

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom - Chemikerin Hatice Acunman

aus Neckargerach

Tag der mündlichen Prüfung : 31. März 2008

Photosensitive Moleküle zur Immobilisierung von Biomolekülen an Grenzflächen

Gutachter:

Prof. Dr. Joachim P. Spatz
PD. Dr. rer. rat. Reiner Dahint

Inhaltsverzeichnis

Abstract	IX
Kurzfassung	X
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
1.1 Methoden zur Oberflächen-Strukturierung	3
1.2 Erzeugung Gold-Nanodot-funktionalisierte Oberflächen durch mizellare Nanolithographie	4
1.3 Photochemische Überstrukturierung	7
1.3.1 Photoreaktive Verbindungen	8
1.3.1.1 Beispiele gängiger Photolinker	9
1.3.1.2 Beispiele gängiger Photolabile Schutzgruppen	9
1.3.2 Umlagerung bei ortho-ständiger Nitrogruppen	10
2.3.2.1 Mechanismus der Abspaltung im Fall geschützter Aminogruppen	12
1.4 Oberflächenanalytische Methoden	12
1.4.1 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS)	13
1.4.1.1 Das Prinzip	13
1.4.1.2 Chemische Verschiebung	14
1.4.1.3 Multiplettaufspaltung	15
1.4.1.4 Quantitative Analyse	17
1.4.1.5 Molekulare Zusammensetzung der Adsorbatschicht	19
1.4.1.6 Schichtdickenbestimmung	20
1.4.2 Fluoreszenzmikroskopie	21
1.4.2.1 Allgemeine Grundlagen	21
1.4.2.2 Aufbau der Fluoreszenzmikroskopie	23
1.4.3 Quarzmikrowaage (QCM-D)	24
1.4.3.1 Theoretischer Hintergrund	25
1.4.3.2 Bestimmung der absorbierten Masse	26
1.4.3.3 Viskose Masse	26
1.4.3.4 Der Einfluss von Wasser	27
1.4.3.5 QCM-D-Aufbau	27
1.4.4 Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie (IRRAS)	28

1.4.4.1	Grundlagen der Infrarotspektroskopie	28
1.4.4.2	Modell des harmonischen Oszillators	28
1.4.4.3	Modell des anharmonischen Oszillators	30
1.4.4.4	Schwingungsmoden	30
1.4.4.5	IR-Spektroskopie an Metalloberflächen	31
1.4.5	Kontaktwinkelmessung	32
1.4.6	Rasterelektronenmikroskopie	34
1.5	Übersicht der eingesetzten analytischen Methoden und ihre Information	35
1.6	Adsorption von Thiolverbindungen auf Gold-Oberfläche	37
2.6.1	Ausbildung von Alkanthiolmonolagen auf Goldoberflächen	38
1.7	Das Biotin-Streptavidin-System	40
3	Experimenteller Teil	42
3.1	Materialien und Methoden	42
3.1.1	Plasmaätzer	42
3.1.2	Sputter Coater	42
3.1.3	Chemikalienliste	43
3.2	Verwendete Analysenmethoden	44
3.2.1	NMR-Spektroskopie	44
3.2.2	Massenspektroskopie	44
3.2.3	Elementaranalyse	44
3.2.4	Infrarot-Reflexions-Adsorptionsspektroskopie (IR-RAS)	44
3.2.5	UV-Vis-Spektroskopie	45
3.2.6	Kontaktwinkelmessungen	45
3.2.7	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	45
3.2.8	Fluoreszenzmikroskopie	46
3.2.9	QCM-D Messung	46
3.2.10	Röntgen-Photoemissions-Spektroskopie (XPS)	49
3.3	Allgemeine Synthese von Photosensitiver Alkanthiolen	52
3.3.1	Synthese 3,4-(Methyendioxy)-6-nitroacetophenon (1)	53
3.3.2	Synthese (R,S)-1-(3,4-(Methyendioxy)-6-nitrophenyl)ethanol (2)	54
3.3.3	Synthese (R,S)-1-(3,4-(Methyendioxy)-6-nitrophenyl)ethyl chloroformat (MeNPOC-Cl) (3)	55

