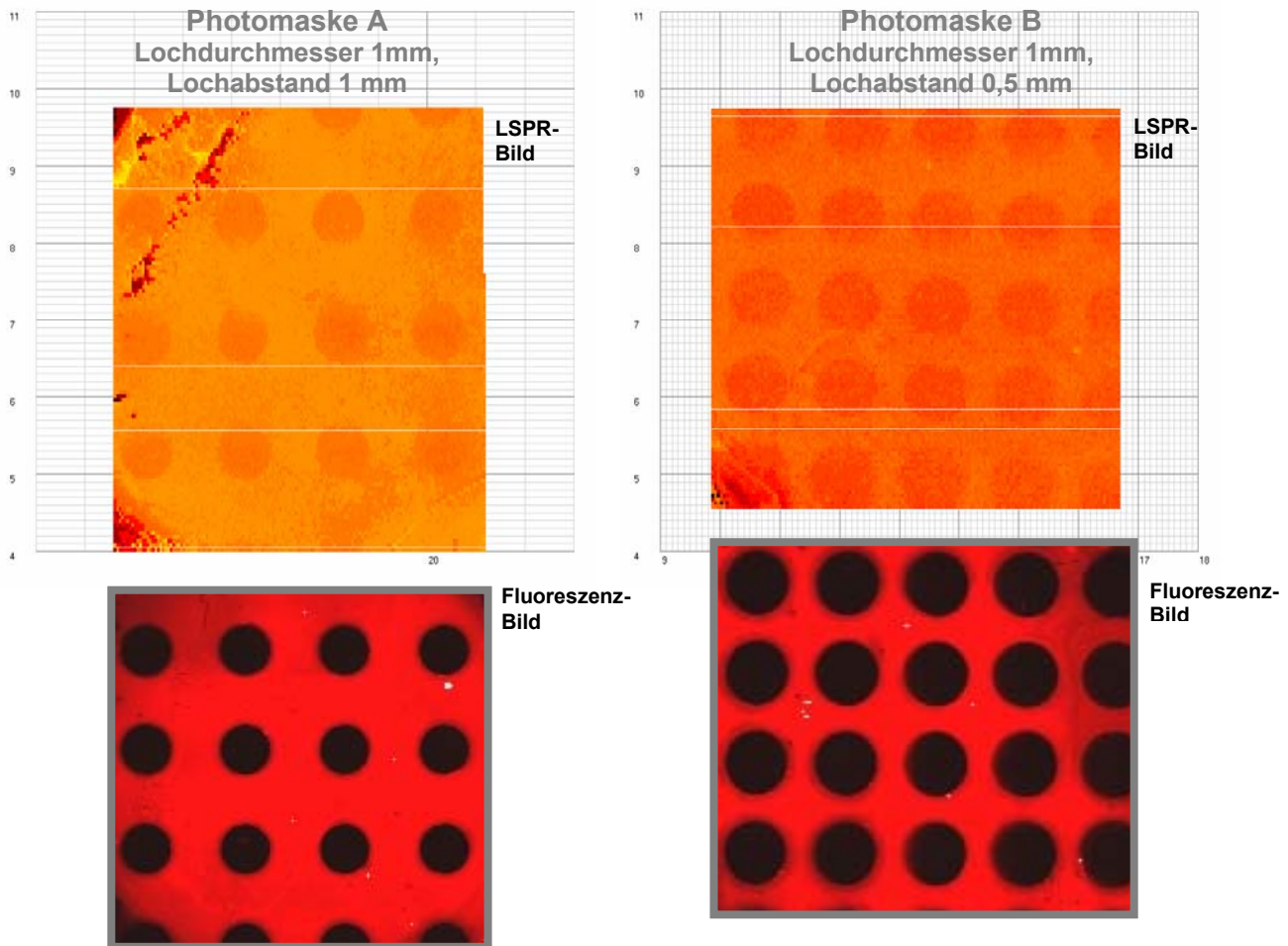


Abb. IV.II.4-34: LSPR- und Fluoreszenzbilder der photochemisch strukturierten und biofunktionalisierten Nanopartikeloberflächen bei Verwendung der Photomaske A (links) und Photomaske B (rechts).
 Oben: LSPR-Bilder; aufgenommen nach der oxidativen Strukturierung.
 Unten: Fluoreszenzbilder; aufgenommen nach oxidativer Strukturierung der EG31NH₂-terminierten Oberflächen, Readsorption von EG22OH an den bestrahlten und somit unfunktionalisierten Regionen und kovalenter Bindung des Anti-Kaninchen **Alexa Fluor® 647**-Antikörpers an die aminoterminalisierten Strukturen.

Die Fluoreszenz- und LSPR-Bilder stimmen für beide Methoden sehr gut überein. Die Abstände der verwendeten Masken sind mit beiden Methoden gut zu erkennen.

Die Resonanzposition der funktionalisierten Zwischenräume der in Abb. IV.II.4-34 links gezeigten Probe (Photomaske A) ist im Gegensatz zu den bestrahlten und daher unfunktionalisierten Regionen um durchschnittlich 12 nm in den längerwelligen Bereich verschoben ist.

Die Schichtdicke der mit dem Thiol EG31NH₂-beschichteten Zwischenräume liegt unter Berücksichtigung des in Abschnitt 2 ermittelten Eichwertfaktors (3,8 Å/nm) somit bei etwa 46 Å. Bei Verwendung der Photomaske B beträgt die Differenz bezüglich der Position der LSP-Resonanzen zwischen den bestrahlten und der unter der Photomaske befindlichen Regionen etwa 9 nm; somit besteht ein Schichtdicken-Unterschied von etwa 34 Å.

4.3.4 Fazit zu den photochemischen Strukturierungen

Die vorstehend beschriebenen Strukturierungsversuche zeigen, dass es möglich ist organische Monolagen durch UV-Bestrahlung über eine Photomaske in Sauerstoffatmosphäre oxidativ zu strukturieren; die kleinsten mit dieser Methode erzeugten Strukturierungen lagen hierbei in einem Maßstab von etwa 500 μm . Die Photo-Löcher können anschließend entweder mit BSA blockiert oder mit einer 2. Thiolverbindung aufgefüllt werden, so dass Muster unterschiedlicher chemischer Funktionalität resultieren; in einem 3. Schritt können folgend Biomoleküle in der vordefinierten Struktur gezielt gebunden werden. Die Blockierung mit BSA führte hierbei allerdings nur zu einer unvollständigen Absättigung der unfunktionalisierten Zwischenräume, in denen somit auch unspezifische Adsorption auftritt und den Kontrast der erzeugten Strukturen herabsetzt. Dagegen konnte bei Adsorption des proteinresistenten PEG-Thiols EG22OH eine unspezifische Adsorption an diesen Stellen vollkommen unterbunden werden.

Die erzeugten Photo-Muster wurden mittels Fluoreszenz-Aufnahmen und LSPR-Imaging visualisiert; hierbei wurde eine gute Übereinstimmung bezüglich Geometrie und Ausmaße der erzeugten Strukturierungen erhalten.

Hinsichtlich der LSPR-aktiven Oberflächen wurde somit gezeigt, dass diese mittels LSPR-Imaging die Möglichkeit zu einer markierungsfreien Visualisierung strukturierter Oberflächenbeschichtungen bieten, wobei mit Hilfe zuvor ermittelter Eichwertfaktoren ebenfalls auch orts aufgelöste Schichtdicken und Massenbelegungen angegeben werden können. Sie sollten daher auch als fester Sensor-Träger in Biochips integriert werden können; neben einer markierungsfreien Auslese des resultierenden Bindungsmusters erlauben sie in einer solchen Anwendung ebenfalls auch eine Quantifizierung der gebundenen Ligand-Konzentration. Aufwendige Sekundärschritte, wie sie zur Auslese des Bindungsmusters unter Einführung von Markierungen erforderlich sind, entfallen bei der Verwendung dieser optisch aktiven Oberflächen als festem Träger.

In den beschriebenen Versuchen wurden Strukturen im Bereich von 500 μm mit dieser Methode visualisiert. Bei einer Blockierung mit EG22OH konnten die erzeugten Muster sehr scharf abgegrenzt werden, so dass auch der Einsatz von Photomasken mit geringeren Abständen zu einer gut aufgelösten Struktur führen sollte.

Die maximale Auflösung der verwendeten LSPR-Imaging-Einheit liegt bei ca. 5 μm . Technisch steht der Visualisierung kleinerer Strukturen daher nichts im Wege.

Insgesamt zeigt sich somit, dass die LSPR-aktiven Nanopartikel-Oberflächen ein ausgezeichnetes Trägersystem zur Präparation und Auslese von Bio-Arrays darstellen, in denen sie eine markierungsfreie und quantitative Detektion von Bindungsereignissen ermöglichen.

Kapitel V

Zusammenfassung

und Ausblick

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit betrifft die Anwendung optisch aktiver Nanopartikel-Oberflächen zu einer quantitativen und markierungsfreien Detektion von Bindungsereignissen.

Die eingesetzten Oberflächen bestehen aus oberflächen-adsorbierten Core-shell Partikeln (Nanopartikel mit dielektrischem Kern und einer metallischen Hülle) und zeigen ausgeprägte Resonanzen im sichtbaren Spektralbereich, die auf eine kombinierte Anregung von sowohl lokalisierten als auch propagierenden Plasmaschwingungen zurückgeführt werden können und deren Resonanzlage empfindlich auf Änderungen der dielektrischen Eigenschaften ihrer unmittelbaren Umgebung reagiert. Diese Eigenschaft bildet die Grundlage zur markierungsfreien Detektion biomolekularer Wechselwirkungen und somit zu einem Einsatz in der biomedizinischen Diagnostik.

Gegenüber der konventionellen SPR-Spektroskopie weisen diese Sensoroberflächen insbesondere im Hinblick auf eine Integration in Mikroarrays eine Reihe von entscheidenden Vorteilen auf. Dies ist zum einen die Möglichkeit einer sehr viel höheren lateralen Auflösung. Infolge der lokalisierten Natur der angeregten Resonanzen sind diese auf die sie erzeugenden Objekte begrenzt, so dass im Fall einer entsprechend strukturierten Adsorption theoretisch Auflösungen im Nanometer-Bereich möglich sein sollten; dagegen ist die laterale Auflösung der SPR infolge der mittleren freien Ausbreitungslänge der angeregten Plasmonen auf Werte von etwa 10 μm beschränkt. Zudem resultieren, bedingt durch die kombinierte Anregung von lokalisierten und propagierenden Oberflächenplasmonen-Resonanzen sowohl höhere optische Extinktionswerte, die eine Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses zur Folge haben als auch eine größere Sensitivität gegenüber Änderungen ihrer unmittelbaren Umgebung. Gegenüber der konventionellen SPR-Spektroskopie konnte bereits eine etwa 5-fache Sensitivitätssteigerung erzielt werden. Des Weiteren kann selbst in miniaturisierten Anwendungen eine technisch einfache und kostengünstige Art der Detektion eingesetzt werden (in Reflexionsgeometrie arbeitender Faser-optischer Aufbau). Die erläuterten Eigenschaften sprechen somit für eine Integration in Mikroarrays (DNA-, Protein-, Peptid-Chips), in denen eine Vielzahl an Bindungsereignissen mit hoher lateraler Auflösung orts aufgelöst und markierungsfrei detektiert werden können.

Zur Demonstration einer solchen Verwendung wurden zunächst Oberflächenbeschichtungen auf Polyethylenglykolbasis entwickelt, die eine unspezifische Proteinadsorption weitgehend unterdrücken, jedoch eine hohe Bindungskapazität zur Immobilisierung immunodiagnostisch genutzter Rezeptoren (Peptide, Antikörper) aufweisen.

In geeigneten Kalibrationsmessungen wurden anschließend Eichwertfaktoren bezüglich Schichtdicke und Massenbelegung auf den Sensoroberflächen aufgebracht. Adsorbatlagen ermittelt und die Sensorplatten in Peptid- und Antikörper-Assays zu einer markierungsfreien

und quantitativen Detektion von Bindungsereignissen eingesetzt; die erhaltenen Werte wurden außerdem mit den anhand von XPS- und ELISA-Messungen ermittelten verglichen.

Die Sensorplatten konnten mit Hilfe von LSPR-Imaging ebenfalls auch zu einer Visualisierung von strukturierten Oberflächenbeschichtungen eingesetzt werden. Peptidarrays wurden mit Hilfe eines Spotroboters auf den Oberflächen aufgebracht sowie photochemisch strukturierte Oberflächenfunktionalisierungen erzeugt und die generierten Muster mit Hilfe von LSPR-Imaging nachgewiesen. Diese Strukturen wurden anschließend fluoreszenzmarkiert, um die LSPR-spektroskopisch erhaltenen Bilder mit den jeweiligen Fluoreszenzaufnahmen vergleichen zu können.

Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit kurz zusammenfassend dargestellt.

1.1 Polymere Ethylenglykol-Beschichtungen

1.1.1 Proteinresistenz und Bindungskapazität

Es wurden polymere Ethylenglykolthiole unterschiedlicher Kettenlänge (13-40 EG-Einheiten) und Endgruppenfunktionalität (OH, COOH, NH₂) synthetisiert und die auf Au-bedampften Si-Wafern adsorbierten Monolagen hinsichtlich ihrer Proteinresistenz und Kapazität zur kovalenten Integration von Antikörpern untersucht.

Die präparierten Beschichtungen wurden in den *Resistenzstudien* mit einer Fibrinogen- und einer Blutplasma-Lösung behandelt und die Adsorptionsrate anhand von XPS-, Ellipsometrie- und FT-IR-Messungen ermittelt.

In den *Antikörper-Bindungsstudien* wurden Peroxidase-markierte Antikörper eingesetzt, so dass die Bindungsrate auch mittels eines ELISAs bestimmt werden konnte. Nach der kovalenten Integration des Erstantikörpers wurde zunächst mit einem falschen Antigen umgesetzt und erst im folgenden Schritt das spezifische Antigen zugegeben.

Die Versuche zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Proteinresistenz von der Endgruppenfunktionalität und Kettenlänge der adsorbierten PEG-Moleküle, wobei mit zunehmender EG-Anzahl ein Anstieg des proteinabweisenden Charakters festgestellt wurde. Bezüglich der funktionellen Terminierung kann unabhängig von der Kettenlänge folgende Resistenzreihe aufgestellt werden:



Vollständige Proteinresistenz wurde nur im Fall elektrostatisch neutraler Oberflächenbeschichtungen (OH-Terminierung) beobachtet; liegen hingegen durch Protolyse geladene Oberflächenfunktionalitäten vor, so tritt unspezifische Adsorption auf, die jedoch durch eine Erhöhung der Kettenlänge reduziert werden kann. Dabei führen positive Oberflächenladun-

gen (NH_2) unabhängig von der Kettenlänge zu sehr viel höheren Adsorptionsraten als Beschichtungen, deren Endgruppenfunktionalitäten in Puffermedien zu anionischen Gruppen dissoziieren (COOH). Dies kann auf elektrostatische Wechselwirkungen mit den üblicherweise negativ geladenen Proteinen zurückgeführt werden.

Die bei unterschiedlichen PEG-Bedeckungen ermittelte Fibrinogen-Adsorption zeigte im Fall der Aminoterminierung einen zur jeweiligen Filmbildungskinetik analogen Verlauf und kann somit auf den mit zunehmender Ausrichtung der PEG-Ketten verbundenen Anstieg der Oberflächendichte an funktionellen Endgruppen zurückgeführt werden. Diese Schlussfolgerung wird durch die Antikörper-Bindungsstudien bestätigt, in denen nach der Umsetzung dieser Gruppen nur im Fall des kurzkettingen EG17NH₂ eine geringe unspezifische Antikörper-Adsorption beobachtet wurde.

Anhand der Bindungsstudien konnte ferner festgestellt werden, dass mit einer Zunahme der Proteinresistenz, wie zu erwarten, eine Abnahme der Bindungskapazität einhergeht. In immunodiagnostischen Anwendungen muss daher über die Parameter der Kettenlänge und Endgruppenfunktionalität ein geeigneter Kompromiss zwischen der Proteinresistenz und der einzustellenden Rezeptordichte gewählt werden.

Als besonders geeignet erwies sich in dieser Hinsicht die Matrix der Verbindung EG30COOH; diese zeigte trotz einer hohen Bindungskapazität nur eine geringe unspezifische Adsorptionsrate. Eine kovalente Antikörper-Immobilisierung führte zu einer relativ hohen Massenbelegung von 33.7 ng/cm^2 ; unspezifische Adsorption trat dagegen nur bei einer Behandlung mit Blutplasma auf und betrug, bezogen auf die unspezifische Adsorption eines nicht-resistenten Hexadecanthalfilms, etwa 12%.