3.3.4	11-Tritylsulfanyl-undekansäure (4)	56
3.3.5	1-Tritylsulfanyl-undekansäure- {2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]-ethyl}-amid (5)	57
3.3.6	2-{2-[2-(11-Tritylsulfanyl-undekanoylamino)ethoxy]-ethyl}-ethyl)-carbamid Säure1-(4,5 Methylendioxy-2-nitrophenyl)-ethyl Ester (6)	58
3.3.7	2-{2-[2-(11-Mercapto-undekanoylamino)ethoxy]-ethyl}-ethyl)-carbamid Säure 1-(4,5 Methylendioxy-2-nitrophenyl)-ethyl Ester (7)	60
3.4	Herstellung Gold-Nanodot-funktionalisierter Goldoberfläche	62
3.4.1	Nanostrukturierung von Glasoberflächen	62
3.5	Präparation der Thiolmonolagen auf homogenen Gold-wafer	63
3.6	Photostrukturierung der nanostrukturierten Glasgolddots und der Gold-wafer	65
3.7	Kovalente Immobilisierung von NHS-Biotin und Umsetzung mit Streptavidin AlexaFluor 488	66
4	Ergebnisse und Diskussion	67
4.1.1	XPS-Messung	67
4.1.2	XP-Spektren der Monolagen vor und nach der Bestrahlung	69
4.1.2.1	Das Kohlenstoff (C1s)-Signal vor und nach der Bestrahlung	69
4.1.2.2	Das Stickstoff-(N1s)-Signal vor und nach der Bestrahlung	72
4.1.2.3	Das Sauerstoff-(O1s)-Signal vor und nach der Bestrahlung	74
4.1.2.4	Das Schwefel-(S2p)-Signal vor und nach der Bestrahlung	75
4.1.3	XP-Spektren nach Umsatz mit NHS-Biotin und Streptavidin AlexaFluor 488	77
4.1.3.1	Das Kohlenstoff (C1s)-Signal nach Biotin und Streptavidin-Umsetzung	77
4.1.3.2	Das Stickstoff-(N1s)-Signal nach Biotin und Streptavidin-Umsetzung	79
4.1.3.3	Das Sauerstoff-(O1s)-Signal nach Biotin und Streptavidin-Umsetzung	81
4.2	QCM-D Messung	82
4.3	IR-RAS-Messung	86
4.3.1	Zuordnung der Schwingungen der HS-(CH ₂) ₁₁ -EG ₂ -NPOC-Verbindung	86
4.3.2	Zuordnung der Schwingungen von aktivierten Alkanthiol-Monofilm auf Gold	89
4.3.3	Zuordnung der Schwingungen nach der Ankopplung von NHS-Biotin und Streptavidin AlexaFluor 488	92

4.4	UV-Vis-Spektren	95
4.5	Fluoreszenzmikroskopie	96
4.6	Kontaktwinkelmessung	97
4.7	REM-Aufnahmen	99
5	Zusammenfassung und Ausblick	103
6	Literaturverzeichnis	105
7	Danksagung	111
8	Eidesstattliche Erklärung	113

Abstract

This thesis describes the development of a new method, which enables to coat gold-nanostructured surfaces in a spatial selective manner with a variety of different molecules by irradiation with light.

The arrangement of gold nanoparticles in hexagonal geometries on glass slides is based on the self-assembly of diblock-copolymer micelles. The diameter of these gold nanoparticles is 5 nm and the interparticle distance is 58 nm.

The described method relies on the synthesis and adsorption of a thiol compound, bearing a photo-cleavable MeNPOC protection endgroup. Whereas the thiol head-group facilitates a covalent attachment on the gold-nanostructure via the formation of a gold-sulfur bond, the MeNPOC-endgroup can be cleaved by illumination with light of a wavelength of 419 nm, whereby an amino group is exposed. These so called amino-terminated gold nanodots can consequently be applied for a following coupling of biomolecules, such as proteins. The micro-structuring of interfaces relies on the application of photomasks with a regular hole-pattern which cover the surfaces prior to illumination. In that case photo-cleavage appears only in the area where the mask does not protect the substrate from light exposure. The illuminated areas have the geometry of spherical holes having a diameter of 1000 μm and a hole-to-hole distance of 1000 μm .

Afterwards, the so generated amino-functionalities were used for protein-immobilization at interfaces. Therefore, the first step was to bind a biotin, which results in a formation of an amide. In the following step streptavidin was linked to biotin. Streptavidin presents four receptor regions, where the ligand biotin can be bound in one of these specifically with a very high binding constant of 10^{15} M^{-1} .

For the characterization of the chemically functionalized interfaces different surface sensitive analytical methods were applied, such as Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring (QCM-D), X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Infrared Reflexion Absorption Spectroscopy (IRRAS). This enabled the detection of the thiol adsorption, the elimination of the protection group and the following protein-immobilization. XPS allowed the measurement of the layer thickness for the several reaction steps. These data were in good agreement with the QCM-D results. The application of fluorescence tagged streptavidin enabled the read out successfully structured areas.

In summary, this thesis presents a first step on the way to explore the complex interaction between varieties of laterally immobilized biomolecules in model systems.

Kurzfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Ansatz zur Überstrukturierung, von bereits mit Gold-Nanopartikeln dekorierten Oberflächen, entwickelt. Bei letzteren handelt es sich um Glasoberflächen, die durch die Methode der Mizellaren Nanolithographie mit Gold-Partikeln strukturiert wurden. Diese sogenannten Gold-Nanodots besitzen einen Durchmesser von etwa 5 nm und befinden sich in einem Abstand von etwa 58 nm, in einer hexagonalen Anordnung zueinander.

Diese Gold-Nanostruktur wurde durch Adsorption einer photolabilen Thiolverbindung, die eigens synthetisiert wurde, auf photochemischen Wege im μm -Maßstab überstrukturiert. Neben einer Thiol-Kopfgruppe, welche die Adsorption auf den Gold-Nanopartikel unter Ausbildung einer kovalenten Gold-Schwefel-Bindung ermöglicht, weist diese Verbindung als Kopfgruppe die photolabile MeNPOC-Schutzgruppe auf. Diese kann durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von etwa 419 nm abgespalten werden. Hierbei wird eine Aminogruppe freigesetzt, welche für weitere Kopplungsreaktionen eingesetzt werden kann. Zur photochemischen Strukturierung wurden Photomasken verwendet, die eine reguläre Lochstruktur aufweisen und nach Adsorption der Thiolverbindung auf die Oberflächen aufgelegt wurden. Die Abspaltung der Schutzgruppe findet in diesem Fall nur an den freiliegenden Stellen statt, die der Strahlung exponiert sind. Auf diese Weise ist es möglich, die Struktur der Maske in eine äquivalente aminostrukturierte Oberflächenbeschichtung umzusetzen. Zur Strukturierung wurden hierbei u.a. Lochmasken eingesetzt, die einen Lochdurchmesser von etwa 1000 μm und einen Loch-zu-Loch-Abstand von etwa 1000 μm aufweisen. Die erzeugten Amino-Funktionalitäten wurden anschließend zur Protein-Immobilisierung genutzt. Hierzu wurde zunächst unter Ausbildung einer Amidbindung Biotin gekoppelt und anschließend mit Streptavidin umgesetzt. Letzteres besitzt insgesamt 4 Rezeptorstellen, an denen der Ligand Biotin durch nicht-kovalente Bindungskräfte spezifisch mit einer sehr hohen Bindungskonstante von etwa 10^{15} M^{-1} gebunden werden kann.

Zur chemischen Charakterisierung der erzeugten Monolagen kamen unterschiedliche oberflächenanalytische Methoden, wie z.B. die XPS- und IRRA-Spektroskopie zum Einsatz. Auf diese Weise war es möglich, neben der Thioladsorption sowohl die Schutzgruppenabspaltung und anschließende Protein-Immobilisierung nachzuweisen. Mittels XPS konnten zudem Schichtdicken für die einzelnen Umsetzungsschritte bestimmt werden, anhand derer die einzelnen Umsetzungsschritte ebenfalls gut

belegt werden konnten. Diese zeigten zudem eine gute Übereinstimmung mit den entsprechenden Werten, die mittels QCMD bestimmt wurden.

Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin war es darüber hinaus möglich, die unterschiedlichen Strukturierungsstufen neben rasterelektronenmikroskopischen auch durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen bildgebend nachzuweisen.

Insgesamt stellt die vorliegende Arbeit somit einen ersten Schritt zum Studium abstandsabhängiger Wechselwirkungen in komplexeren biologischen Verbundsystemen dar.

1 Einleitung

Der Einsatz von strukturierten Oberflächen spielt in der Bioanalytik schon seit längerer Zeit eine bedeutende Rolle. In den sogenannten Biochips sind z.B. eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle (Proteine, DNA- oder Peptidsequenzen) im μm -Maßstab schachbrettartig angeordnet. Durch den Einsatz solcher Protein- und DNA-Arrays, kann der Probenverbrauch drastisch reduziert und eine Vielzahl von Wechselwirkungen bei Umsatz mit einem Analyten auf kleinstem Raum analysiert werden. Strukturierte Oberflächen ermöglichen jedoch auch das gezielte Studium abstandsabhängiger Wechselwirkungsprozesse. Im nm-Maßstab können z.B. Zell-Zell-Wechselwirkungen, die sowohl das Zellwachstum als auch einen Zelltod bestimmen, studiert werden.

Ziel dieser Arbeit war nun eine Kombination dieser Ansätze: das gezielte Studium einer Vielzahl von Zell-Zell-Wechselwirkungen in einem Array-basierten Ansatz. Um den Zell-Zell-Kontakt zu ermöglichen, wurden die Oberflächen in einem ersten Schritt zunächst homogen nanostrukturiert. Anschließend erfolgte eine Überstrukturierung dieser Oberflächen, wodurch zusätzlich eine Strukturierung im μm -Maßstab aufgeprägt wurde. Diese zeichnet sich durch unterschiedliche chemische Funktionalitäten aus, wodurch eine strukturierte Immobilisierung von Zellverbänden ermöglicht wird, in denen sich die Zellen untereinander in nano-Kontakt befinden.

Die Nanostrukturierung der Oberflächen erfolgte mit Hilfe der mizellaren Nanolithographie. Hierbei macht man sich den Selbstordnungsprozess Metallsalz-beladener Mizellen auf einer planaren Oberfläche zunutze. Diese ordnen sich bei Adsorption aus einer Lösung in einer hexagonal-dichtesten Packung auf der Oberfläche; eine anschließende Behandlung in einem reduktiven Wasserstoffplasma führt zum Abbau der organischen Mizell-Hülle sowie zur Reduktion des Metalls. Auf der Oberfläche verbleiben so regelmäßig angeordnete Metall-Nanodots. In dieser Arbeit wurde die mizellare Nanolithographie ausschließlich zur Ausbildung von Gold-Nanodots auf planaren Glasoberflächen angewandt.

Die chemische mikro-Strukturierung dieser homogen-nanostrukturierten Oberflächen erfolgte anschließend durch Umsatz mit einer eigens synthetisierten, photoreaktiven Thiolverbindung. Diese adsorbiert unter Ausbildung einer kovalenten Gold-Schwefel-Bindung auf den Nanodots; durch eine folgende Bestrahlung über Photomasken kommt es an den belichteten Stellen zur Abspaltung einer Schutzgruppe, sodass

funktionelle Gruppen freigelegt werden, über welche eine kovalente Ankopplung von Biomolekülen ermöglicht wird.