Dagegen zeigte die hinsichtlich der Kettenlänge vergleichbare Verbindung EG31NH₂ nur eine geringfügig höhere Antikörper-Bindungsrate (40 ng/cm^2) - jedoch bei einem gleichzeitig sehr viel höheren unspezifischen Adsorptionsbeitrag. Diese betrug im Fall des Fibrinogen-Kontakts etwa 42% und nach der Blutplasma-Behandlung etwa 28% (bezogen auf die unspezifische Adsorption einer Hexadecanthalmonolage).

Bei einer Beurteilung dieser Werte ist jedoch zu beachten, dass sich die unspezifischen Adsorptionsraten auf die unfunktionalisierten Basisfilme beziehen; wie anhand der Antikörper-Bindungsstudien jedoch gezeigt werden konnte, resultieren nach einer Umsetzung dieser Funktionalitäten sehr viel niedrigere Adsorptionsbeiträge; für die Verbindungen EG31NH₂ führte die nach Umsetzung mit dem Erstantikörper durchgeführte Behandlung mit einem unspezifischen Antigen zu keiner Adsorption.

1.2 LSPR-aktive Nanopartikeloberflächen

1.2.1 Eichwertfaktoren zur quantitativen Detektion

Durch eine Funktionalisierung der Sensoroberflächen mit Alkan- und Polyethylenglykol-Thiolen unterschiedlicher Kettenlänge konnten anhand von XPS-Messungen Eichwertfaktoren bezüglich Schichtdicke und Massenbelegung der aufgetragenen Monolagen ermittelt werden. Dies war möglich, da innerhalb des in der Eichreihe betrachteten Bereiches von Schichtdicken (bis zu 53,1 Å) und Massenbelegungen (bis zu 485,6 ng/cm²) keine Sensitivitätsminderung der Sensorantwort eintrat und ein näherungsweise linearer Zusammenhang zwischen der Verschiebung der Resonanzlage und der Schichtdicke beobachtet wurde. Durch lineare Regression wurde bezüglich der Schichtdicke ein Sensitivitätsfaktor von etwa $26,57 \cdot 10^{-2}$ nm/Å ermittelt; die auf die Massenbelegung bezogene Empfindlichkeit betrug dagegen $28,49 \cdot 10^{-3}$ (nm*cm²)/ng.

1.2.2 Detektion und Quantifizierung biomolekularer Wechselwirkungen

Nach einer geeigneten Beschichtung der Sensoroberflächen wurden anschließend Antikörper-Antigen- und Peptid-Antikörper-Assays in die Schichten integriert und nach jedem Umsetzungsschritt die Verschiebung der LSP-Resonanz detektiert sowie XPS- und ELISA-Messungen durchgeführt. Mit Hilfe der zuvor ermittelten Eichwertfaktoren konnten die Schichtdicke und Massenbelegung der jeweiligen Adsorbatlagen ermittelt und mit den Ergebnissen der anderen Analysemethoden (XPS, ELISA) verglichen werden. Selbst im Bereich sehr hoher Schichtdicken (mittlere Schichtdicken bis zu ~ 75 Å) und Massenbelegungen (bis zu ~ 600 ng/cm²) wurde eine gute Übereinstimmung zwischen den anhand der unterschiedlichen Methoden ermittelten Werten erhalten. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Biomoleküle inselartig auf der Oberfläche binden und die angegebenen Schichtdicken somit lateral gemittelt sind. Die lokalen Schichtdicken-Maxima liegen in der Größenordnung der in den Assays ausgebildeten Sandwichstrukturen und betragen somit bis zu etwa 24 nm, wenn eine Basisfilmschichtdicke von 40 Å und ein Beitrag von etwa 10 Å pro Antikörper-Molekül angenommen wird.

Die Übereinstimmung der mittels der verschiedenen Analysemethoden erhaltenen Schichtdicken zeigt daher, dass der in den Eichmessungen ermittelte lineare Zusammenhang auch bis zu diesen lokalen Maximalwerten (ca. 24 nm) hin Gültigkeit behält; ansonsten hätten sich in den LSPR-Messungen niedrigere Werte ergeben. Die Abschwächungslänge des angeregten und zur Detektion genutzten evaneszenten Feldes muss daher mindestens in der Größenordnung von etwa 300 nm liegen und ist somit wesentlich höher als in Systemen, deren Detektionsprinzip auf einer ausschließlichen Anregung von lokalisierten Plas-

maschwingungen beruht; typische Abschwächungslängen liegen hier in einem Bereich von nur etwa 5 -10 nm.

Bedingt durch die mit dem Abstand zur Sensoroberfläche exponentiell abnehmende Resonanzverschiebung führen sehr niedrige Abschwächungslängen dazu, dass in größeren Abständen von der Oberfläche stattfindende Bindungsprozesse unter Umständen nicht mehr mit hinreichender Empfindlichkeit detektiert werden können. Dies ist besonders für die Detektion biomolekularer Wechselwirkungen von Bedeutung, da es sich bei den meisten Biomolekülen um Makromoleküle handelt und in vielen Anwendungen Sandwichstrukturen ausgebildet werden (Basisfilm + Rezeptor + Ligand), in denen die zu detektierenden Bindungsprozesse teilweise im Abstand von einigen Nanometern von der Oberfläche entfernt erfolgen.

Bezogen auf die genäherte lineare Abhängigkeit zwischen Sensorantwort und der Schichtdicke ist im Fall einer für lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanzen typischen Abschwächungslänge von nur etwa 10 nm die Detektionsempfindlichkeit in einem Abstand von 20 nm von der Sensoroberfläche bereits um etwa 57% reduziert.

Bei den präparierten Nanopartikeloberflächen führt die kombinierte Anregung von lokalisierten und propagierenden Oberflächenplasmonenresonanzen jedoch zu erheblich größeren Abschwächungslängen, so dass der Sensitivitätsbereich dieser Methode wesentlich erweitert wird.

1.2.3 LSPR-Imaging strukturierter Oberflächenbeschichtungen

Im Hinblick auf eine Anwendung zur Detektion biomolekularer Wechselwirkungen in miniaturisierten und parallelisierten Ansätzen wurden strukturierte Oberflächenbeschichtungen auf den Sensoroberflächen aufgebracht und die erzeugten Muster mittels LSPR-Imaging visualisiert.

Hierzu wurden zunächst Peptid-Arrays mit Hilfe eines Spotroboters auf den Oberflächen aufgebracht und das resultierende Bindungsmuster fluoreszenzspektroskopisch nachgewiesen; die aufgenommenen LSPR-Bilder zeigten jedoch keine erkennbare Strukturierung. Anhand von XPS- und ELISA-Messungen an flächig funktionalisierten Oberflächen konnte in Kombination mit den ermittelten Eichwertfaktoren später gezeigt werden, dass die in den Peptid-Assays erzielten Bindungsraten teilweise unterhalb der Detektionsgrenze der optisch aktiven Oberflächen liegen und daher mit dieser Methode nicht mehr aufzulösen sind.

Man entschied sich daher zu einer photochemischen Strukturierung adsorbierter Thiolmonolagen. Durch die über einer Photomaske erfolgende UV-Bestrahlung konnten auf diese Weise sehr gut aufgelöste Strukturen mit Maßstäben im Bereich von $\sim 500 \mu\text{m}$ erzeugt und mittels LSPR-Imaging und Fluoreszenzaufnahmen visualisiert werden; es zeigte sich, dass die Monolagen an den exponierten Stellen durch eine Oxidation der Schwefelkopfgruppe

innerhalb von etwa 10 min effektiv auf oxidativem Wege entfernt werden können. Nach Aufnahme der LSPR-Bilder wurden die erzeugten Lochstrukturen biofunktionalisiert und durch Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht.

In ersten Versuchen wurden die nach der UV-Bestrahlung resultierenden Lochstrukturen zunächst mit BSA abgesättigt und anschließend Peptide bzw. Antikörper an die verbliebene PEG-Matrix gebunden. Infolge einer nur ungenügenden Blockierung trat allerdings auch unspezifische Adsorption an den Lochstrukturen auf, so dass die Fluoreszenzbilder im Gegensatz zu den LSPR-Bildern keine scharf abgegrenzten Strukturen zeigten; Geometrie und Ausmaße der verwendeten Photomasken waren allerdings trotzdem gut erkennbar.

Daher wurde in einer weiteren Versuchsreihe dazu übergegangen, die nach der UV-Bestrahlung unfunktionalisierten Stellen mit einem proteinresistenten PEG-Thiol (EG22OH) aufzufüllen und im folgenden Schritt auf analogem Wege mit markierten Biomolekülen zu funktionalisieren. Mit Hilfe dieser Methode konnte eine unspezifische Adsorption vollständig unterbunden werden, so dass auch in den Fluoreszenzaufnahmen klar abgegrenzte Strukturen deutlich zu erkennen sind.