Zur Demonstration einer solchen Überstrukturierung wurden in einem ersten Schritt zunächst Proteine gebunden. Eingesetzt wurde hierbei das Bindungspaar Biotin / Streptavidin. Die einzelnen Umsetzungsschritte wurden mittels Photoelektronen(XPS)-, Infrarot(IR)- UV-Vis-Spektroskopie, Kontaktwinkelmessungen sowie Rasterelektronen(REM)-Spektroskopie charakterisiert. Durch den Einsatz von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin konnte dessen Immobilisierung zusätzlich mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch den Einsatz von photoreaktiven Thiolverbindungen eine mikromäßige Überstrukturierung von Gold-Nanodot funktionalisierten Oberflächen möglich ist. Die kleinsten Ausmaße der photochemisch erzeugten Strukturen betragen hierbei 500 nm, während zwei benachbarte Gold-Nanodots einen Abstand von etwa 58 nm aufweisen. Die kovalente Anbindung der Proteine in Form der photochemisch erzeugten Strukturen konnte mittels der beschriebenen Methoden eindeutig nachgewiesen und auch visualisiert werden. In zukünftigen Arbeiten ist anstatt einer Proteinfunktionalisierung nun eine strukturierte Immobilisierung von Zellverbänden geplant.

2 Theoretischer Teil

2.1 Methoden zur Oberflächen-Strukturierung

Es sind bereits eine Vielzahl von Methoden bekannt, die zur Mikro- oder Nanostrukturierung von Oberflächen eingesetzt werden können.

Diese werden in die beiden Gruppen der *konventionellen* und *nicht-konventionellen* Strukturierungsmethoden unterteilt.

Konventionelle Methoden zeichnen sich dadurch aus, dass von einer homogenen Oberfläche Bereiche – z.B. auf chemischem Wege durch Ätzen oder Oxidation – entfernt werden, sodass eine Strukturierung resultiert. Zu den *konventionellen Methoden* zählen unter anderem die Elektronen-, Ionen- und Photolithographie. Zum Einsatz kommen hierbei Resist-Materialien, die eine bestimmte chemische Veränderung bei Exposition gegenüber der jeweiligen Strahlung zeigen. Auf diese Weise ist es möglich, dem Material eine bestimmte Struktur aufzuprägen. Eine weitere Unterteilung ist in *direkte* und *indirekte Methoden* möglich. Bei den letzteren wird die Struktur durch Bestrahlung über eine Maske indirekt in das Material eingebrannt. *Direkte Methoden* verwenden dagegen keine Masken; hier wird das Muster direkt in das Material „geschrieben“.

- Photolithographie [1, 2, 3]
 - maximale Auflösung ~ 20 nm bei Einsatz von Röntgenstrahlung ($\lambda = 40$ nm)
 - maximale Ausmaße des strukturierten Bereiches: einige Zentimeter
- Elektronenstrahlolithographie [4, 5, 6]
 - maximale Auflösung ~ 2 nm
 - maximale Ausmaße des strukturierten Bereiches: einige Millimeter
- Ionenstrahlolithographie [4]
 - maximale Auflösung ~ 10 nm
 - maximale Ausmaße des strukturierten Bereiches: einige Zentimeter

Zur Überstrukturierung der homogen nanostrukturierten Oberflächen kam in dieser Arbeit eine photolithographische Methode in Kombination mit einer photoreaktiven Thiolverbindung zum Einsatz. Die theoretischen Grundlagen dieses Ansatzes werden in Abschnitt 2.3.1 beschrieben.

Beispiele *nicht-konventioneller Methoden* sind die dip-pen Nanolithographie, diverse soft-lithographische Drucktechniken und die mizellare Nanolithographie.

- dip-pen Nanolithographie [7]
 - maximale Auflösung ~ 1 nm
 - maximale Ausmaße des strukturierten Bereiches: einige Mikrometer
- soft-lithographische Drucktechniken [8]
 - maximale Auflösung ~ 50 nm
 - maximale Ausmaße des strukturierten Bereiches: einige Mikrometer
- mizellare Nanolithographie [9]
 - maximale Auflösung ~ 2 nm
 - maximale Ausmaße des strukturierten Bereiches: einige Mikrometer

Diese Methoden werden auch als *Bottom-up-Techniken* bezeichnet. Sie bedienen sich der Selbstorganisation einzelner Moleküle oder Cluster.

Die mizellare Nanolithographie kam auch in der vorliegenden Arbeit zur Erzeugung der Gold-Nanodot-funktionalisierten Oberflächen zum Einsatz und wird in Kapitel 2.2 noch eingehender beschrieben.

2.2 Erzeugung Gold-Nanodot-funktionalisierter Oberflächen durch mizellare Nanolithographie

Zur Funktionalisierung der Glasoberflächen mit Gold-Nanodots wurde eine von Spatz et al. [10, 11] entwickelte Methode angewandt. Diese setzt mit einem Goldsalz beladene Mizellen ein, welche sich auf einer planaren Oberfläche in einer hexagonal dichtesten Packung anordnen.

Zur Ausbildung der Mizellen werden Diblockcopolymer eingesetzt. Diese setzen sich aus einem hydrophoben Polystyrol- (PS) und einem hydrophilen, aus Poly-2-Vinylpyridin (P2VP) bestehendem Block zusammen (s. Abb. 1).