Insgesamt zeigen die Strukturierungs-Versuche somit, dass die optisch aktiven Nanopartikeloberflächen durch Anwendung von LSPR-Imaging selbst bei Einsatz eines einfachen optischen Aufbaus zur Visualisierung von im Maßstab von nur 500 μm strukturierten Oberflächenbeschichtungen und somit auch zu einer Detektion von Bindungsereignissen im Array-Format eingesetzt werden können.

2 Ausblick

2.1 Proteinresistente PEG-Beschichtungen

Weiterführende Studien zur Proteinresistenz endgruppenfunktionalisierter Polyethylenglykolbeschichten sollten vor allem versuchen, die Bedeutung bzw. die Größenordnung und Anteile der diese bestimmenden elektrostatischen und sterischen Abstoßungskräfte zu ermitteln. Hierzu empfehlen sich vor allem Messungen in Lösungen verschiedener Ionenstärke sowie mit Proteinen unterschiedlicher Nettoladung und vergleichbarer Größe, wie z.B. Lysozym (positiv), Myoglobin (negativ) und α -Lactalbumin (negativ). Durch eine Erhöhung der Ionenstärke kann der Beitrag der elektrostatischen Wechselwirkungen eingeschränkt werden; Kraft-Abstands-Messungen sollten daher in diesem Fall hauptsächlich den Beitrag der sterischen Abstoßungskräfte der PEG-Matrix offen legen. Durch Verwendung von Proteinen unterschiedlicher Nettoladung kann weiterhin die Bedeutung der effektiven Oberflächenladung der Beschichtung auf die Adsorptionsrate analysiert werden.

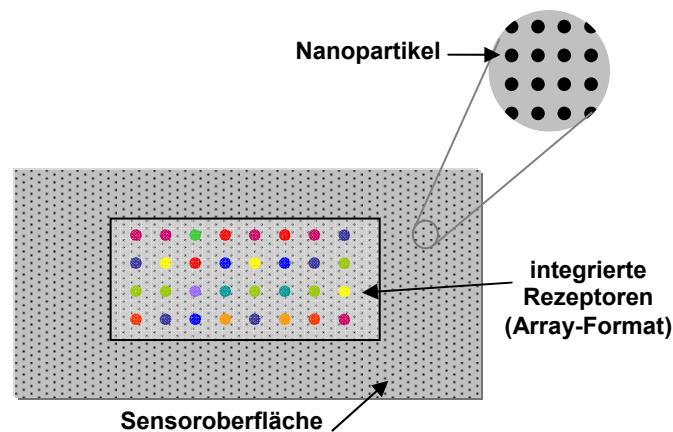
Da sich zeigte, dass die Art der Endgruppe insbesondere im Fall einer möglichen Protolyse in wässriger Lösung einen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Proteinadsorption ausübt, sollte, um eine eindeutige Aussage über den Zusammenhang von Proteinadsorption und Bindungskapazität zu treffen, auch das Ausmaß der unspezifischen Adsorptionsrate der bereits mit einem Linker umgesetzten PEG-Beschichtungen ermittelt werden. Denn obwohl die aminoterminierten Oberflächen drastisch höhere unspezifische Adsorptionsraten als die carboxyterminierten zeigen, resultieren nach einer Umsetzung dieser Funktionalität (z.B. im Rezeptor-funktionalisierten Zustand) nur geringe Adsorptionsraten; außerdem ist die Proteinbindungskapazität dieser Verbindungsklasse bei vergleichbarer Kettenlänge nur geringfügig höher. Es wird vermutet, dass die mit der Umsetzung der Endgruppen verbundene Änderung der effektiven Oberflächenladung für diese Erscheinung verantwortlich ist.

2.2 LSPR-aktive Nanopartikeloberflächen

Hinsichtlich der optisch aktiven Nanopartikeloberflächen sollten zunächst auch die SiO_2 -Systeme (Glasträger und SiO_2 -Nanopartikel) dahingehend optimiert werden, dass ähnlich hohe Sensitivitäten resultieren, wie sie bereits bei den auf Polystyrolbasis bestehenden (Polystyrolplatte und Polystyrol-Nanopartikel) erzielt werden konnte; letztere zeigen gegenüber der konventionellen SPR-Spektroskopie eine etwa 5-fach höhere Detektionsempfindlichkeit. Hinsichtlich einer weitergehenden Miniaturisierung sollte versucht werden, auch Strukturen geringerer Ausmaße (von nur einigen μm) mit Hilfe von LSPR-Imaging zu visualisieren.

Eventuell empfiehlt sich hier die Integration von CCD-Kameras, wodurch die mit der zu erzielenden Auflösung ansteigende Messzeit wesentlich reduziert werden kann.

Anschließend sollte über geeignete Methoden und Präparationsprotokolle zur Strukturierung von Oberflächen mit Nanopartikeln nachgedacht werden, um bei einem Einsatz in Mikroarrays von der hohen lateralen Auflösung der lokalisierten Resonanzen profitieren zu können. Theoretisch kann mit dieser Methode noch zwischen Bindungsereignissen separiert werden können, die im Nanometermaßstab voneinander entfernt stattfinden. Hinsichtlich solcher Anwendungen ist jedoch zu beachten, dass sich die Strukturierungs-Ausmaße der adsorbierten Partikel und der im Array-Format aufgetragenen Rezeptoren um einige Größenordnungen unterscheiden müssen, um eine ausreichende Funktionalisierung der Partikel mit den Rezeptoren zu garantieren. Die Ausmaße der Nanopartikel-Strukturierung sollten daher minimal gehalten werden, so dass die Integration der Rezeptoren zu einer Überstruktur führen kann.



Anhang A

Literaturverzeichnis

- [1] B.D. Ratner, *J. Biomed. Mater. Res.* 27 (1993) 837
- [2] J. Andrade, V. Hlady, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 516 (1987) 172
- [3] T.A. Horbett, J.L. Brash (Eds.), *Proteins at Interfaces II*, ACS Symp. Ser. Vol. 602 ACS, Washington DC (1995)
- [4] S.M. Slack, T.A. Horbett, *J. Colloid Interface Sci.* 124 (1998) 535
- [5] M. Houska, E. Brynda, *J. Colloid Interface Sci.* 188 (1997) 243
- [6] K. Park, D.F. Mosher, S.L. Cooper, *J. Biomed. Mater. Res.* 20 (1986) 589
- [7] W.G. Pitt, K. Park, S.L. Cooper, *J. Colloid Interface Sci.* 111 (1986) 343
- [8] E. Ostuni, R.G. Chapman, R.E. Holmlin, S. Takayama, G.M. Whitesides, *Langmuir*, 17 (2001) 5605
- [9] P. Kingshott, H.A. St John, H.J. Griesser, *Anal. Biochem.* 273 (1999) 156
- [10] S. Zhang, G. Wright, Y. Yang, *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 273
- [11] S. Herrwerth, T. Rosendahl, C. Feng, J. Fick, W. Eck, M. Himmelhaus, R. Dahint, M. Grunze, *Langmuir* 19 (2003) 1880
- [12] B.D. Ratner, An introduction to materials in medicine, in *Biomaterials Science*, B.D. Ratner, S.S. Hoffman, F.J. Shoen, J.D. Lemons (Eds.), Academic Press, San Diego (1996)
- [13] P. Kingshott, H.J. Griesser, Surfaces that resist bioadhesion, in *Current Opinion in Solid State & Material Science*, B.D. Ratner, L. Hench (Eds.), Vol. 4/3 (1999), 403
- [14] D. Beyer, W. Knoll, H. Ringsdorf, J.-H. Wang, R.T. Timmons, P. Sluka, *J. Biomed. Mater. Res.* 36 (1997) 181
- [15] E. Uchida, Y. Ujama, Y. Ikada, *Langmuir* 10 (1994) 481
- [16] K. Emoto, J.M. Harris, J.M. van Alstine, *Anal. Chem.* 68 (1992) 149
- [17] C. Brink, E. Osterberg, K. Holmberg, F. Tiberg, *Colloid Surf.* 66 (1992) 149
- [18] J.R. Koegh, F.F. Valender, J.W. Eaton, *J. Biomed. Mater. Res.* 26 (1992) 987
- [19] L. Vroman, A. L. Adams, *J. Colloid Interface Sci.* 111 (1986) 391
- [20] P. Kingshott, H.J. Griesser, *Curr. Opinion in Solid State Mat. Sci.*, in press
- [21] D.L. Coleman, D.E. Gregonis, J.D. Andrade, *J. Biomed. Mater. Res.* 16 (1982) 381
- [22] F. Grinnell, M.K. Feld, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 4888
- [23] W. Norde, in *Biopolymers at Interfaces*; M. Malmsten (Ed.), *Surfactant Science Series*: New York (1998) Vol. 75
- [24] E. Blomberg, P.M. Claesson, in *Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications*, T.A. Horbett, J.L. Brash (Eds.), American Chemical Society: Washington DC (1995); ACS Symposium Series 602; 296
- [25] J.D. Andrade, *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, Vol. 2: Protein Adsorption, Plenum Press, New York (1985)
- [26] P.L. Privalov, *Advances in Protein Chemistry*, 73 (1979) 167