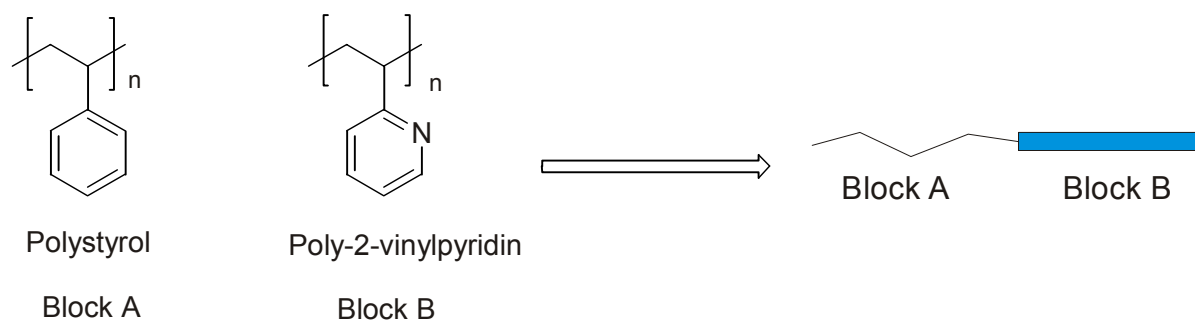


Abbildung 1: Chemische Struktur der eingesetzten Diblockcopolymer

In unpolaren Lösungsmitteln (Toluol) erfolgt dieser Prozess so, dass der unpolare PS-Block die äußere und der polare P2VP-Block die innere Mizellenhülle bildet.

In stark verdünnten Lösungen liegen die Diblockcopolymere als einzelne Ketten vor. Ab einer bestimmten Konzentration, der kritischen Mizellkonzentration (CMC), lagern sich die Diblockcopolymere zu Mizellen zusammen. Diesem Verhalten liegt ein thermodynamisches Gleichgewicht zugrunde. Die treibende Kraft ist ein entropischer Effekt, welche ausgelöst wird durch die Freisetzung von Lösungsmittelmolekülen, die zuvor mit den Diblockcopolymeren assoziiert waren.

Liegt die Konzentration des Polymers unterhalb der CMC, lagert sich der unlösliche Teil des Diblockcopolymers zu monomolekularen Mizellen zusammen (s. Abb. 2)

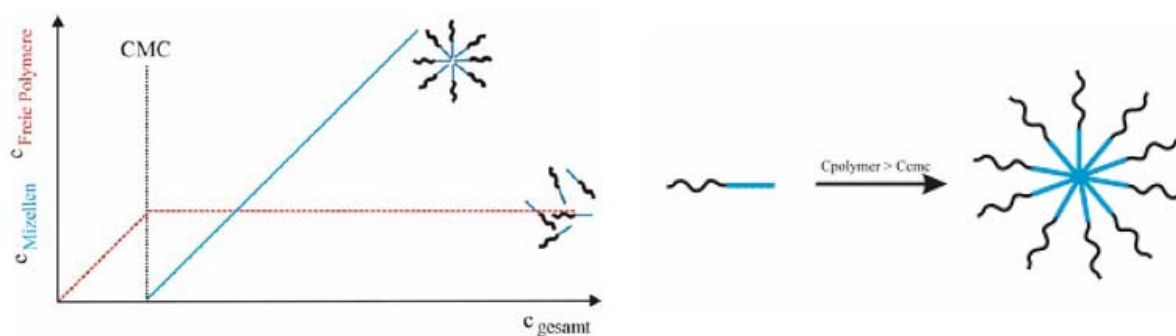


Abb.2: Kritische Mizellkonzentration (CMC) [12]

Die Mizellengröße wird im allgemeinen von der Anzahl der aggregierten Diblockpolymere beeinflusst, die über das Molekulargewicht bestimmt wird.

Wird während der Mizellenbildung Tetrachlorgoldsäure HAuCl_4 zugegeben, so können die Mizellen mit einem anorganischen Komplexsalz beladen werden (s. Abb. 3):

- Das schwach basische Vinylpyridin wird am Stickstoffatom protoniert
- Eine Ladungsneutralisation erfolgt durch Einlagerung von Tetrachloraurat ins Mizellinnere

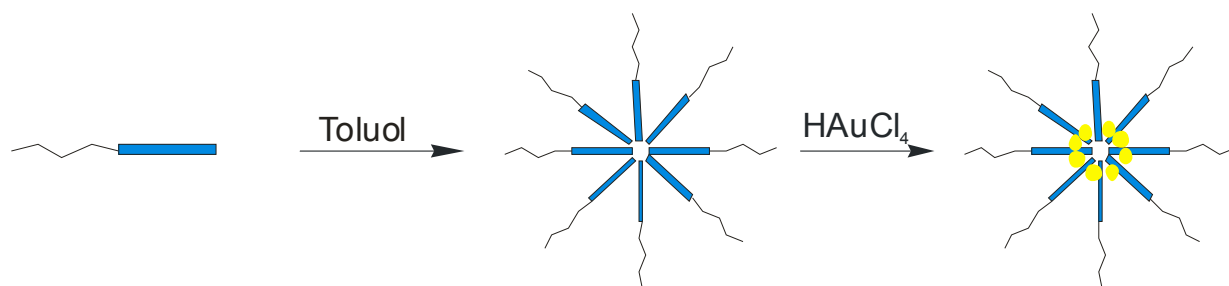


Abbildung 3: Ausbildung einer Mizelle in unpolaren Lösungsmitteln

Die Selbstorganisation der Mizellen auf planaren Oberflächen erfolgt anschließend durch *Dip-Coating*. Hierbei werden die jeweiligen Substrate in die Mizellenlösung getaucht und mit einer konstanten Geschwindigkeit von 12 mm/sec wieder herausgezogen (s. Abb. 4). Bei diesem Prozess kommt es zur Ausbildung lateraler Kapillarkräfte zwischen den adsorbierenden Mizellen.