- [27] C. Branden, J. Tooze, Introduction to Protein Structure, Garland Publishing, Inc.: New York (1995)
- [28] A.D. Robertson, K.P. Murphy, Chemical Reviews, 97 (1997) 1251
- [29] A.L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, Lehninger Biochemie, Springer Verlag (2001)
- [30] Stephanie Pasche, Dissertation, ETH Zürich (2005)
- [31] G.I. Makhatadze, P.L. Privalov, Advances in Protein Chemistry, 47 (1995) 307
- [32] Gunnar Raschke, Dissertation, LMU München (2005)
- [33] C.A. Haynes, W. Norde, Colloids and Surfaces B – Biointerfaces 2 (1994) 517
- [34] W. Norde, J. Lyklema, J. Biomat. Sci. Pol. Ed. 2/3 (1991) 183
- [35] M. Malmsten, Journal of Colloid and Interface Science 207 (1998) 186
- [36] Zahida Ademovic, Dissertation, RWTH Aachen (2002)
- [37] R. Kjellander, E. Florin, J. Chem. Soc., Faraday Trans. 77 (1981) 2053
- [38] J.M. Harris, Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications, American Chemical Society: Washington DC, Vol. 680 (1997)
- [39] J.M. Harris (Ed.), Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum Press, New York (1992)
- [40] P.W. Chun, M. Fried, E.E. Ellis, Anal. Biochem. 19 (1967) 481
- [41] R.A. Scott, N.A. Peppas, Biomaterials 20 (1999) 1371
- [42] S. Zalpinsky, C. Gillion, A. Zilkha, Eur. Polym. J. 19/12 (1983) 1177
- [43] N.P. Desai, J.A. Hubbell, J. Biomed. Mat. Res. 25 (1991) 829
- [44] M. Amifi, K. Park, J. Biomat. Sci. Polymer Ed. 4/3 (1993) 217
- [45] E. Tziampazis, J. Kohn, Biomaterials 21 (2000) 511
- [46] S. Nagaoka, A. Nakao, Biomaterials 11 (1990) 119
- [47] E.P.K. Currie, W. Norde, M.A.C. Stuart, Advances in Colloid and Interface Science, 100 (2003) 205
- [48] M. Morra, Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition 11 (2000) 547
- [49] P. Vermette, L. Meagher, Colloids and Surfaces B – Biointerfaces 28 (2003) 153
- [50] J.D. Andrade, V. Hlady, S.-I. Jeon, Hydrophilic Polymers, Performance with Environmental Acceptance, J.E. Glas (Ed.), Am. Chem. Soc. Advances in Chemistry Series (1996)
- [51] C. Foa, M. Soler, A.M. Benoliel, B. Bongrand, J. Mat. Sci.: Mater. Med. 7 (1996) 141
- [52] J.H. Lee, H.B. Lee, J.D. Andrade, Prog. Polym. Sci. 20 (1995) 1043
- [53] C. Branca, S. Magazu, F. Migliardo, G. Romeo, Journal of Molecular Liquids, 103 (2003) 181
- [54] F.E. Baley, J.V. Koleske, Non-ionic Surfactants: Physical Chemistry, M.J. Schick (Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York (1987) 927
- [55] R.E. Goldstein, Journal of Chemical Physics, 80 (1984) 5340
- [56] K. Holmberg, F. Tiberg, M. Malmsten, C. Brink, Colloids and Surfaces A – Physicochemical and Engineering Aspects 123 (1997) 297
- [57] Y.J. Wu, R.B. Timmons, J.S. Jen, F.E. Molock, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 18 (2002) 235

- [58] M. Shen, L. Martinson, M.S. Wagner, D.G. Castner, B.D. Ratner, T.A. Horbett, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 13 (2002) 367
- [59] S. Pasche, M. Textor, L. Meagher, N.D. Spencer, H.J. Griesser, *Langmuir* 21 (2005) 6508
- [60] S. Pasche, S.M. De Paul, J. Vörös, N.D. Spencer, M. Textor, *Langmuir* 19 (2003) 9216
- [61] S. Pasche, J. Vörös, H.J. Griesser, N.D. Spencer, M. Textor, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 17545
- [62] S. Tokumitsu, A. Liebich, S. Herrwerth, W. Eck, M. Himmelhaus, M. Grunze, *Langmuir* 18 (2002) 8862
- [63] E. Brinkman, A. Poot, L. vd Does, A. Bantjes, *Biomaterials* 11 (1990) 200
- [64] K. Fuimoto, H. Inoue, Y. Ikada, *J. Biomed. Mat. Res.* 27 (1993) 1559
- [65] J.L. Dalsin, S. Tosatti, J. Vörös, M. Textor, P.B. Messersmith, *Langmuir*, in press
- [66] P. Kingshott, H. Thissen, H.J. Griesser, *Biomaterials*, 23 (2002) 2043
- [67] T. McPherson, A. Kidane, I. Szleifer, K. Park, *Langmuir* 14 (1998) 176
- [68] S.I. Jeon, J.H. Lee, D. Andrade, P.G. de Gennes, *J. Colloid Interface Sci.* 142 (1991) 149
- [69] S.I. Jeon, D. Andrade, *J. Colloid Interface Sci.* 142 (1991) 159
- [70] I. Szleifer, *Physica A* 244 (1997) 370
- [71] I. Szleifer, *Biophysical Journal* 72 (1997) 595
- [72] F. Fang, I. Szleifer, *Langmuir* 18 (2002) 5497
- [73] M.D. Nakao, S. Nagaoka, Y. Mori, *Journal of Biomaterials Applications*, 2 (1987) 219
- [74] K.L. Prime, G.M. Whitesides, *Journal of the American Chemical Society*, 115 (1993) 10714
- [75] B. Zhu, T. Eurell, R. Gunawan, D. Leckban, *Journal of Biomedical Materials Research*, 56 (2001) 406
- [76] K.L. Prime, G.M. Whitesides, *Science* 252 (1991) 1164
- [77] P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G.M. Whitesides, P.E. Laibins, *J. Phys. Chem.* 102 (1998) 426
- [78] K. Feldman, G. Hähner, N.D. Spencer, P. Harder, M. Grunze, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 10134
- [79] C. Dicke, K. Feldman, W. Eck, S. Herrwerth, G. Hähner, *Polym. Prepr.* 41/2 (2000) 1444
- [80] R.L.C. Wang, H.J. Kreuzer, M. Grunze, *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 9767
- [81] H.I. Kim, J.G. Kushmerick, J.E. Houston, B.C. Bunker, *Langmuir*, 19 (2003) 9271
- [82] C. Dicke, G. Hähner, *J. Phys. Chem. B*, 106 (2002) 4450
- [83] C. Dicke, G. Hähner, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 12619
- [84] A. Halperin, *Langmuir* 15 (1999) 2525
- [85] D. Leckband, S. Sheth, A. Halperin, *Journal of Biomaterials science-Polymer Edition* 10 (1999) 1125
- [86] M.A. Rixman, D. Dean, C. Ortiz, *Langmuir* 19 (2003) 9357
- [87] J.N. Israelachvili, P.M. McGuiggan, *Science* 214 (1988) 795
- [88] J.N. Israelachvili, R.M. Pashley, 306 (1983) 249
- [89] J.C. Maxwell, *Treatise on electricity and magnetism*, Clarendon Press, Oxford 1873
- [90] R.H. Ritchie, *Phys. Rev.* 106 (1957), 874
- [91] A. Otto, *Z. Phys.* 216 (1968) 398