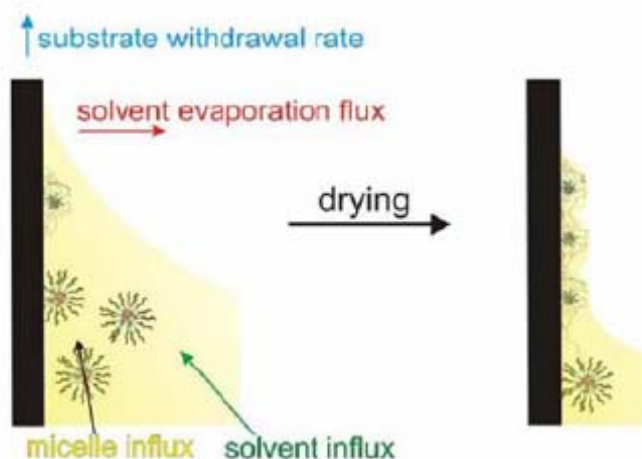


Abb.4: Tauchbeschichtungsprozess zur Strukturierung der Glasoberfläche [13]

Diese führen dazu, dass die Mizellen auf der Oberfläche eine hexagonal-dichteste Packung ausbilden.

Eine folgende Behandlung in einem reduktiven Wasserstoffplasma führt zum Abbau der organischen Mizellenhülle und zur Reduktion der Goldionen. Als Resultat erhält man eine quasi-hexagonale Anordnung elementarer Goldpunkte – der sogenannten Gold-Nanodots (s. Abb. 5).

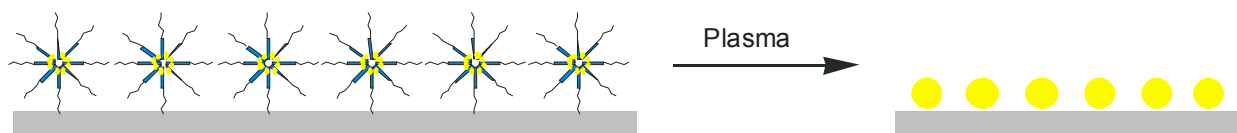


Abb. 5: Ausbildung von Gold-Nanodots durch eine Wasserstoffplasma-Behandlung der adsorbierten Mizellen

Die Größe der Goldpunkte kann durch unterschiedliche Beladung der Mizellen mit Goldsäure erreicht werden [14, 15]. Somit können Goldpunkte mit einem Durchmesser zwischen 3 nm und 8 nm erreicht werden. Der Abstand zwischen den Punkten wird durch die längere der Polymerketten beeinflusst [16, 17].

Die Abbildung 6 unten zeigt einige Goldmizelllösungen zur Nanostrukturierung der Glasoberfläche.

Polymer	c[mg/ml Toluol]	Beladung	Partikelgröße	Abstand
PS(190)-b-P2VP(190)	5	0,2	2±1	28±5
PS(500)-b-P2VP(270)	5	0,5	5±1	58±7
PS(990)-b-P2VP(385)	5	0,5	6±1	73±8
PS(1350)-b-P2VP(400)	5	0,5	8±1	85±9

Abb.6: Größe und Abstand der Goldpunkte in Abhängigkeit des eingesetzten Polymers

In dieser Arbeit kam das Polymer PS(500)-b-P2VP(270) zum Einsatz.

2.3 Photochemische Überstrukturierung

Zur chemischen Überstrukturierung der Nanodot-funktionalisierten Glasträger wurden zunächst photoreaktive Verbindungen auf den erzeugten Goldpunkten kovalent immobilisiert. Eine anschließende Bestrahlung über Photomasken führt an den belichteten Stellen zur Abspaltung einer photolabilen Schutzgruppe, sodass funktionelle Gruppen freigelegt werden, die zu einer kovalenten Immobilisierung von Biomolekülen, wie z.B. von Proteinen, DNA oder ganzer Zellen eingesetzt werden können.

Zunächst erfolgt eine allgemeine Beschreibung häufig eingesetzter Photosysteme und Photoreaktionen. In Abschnitt 2.3.2 wird anschließend das in dieser Arbeit verwendete photoreaktive System genauer dargestellt.

2.3.1 *Photoreaktive Verbindungen*

Chemische Bindungen können bei Einstrahlen von Licht, dessen Energie die der Bindungsenergie überschreitet, gespalten werden. Für die meisten kovalenten Bindungen liegt der erforderliche Energiebereich im fernen UV. Einige Molekülgruppen jedoch besitzen chemische Funktionalitäten, deren Bindungen bereits durch Absorption von längerwelligem Licht (Wellenlängenbereich von etwa 350-450 nm) gebrochen werden können.

Führt die Bestrahlung nach Bindungsbruch zur Ausbildung eines Radikalzentrums an der betreffenden photoreaktiven Gruppe, so kann dieses in einem zweiten Schritt zur radikalischen Addition einer zweiten Verbindung (R-H) eingesetzt werden (s. Tabelle 1). Die betreffende photoreaktive Gruppe wird dann als *Photolinker* [18] bezeichnet. (Der Bindungsbruch kann – muss jedoch nicht – mit der Abspaltung einer funktionellen Gruppe verbunden sein.)

Führt die Bestrahlung lediglich zur Abspaltung eines funktionalen Rests ohne Ausbildung eines Radikalzentrums, so handelt es sich bei der photoreaktiven Gruppe um eine *photolabile Schutzgruppe* [19]. Deren Abspaltung führt zur Freilegung chemischer Funktionalitäten, die anschließend weiter umgesetzt werden können.

2.3.1.1 Beispiele gängiger Photolinker

Photolinker weisen als photoreaktive Gruppe häufig Benzophenone, Phenylazide und Diazirine auf.

Durch die Bestrahlung (eingesetztes Licht liegt meistens im UV-Bereich) entstehen an diesen Gruppen Radikalzentren, die mit einem weiteren Substratmolekül des Typs



eine radikalische Addition eingehen, wobei die C-X-Bindung gespalten wird.

Die Reaktionswege dieser Verbindungen sind sehr verschieden und verlaufen über einen reaktiven, radikalischen Übergangszustand.

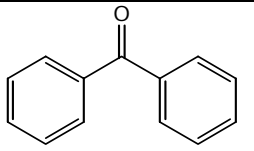
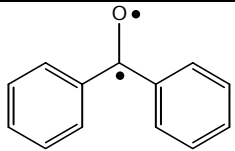
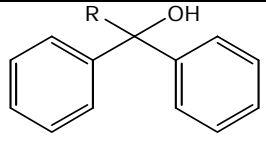
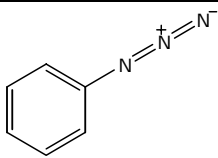
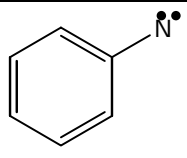
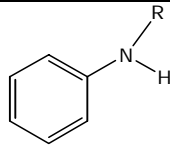
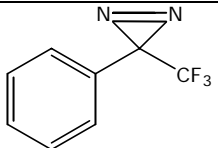
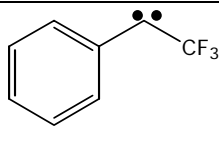
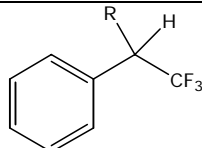
Photolinker	Struktur	Übergangszustand	Reaktion mit R-H
Benzophenone			
Phenylazide			
Diazirine			

Tabelle 1: Kopplungsreaktion der photoreaktiven Verbindungen [18, 20]

2.3.1.2 Beispiele gängiger photolabiler Schutzgruppen

Photolabile Schutzgruppen haben die Aufgabe, funktionelle Gruppen zu blockieren, die im ungeschützten Zustand bei einer bestimmten Reaktion ansonsten ebenfalls umgesetzt würden. Nach Durchführung der betreffenden Reaktion können sie durch eine Bestrahlung, die andere Bindungen im Molekül unbeschädigt lässt, gezielt abgespalten werden.

Folgende Tabelle 2 zeigt einige photolabile Schutzgruppen.

Photolabile Schutzgruppe	Struktur im geschützten Zustand	Struktur nach Schutzgruppen-Abspaltung
NVOC o-Nitroveratryloxy-carbonyl		
MeNPOC 1-(3,4-Methylenedioxy-6-nitrophenyl)-ethyloxycarbonyl		
NPPOC 1-(2-Nitrophenyl)-propyloxycarbonyl		
MNPPOC 1-(3,4-Methylenedioxy-6-nitrophenyl)-propyloxycarbonyl		

Tab. 2: Photolabile Schutzgruppen: Struktur im geschützten Zustand sowie nach Abspaltung der Schutzgruppe [19]

In dieser Arbeit kam die photolabile MeNPOC-Schutzgruppe zum Einsatz.

Bei den in der Tabelle 2 aufgeführten Schutzgruppen handelt es sich ausschließlich um ortho-substituierte, aromatische Nitroverbindungen. Die ortho-ständige Nitrogruppe spielt im Verlauf der photochemischen Schutzgruppen-Abspaltung eine besondere Rolle; der Mechanismus der Schutzgruppen-Abspaltung wird in Abschnitt 2.3.2 ausführlich beschrieben.

2.3.2 Umlagerung bei ortho-ständiger Nitrogruppe

Die MeNPOC-Schutzgruppe, dessen aromatischer Ring eine ortho-ständige Nitrogruppe trägt, besitzt gegenüber anderen photochemisch abspaltbaren Schutzgruppen den Vorteil, dass während der Schutzgruppenabspaltung keine zusätzlichen Radikalfänger benötigt werden. Des Weiteren verläuft die Abspaltung dieser Schutzgruppen quantitativ [21].

Während der Schutzgruppenabspaltung findet bei dieser Schutzgruppen-Klasse eine photochemische Umlagerung statt. Photoreaktionen wie in Abb.7 dargestellt, lassen sich ausnützen, um Schutzgruppen aus blockierten Alkoholen, Phenolen, Carbonsäuren, Aminen photochemisch sehr schonend zu entfernen. Die Oxidationsprodukte sind Verbindungen vom Halbacetal-Typ, die leicht hydrolysiert werden.