- [92] E. Kretschmann, R. Raether, Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light, *Z. Phys.* 216 (1968) 2135
- [93] H. Raether, Surface Plasmon oscillations and their applications, *Phys. Thin Films* 9 (1977) 145
- [94] www.imtek.uni-freiburg.de/cpi/images/images/vl-ofa/vl-ofa-lecture5.pdf
- [95] Birgit Kieser, Dissertation, Universität Tübingen (2002)
- [96] H. Raether, Surface plasmons on smooth an rough surfaces an on gratings, Springer Verlag, Berlin, 1988
- [97] K. Johansen, H. Arwin, I. Lundström, B. Liedberg, *Rev. Sci. Instr.* 71/9 (2000) 3530
- [98] L.S. Jung, C.T. Campbell, T.M. Chinowsky, M. M. Mar, S. S. Yee, *Langmuir* 14 (1998) 5636
- [99] H. Wolter, Optik dünner Schichten in : *Handbuch der Physik*, Band XXIV, 461-472, Springer Verlag, Berlin, 1956
- [100] P. Englebienne, A. van Hoonacker, M. Verhas, *Spectroscopy* 17 (2003) 255
- [101] W. Lukosz, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 175
- [102] B. Liedberg, I. Lundstrom, E. Stenberg, *Sens. Actuators B* 11 (1993) 63
- [103] W. Lukosz, *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991) 215
- [104] A.J. Haes, R.P. van Duyne, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 920
- [105] A.J. Haes, R.P. van Duyne, *Proc. Of SPIE Vol.* 5221 (2003) 47
- [106] A.J. Haes, R.P. van Duyne, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4/4 (2004) 527
- [107] G. Steiner, R. Salzer, Biosensors based on SPR Imaging, *Biosensor Symposium Tübingen* (2001)
- [108] <http://www.physik.uni-greifswald.de/grossespraktikum/versuch.pdf>
- [109] <http://www.physics.ohio-state.edu/~stroud/optics1.ppt>
- [110] U. Kreibig, M. Vollmer, *Optical properties of metal clusters*, Springer Verlag, Berlin, 1995
- [111] C. Bohren, D. Huffman, *Absorption and scattering of light by small particles*, John Wiley and Sons, New York, 1983
- [112] M. Born, *Optik*, Springer Verlag Berlin (1965)
- [113] W. Greiner, *Theoretische Physik*, Bd.3, *Klassische Elektrodynamik* (2002)
- [114] G. Mie, Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen, *Annals of Physics* 25/3 (1908) 377
- [115] J. Sinzig, U. Radtke, M. Quinten, U. Kreibig, *Zeitschrift für Physik D - Atoms Molecules and Clusters* 26/1-4 (1993) 242
- [116] J. Sinzig, M. Quinten, *Applied Physics A – Materials Science and Processing*, 58/2 (1994) 157
- [117] M.D. Malinsky, K.L. Kelly, G.C. Schatz, R.P. van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1471
- [118] J.C. Riboh, A.J. Haes, A.D. McFarland, C.R. Yonzon, R.P. van Duyne, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 1772
- [119] C.R. Yonzon, E. Jeoung, S. Zou, G.C. Schatz, M.Mrksich, R.P. van Duyne, *J. Am. Soc.* 126 (2004) 12669

- [120] A. J. Haes, R.P. van Duyne, *J. Am. Soc.* 124 (2002) 10596
- [121] A.J. Haes, S. Zou, G.C. Schatz, R.P. van Duyne, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 109
- [122] Martin Lieberherr, Dissertation, ETH Zürich (1991)
- [123] A. Ahluwalia, D. De Rossi, C. Ristori, A. Schirone, *Bios. Bioelectr.* 7 (1991) 201
- [124] C. Sönnichsen, *Plasmons in metal clusters*, Cuviller Verlag, Goettingen (2001)
- [125] T.R. Jensen, M.L. Duval, K.L. Kelly, A.A. Lazarides, G.C. Schatz, R.P. van Duyne, *J. Phys. Chem. B.* 103/45 (1999) 9846
- [126] A. Curry, G. Nusz, A. Chilkoti, A. Wax, *Optics Express*, 13/7 (2005) 2668
- [127] H.S. Zou, I. Honma, H. Komiyama, J.W. Haus, *Phys. Rev. B* 50/16 (1994) 12052
- [128] R.D. Averitt, D. Sarkar, N.J. Halas, *Phys. Rev. Lett.* 78/22 (1997) 4217
- [129] R.D. Averitt, S.L. Westcott, N.J. Halas, *Phys. Rev. B* 58/16 (1998) 10203
- [130] R.D. Averitt, S.L. Westcott, N.J. Halas, *J. Opt. Soc. Am. B – Optical Physics* 16/10 (1999) 1814
- [131] R. D. Averitt, S.L. Westcott, N.J. Halas, *J. Opt. Soc. Am. B – Optical Physics* 16/10 (1999) 1824
- [132] S.L. Westcott, R.D. Averitt, J.A. Wolfgang, P. Nordlander, N.J. Halas, *J. Phys. Chem. B* 105/41 (2001) 9913
- [133] S.L. Westcott, J.B. Jackson, C. Radloff, N.J. Halas, *Phys. Rev. B* 66/15 (2002) 1554311
- [134] E. Prodan, P. Nordlander, N.J. Halas, *Nano Lett.* 3/10 (2003) 1411
- [135] Y. Sun, Y. Xia, *Anal. Chem.* 74/20 (2002) 5297
- [136] F. Tam, C. Moran, N.J. Halas, *J. Phys. Chem. B* 108/45 (2004) 17290
- [137] L.R. Hirsch, J.B. Jackson, A. Lee, N.J. Halas, J.L. West, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2377
- [138] N.L. Rosi, C.A. Mirkin, *Nanostructures in Biodiagnostics*, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1547
- [139] R. Elghanian, J.J. Storhoff, R.C. Mucic, C.A. Mirkin, *Science* 277(1997)1078
- [140] J.J. Storhoff, A.A. Lazarides, R.C. Mucic, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, C.A. Mirkin, *J. Am. Soc.* 122 (2000) 4640
- [141] C.M. Niemeyer, *Angew. Chem.* 113 (2001) 4254
- [142] T.R. Jensen, G.C. Schatz, R.P. van Duyne, *J. Phys. Chem. B* 103 (1999) 2394
- [143] T.R. Jensen, M.D. Malinsky, C.L. Haynes, R.P. van Duyne, *J. Phys. Chem. B* 104 (2000) 10549
- [144] A.J. Haes, L. Chang, W.L. Klein, R.P. van Duyne, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 2264
- [145] G. Bauer, F. Pittner, T. Schalkhammer, *Mikrochim. Acta*, 131 (1999) 107
- [146] M. Himmelhaus, H. Takei, *Sensors and Actuators B* 63 (2000) 24
- [147] R. Dahint, E. Trileva, H. Acunman, U. Konrad, M. Zimmer, V. Stadler, M. Himmelhaus, submitted for publication to *Biosensors and Bioelectronics*
- [148] S. J. Oldenburg, R.D. Averitt, S.L. Westcott, N.J. Halas, *Chem. Phys. Lett.* 288 (1998) 243
- [149] J.B. Jackson, N.J. Halas, *J. Phys. Chem B* 105 (2001) 2743
- [150] K.C. Grabar, K.J. Allison, B.E. Baker, R.M. Bright, K.R. Brown, R.G. Freeman, M.J. Natan, *Langmuir* 12 (1996) 2353
- [151] K.C. Grabar, R.G. Freeman, M.B. Hommer, M.J. Natan, *Anal. Chem.* 67 (1995) 735

- [152] R. G. Freeman, K.C. Grabar, K.J. Allison, R. M. Bright, M.J. Natan, *Science* 267 (1995) 1629
- [153] G. Decher, *Multilayer Thin Films*, Wiley-VCH, Weinheim (2003)
- [154] G. Decher, J.D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films* 210/211 (1992) 831
- [155] T. Farhat, J. Schlenhoff, *Solid State Lett.* 5 (2002) 13
- [156] D.L. Elbert, C.B. Herbert, J.A. Hubbell, *Langmuir* 15 (1998) 5355
- [157] T.M. Cooper, A.L. Campbell, R.L. Crane, *Langmuir* 11 (1995) 2713
- [158] F. Caruso, R.A. Caruso, H. Möhwald, *Science* 282 (1998) 1111
- [159] C. Picart, P. Lavalle, P. Hubert, F.J.G. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J.C. Voegel, *Langmuir* 17 (2001) 7414
- [160] F. Caruso, C. Schüler, *Langmuir* 16 (2000) 9595
- [161] A.A. Antipov, G. B. Sukhorukov, E. Donath, H. Möhwald, *J. Phys. Chem. B* 105 (2001) 2281
- [162] H. Löwen, *Phys. B.* 3 (1995) 165
- [163] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, VCH, Weinheim (1987)
- [164] Gisela Kaltenpoth, *Dissertation*, Universität Heidelberg (2003)
- [165] P.W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH, Weinheim (1990)
- [166] A.K. Boal, F. Ilhan, J.E. DeRouchy, T. Thurn Albrecht, V.M. Rotello, *Nature* (2000) 404
- [167] O.D. Velev, E.W. Kaler, *Langmuir* 15 (1999) 3693
- [168] K.R. Brown, M.J. Natan, *Langmuir* 14 (1998) 726
- [169] G. Kaltenpoth, M. Himmelhaus, L. Slansky, F. Caruso, M. Grunze, *Adv. Mater.* (2003) 1113
- [170] Caroline Fanny Liu, *Diplomarbeit*, Universität Heidelberg (2006)
- [171] A.J. Haes, S. Zou, G.C. Schatz, R.P. van Duyne, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 691
- [172] A. Pack, M. Hietschold, R. Wannenmacher, *Opt. Commun.* 194 (2001) 277
- [173] J. Aizenberg, P.V. Braun, P. Wiltzius, *Phys. Rev. Lett.* 84 (2000) 2997
- [174] M. Himmelhaus, H. Takei, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4 (2002) 496
- [175] K.M. Chen, X. Jiang, L.C. Kimerling, P.T. Hammond, *Langmuir* 16 (2000) 7825
- [176] H.P. Zheng, I. Lee, M.F. Rubner, P.T. Hammond, *Adv. Mater.* 14 (2002) 569
- [177] S. Okazaki, *J. Vac. Sci. Tech. B* 9 (1991) 2829
- [178] Y. Xia, G.M. Whitesides, *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)* 37 (1998) 550
- [179] A. Götzhäuser, W. Eck, W. Geyer, V. Stadler, T. Weimann, P. Hinze, M. Grunze, *Adv. Mater.* 13 (2001) 806
- [180] T. Cassagneau, F. Caruso, *Adv. Mater.* 14 (2002) 732
- [181] A.E. Neeves M.H. Birnboim, *J. Opt. Soc. Am. B* 6 (1998) 787
- [182] S. Herrwerth, T. Rosendahl, C. Feng, J. Fick, W. Eck, M. Himmelhaus, R. Dahint, M. Grunze, *Langmuir* 19 (2003) 1880
- [183] K.L. Prime, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 10714
- [184] S.I. Jeon, J.H. Lee, J.D. Andrade, P.G. de Gennes, *J. Colloid Interf. Sci.* 142 (1991) 149
- [185] C. Dicke, G. Hähner, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 4450
- [186] B.T. Houseman, M. Mrksich, *Biomater.* 22 (2001) 943
- [187] J. Edler, *Diplomarbeit*, Universität Heidelberg (2000)

- [188] A.D. McFarland, R.P. van Duyne, *Nano Lett.* 3/8 (2003) 1057
- [189] H. Hertz, *Wiedemann'sche Ann. Phys.* 31 (1887) 982
- [190] K. Siegbahn et al., *ESKA-Anatomic, Molecular and Solid State Structure Studies by Means of Electron Spectroscopy*, Uppsala (1967)
- [191] G.M. Ertl, J. Küppers, *Low energy electrons and surface chemistry*, Weinheim, Deerfield Beach, VCH-Verlag (1985)
- [192] T.L. Barr, *Modern ESCA, The Principles and Practice of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton (1995)
- [193] Gerd Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, VCH Weinheim (1987)
- [194] P.W. Atkins, *Quanten*, VCH Weinheim (1993)
- [195] P. Jablonski, *Surf. Interf. Anal.*, 20 (1993) 771
- [196] K. Siegbahn, *Photoelectron Spectroscopy: Retrospects and Prospects*, London, R. Soc., (1985)
- [197] J.H. Scofield, *J. Elec. Spec. Rel. Phen.*, 8 (1976) 129
- [198] S. Tanuma, C.J. Powell, *Surface and Interface Analysis*, 17 (1991) 911
- [199] P.E. Laibinis, C.D. Bain, G.M. Whitesides, *J. Phys. Chem.*, 95 (1991) 7017
- [200] Thomas Felgenhauer, *Diplomarbeit, Universität Heidelberg* (1997)
- [201] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1995)
- [202] R.M.A. Azzam, *Ellipsometry and polarized light*, North-Holland Publishing Group, Amsterdam (1987)
- [203] H.G. Tomkins, *A user's guide to ellipsometry*, Academic Press Inc., Boston (1993)
- [204] L. Cauchy, *Bull. des sc. math.*, 14/9 (1830)
- [205] J.P. Gosling, *Immunoassays – A practical approach*, Oxford University Press, Oxford (2000)
- [206] D. Wild, *The Immunoassay Handbook*, Nature Publishing Group (2001)
- [207] C.P. Price, D.J. Newman, *Principles and Practice of Immunoassays*, Macmillan, London (1997)
- [208] R.A. Yalow, S.A. Berson, *Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man*, *Journal of Clinical Investigation*, 39/7 (1960) 1157
- [209] www.natur.sbg.ac.at/arnulf/biochem/biochemue2/elisaue.pdf
- [210] Alexandra Schwarz, *Diplomarbeit, Universität Heidelberg* (1995)
- [211] Thomas Felgenhauer, *Dissertation, Universität Heidelberg* (2002)
- [212] Y. Long, S. Herrwerth, W. Eck, M. Grunze, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4 (2002) 522
- [213] K.L. Prime, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 10714
- [214] A. Ulman, *Chem. Rev.* 96 (1996) 1533

- [215] L.H. Dubois, R.G. Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 43 (1992) 437
- [216] R.G. Nuzzo, D.L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 4481
- [217] A. Ulman, *An introduction of ultra-thin organic films: Langmuir-Blodgett to Self Assembly*, Academic press, New York (1991)
- [218] C.D. Bain, E.B. Troughton, J. Evall, G.M. Whitesides, R.G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, 93 (1989) 1670
- [219] L.H. Dubois, R.G. Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 43 (1992) 437
- [220] C.D. Bain, E.B. Troughton, Y.T. Yao, J. Evall, G.M. Whitesides, R.G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 321
- [221] G. Hähner, Ch. Wöll, M. Buck, M. Grunze, *Langmuir* 9 (1993) 1955
- [222] R.C. Thomas, L. Sun, R.M. Crooks, A.J. Ricco, *Langmuir* 7 (1991) 620
- [223] R.G. Nuzzo, L.H. Dubois, D.L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 558
- [224] L.H. Dubois, B.R. Zegarski, R.G. Nuzzo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1997) 4739
- [225] L.H. Dubois, B.R. Zegarski, R.G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 570
- [226] L.H. Dubois, R.G. Nuzzo, *Ann. Phys. Lett.* 43 (1993) 437
- [227] Y. Xia, G.M. Whitesides, *Angewandte Chemie*, 110 (1998) 568
- [228] Jörg Fick, Dissertation, Universität Heidelberg (2005)
- [229] M. Jaschke, H. Schönherr, H. Wolf, H.J. Butt, E. Bamberg, *J. Phys. Chem.*, 100 (1996) 2290
- [230] G.Y. Liu, M.B. Salmeron, *Langmuir* 10 (1994) 367
- [231] C.D.E. Chidsey, D. N. Loiacono, *Langmuir* 6 (1990) 682
- [232] G. Hähner, M. Kinzler, C. Thümmel, Ch. Wöll, M. Grunze, *J. Vac. Sci. Technol.*, 10 (1992) 2758
- [233] Haitao Rong, Dissertation, Universität Heidelberg (2001)
- [234] Svetlana Stoycheva, Dissertation, Universität Heidelberg (2006)
- [235] Martin Zimmer, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (2005)
- [236] C.M. Pradier, C. Rubio, C. Poleunis, P. Bertrand, P. Marcus, C. Compere, *J. Phys. Chem B* (2005) 9540
- [237] Sascha Herrwerth, Wolfgang Eck, Sven Reinhardt, Michael Grunze, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 9359
- [238] X.-Y. Zhu, Y. Jun, D. R. Staarup, R. C. Major, S. Danielson, V. Boiadjev, W. L. Gladfelter, B. C. Bunker, A. Guo, *Langmuir* 17 (2001) 7798
- [239] B. Zdyrko, V. Klep, I. Luzinov, *Langmuir* 19 (2003) 10179
- [240] B. Zdyrko, S. K. Varshney, I. Luzinov, *Langmuir* 20 (2004) 6727
- [241] W. R. Gombotz, W. Guanghui, T. A. Horbett, A. S. Hoffman, *J. Biomed. Mater. Res.*, 25 (1991) 1547

- [242] Gunnar Karlström, J. Phys. Chem., 89 (1985) 4962
- [243] S. Balamurugan, K. L. Ista, J. Yan, G. P. Lopez, J. Am. Chem. Soc., 127 (2005) 14548
- [244] S. Stolnik, N. C. Felumb, C. R. Heald, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, Colloids and Surfaces A – Physicochemical Engineering Aspects, 122 (1997) 151
- [245] Sascha Herrwerth, Dissertation, Universität Heidelberg (2003)
- [246] Mario Beyer, Dissertation, Universität Heidelberg (2005)

Anhang B

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di(ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AFM	<i>engl.</i> Atomic Force Microscope <i>deutsch</i> Rasterkraftmikroskop
AIBN	2,2'-Azobis-(2-methyl-butyronitril)
BSA	<i>engl.</i> Bovine Serum Albumine <i>deutsch</i> Rinderserumalbumin
CCD	<i>engl.</i> Charge Coupled Device <i>deutsch</i> Ladungsgekoppeltes Bauelement
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DDA	<i>engl.</i> Discrete Dipole Approximation <i>deutsch</i> Diskrete Dipol-Approximations-Methode
DEAD	Azodicarbonsäurediethylester
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG	Ethylenglykol
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme Linked Immunosorbent Assay <i>deutsch</i> enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
Fmoc	Fluorenyl-methoxy-carbonyl-Rest
HRP	<i>engl.</i> Horse Radish Peroxidase <i>deutsch</i> Meerrettich-Peroxidase
HWB	Halbwertsbreite
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie
LSPR	<i>engl.</i> Localised Surface Plasmon Resonance <i>deutsch</i> Lokalisierte Oberflächenplasmonenresonanz
MALDI	<i>engl.</i> Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization <i>deutsch</i> Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung

NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMI	N-Methylimidazol
NMR	<i>engl.</i> Nuclear Magnetic Resonance <i>deutsch</i> Kernmagnetische Resonanz
PBS	<i>engl.</i> Phosphate Buffered Saline <i>deutsch</i> Phosphat-Puffer
PEG	Polyethylenglykol
PET	Polyethylenterephthalat
POD	Peroxidase
PS	Polystyrol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIU	<i>engl.</i> Refractive Index Unit <i>deutsch</i> Brechungsindex Einheit
RU	<i>engl.</i> Resonance Unit <i>deutsch</i> Resonanz-Einheiten
SAM	<i>engl.</i> Self Assembled Monolayer <i>deutsch</i> Selbstaggregierende Monolagen
SMCC	Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carbonsäure
SPR	<i>engl.</i> Surface Plasmon Resonance <i>deutsch</i> Oberflächenplasmonen-Resonanz
SPRI	<i>engl.</i> SPR Imaging <i>deutsch</i> Bildgebende SPR
TIR	<i>engl.</i> Total Internal Reflection <i>deutsch</i> Totale Innere Reflexion
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
UV/VIS	Ultraviolett/sichtbar
XPS	<i>engl.</i> X-ray photoelectron spectroscopy <i>deutsch</i> Röntgenangeregte Photoelektronenspektroskopie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Michael Grunze am Institut für Angewandte Physikalische Chemie der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg in der Zeit von November 2003 bis Januar 2007 unter der Anleitung von PD Dr. Reiner Dahint angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dahint für die interessante Themenstellung. Seine stets freundliche Unterstützung und fortwährende Diskussionsbereitschaft haben das Fortschreiten und Gelingen der Arbeit maßgeblich gefördert.

Herrn Prof. Dr. Motomu Tanaka danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens zu meiner Arbeit.

Herrn Prof. Grunze danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis; ihm und Dr. Reiner Dahint danke ich weiterhin für die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen.

Für die freundliche und gute Zusammenarbeit in unserer Projektgruppe „Bio-Induced Chameleon Effects in Nano-Composite Self-Assembled Materials“ danke ich ganz herzlich allen Beteiligten an der APC und am DKFZ.

Elka Trileva danke ich für die Einarbeitung in die Präparation der Nanopartikel-Oberflächen, Dr. Mario Beyer vom DKFZ für seine Hilfe bei den Peptidarrays, Dr. Jörg Fick für die Einführung in die Ellipsometrie, Xinyu Cao für die Einweisung in die Röntgenphotoelektronenspektroskopie, meinem Laborkollegen Tridib Kumar Sarma für seinen chemischen Beistand im Labor, Martin Zimmer für den Bau der LSPR-Imaging Einheit und die Einführung in die Benutzung, Herrn Weis und den Mitarbeitern der Werkstätten für die Anfertigung der Photomasken, Dr. Reiner Dahint für die Korrektur dieser Arbeit und meinem Bürokollegen Marcel Müller für eine unterhaltsame Bürozeit.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises für die angenehme Arbeits-Atmosphäre bedanken.

Hatice Acunman, Georgiana Baldea und Irina Slizskaia danke ich ganz besonders für ihre Freundschaft und eine schöne Zeit.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie; meiner Schwester Marion und Daniel, Zino und Kora und vor allem meinen Eltern. Ihr seid der Boden unter meinen Füßen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum/-ort: 12. Mai 1978 in Münster
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulausbildung

06/1988 – 06/1997 St. Antonius-Gymnasium in Lüdinghausen
 10.6.1997 Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1997 - 07/2002 Westfälische Wilhelms-Universität Münster
 Studium der Chemie, Wahlfach Biochemie

5.10.1999 Vordiplom in Chemie; Note 1,0

11/2001 - 05/2002 Westfälische Wilhelms-Universität Münster
 Diplomarbeit an der Physikalischen Chemie,
 Arbeitsgruppe von Prof. Eckert
 Thema: Anwendung der CP-MAS-Technik zur strukturellen
 Charakterisierung von Silicagelen und Zeolithen

01.07.2002 Diplom-Chemikerin; Note 1,3

11/2003 - 03/2007 Ruprecht Karls-Universität Heidelberg
 Dissertation an der Angewandten Physikalischen Chemie,
 Arbeitsgruppe von Prof. Grunze
 Thema: Integration von Rezeptoren in inerte Matrices zur
 markierungsfreien und quantitativen Detektion biospezifischer
 Wechselwirkungen mit LSPR-aktiven Nanopartikeloberflächen

04/2004 - Fernuniversität in Hagen
 Studium der Wirtschaftswissenschaften für Naturwissenschaftler und
 Ingenieure, Wahlfächer Marketing und Produktionswirtschaft

30.9.2005 Vordiplom in Wirtschaftswissenschaften für Naturwissenschaftler und
 Ingenieure; Note 2,7

Praktika, Berufliche Tätigkeiten

- 06/1997 – 09/1997 Chemische Laboratorien Dr. Weißling, Münster-Altenberge
Praktikum in der Umweltanalytik
Tätigkeiten: Aufbereitung von Boden- und Wasserproben, Bestimmung organischer Summenparameter (OSP), adsorbierbarer organischer Halogenverbindungen (AOX) und schwerlöslicher lipophiler Stoffe (SLS)
- 01/2003 – 09/2003 MPI für Bioanorganische Chemie, Mülheim a. d. Ruhr
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Tätigkeiten: Fermentation, Proteinaufreinigung, UV/Vis-Stopped-Flow, Tieftemperatur-EPR-Messungen
- 04/2004 – 07/2006 Leitung der Übungsgruppen zu Vorlesungen der physikalischen Chemie (Oberflächenchemie, Materie und Spektren, Reaktionskinetik, statistische Thermodynamik)

Patente

- 26.10.2006 R. Dahint, P. Bücken, E. Trileva, M. Himmelhaus, H. Acunman
Sensor chip with connected non-metallic particles comprising a metallic coating
PCT Int. Appl. (2006), WO 2006111414 A1 20061026

Veröffentlichungen

- P. Bücken, E. Trileva, M. Himmelhaus, R. Dahint
Label-free biosensors based on optically responsive nano-composite layers: Sensitivity and dynamic range
In Vorbereitung
- P. Bücken, M. Zimmer, M. Himmelhaus, R. Dahint
Visualization of structured surface-coatings using LSPR-Imaging
In Vorbereitung
- P. Bücken, M. Himmelhaus, R. Dahint
Factors that determine the protein-resistance and receptor-coupling efficiency of PEG-coated surfaces
In Vorbereitung

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich meine Dissertation selbständig angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen 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, den 11.1.2007

Petra Bücken