Allgemeiner Mechanismus der Schutzgruppen-Abspaltung bei geschützten Alkoholen und Carbonsäuren

Die Umlagerung verläuft wahrscheinlich nach folgendem Weg [22]:

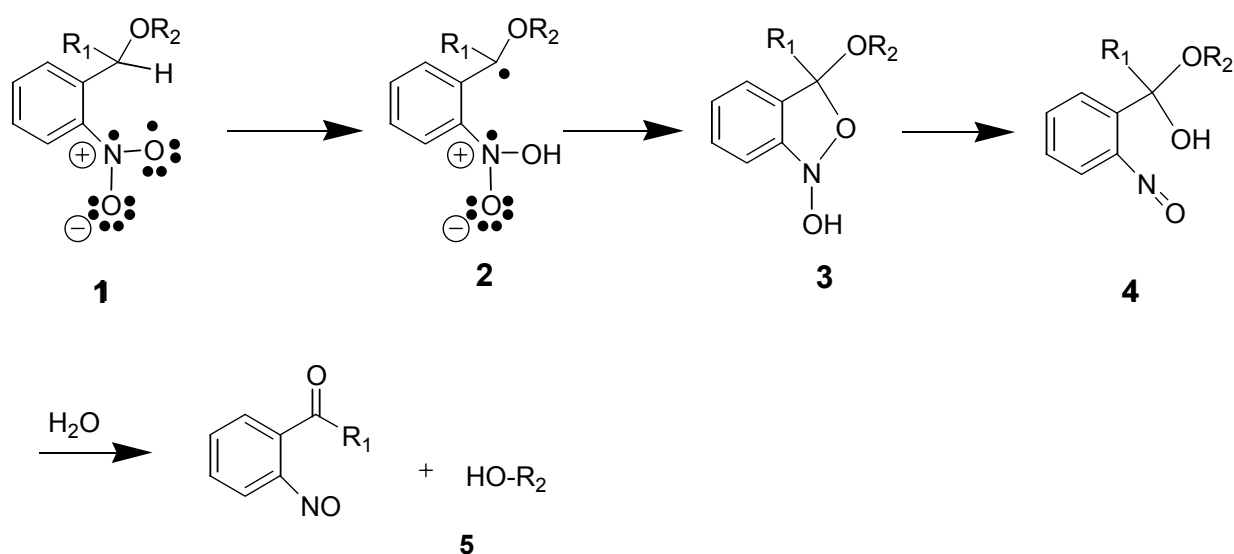


Abb.7: Mechanismus der Elektronentransfer bei ortho-ständiger Nitrogruppe; ($R_1 = \text{H, Alkyl}$; $R_2 = \text{Aryl oder HOOC-CH}_2\text{-NH-CO}$).

Während der Umlagerung wird wahrscheinlich das H-Atom vom β -C-Atom (1) der Alkylgruppe auf das Sauerstoffatom der Nitrogruppe (2) übertragen. Anschließend kommt es zur Bildung von Isoxazolin (3) und die gebildete Hydroxygruppe wird auf das β -C-Atom zurück transferiert. Nach der Hydrolyse wird das Produkt (5) freigesetzt.

2.3.2.1 Mechanismus der Abspaltung im Fall geschützter Aminogruppen

Wird die betreffende Schutzgruppen-Klasse zum Schutz von Aminogruppen eingesetzt (s. Abb. 8 am Beispiel der MeNPOC-Schutzgruppe), so verläuft die Abspaltung wahrscheinlich über den folgenden Mechanismus:

Bei UV-Bestrahlung wird ein Elektron aus einem nichtbindenden n-Orbital in das antibindende π^* -Orbital der Nitrogruppe angeregt (s. Abb. 7, Formel **1**).

In diesem n, π^* -Anregungszustand abstrahiert das radikalische O-Atom der Nitrogruppe das H-Atom der C-H-Bindung (s. Abb. 7, Formel **2**). Schließlich führt eine interne Radikalkombination zum Isoxazolin (s. Abb. 7, Formel **3** und Abb. 8, Formel **3b**). Durch eine Ringöffnungsreaktion unter CO_2 Ausschluss wird schließlich die Aminogruppe wieder freigesetzt (s. Abb. 8, Formel **4b**).

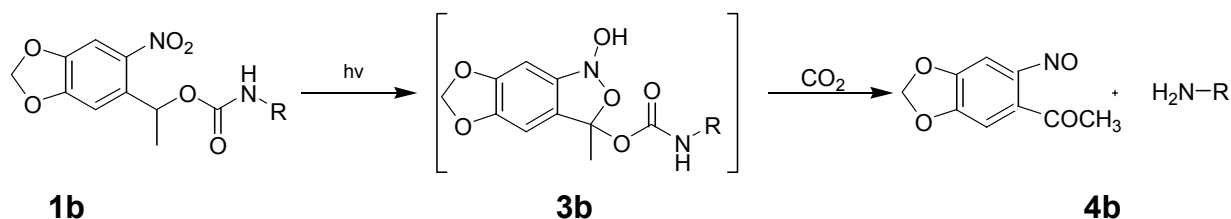


Abb.8: Mechanismus der Schutzgruppenabspaltung im Fall einer geschützten Aminofunktion am Beispiel der photolabilen MeNPOC-Schutzgruppe [23].

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die photolabile MeNPOC-Gruppe zum Schutz einer Aminofunktion eingesetzt.

2.4 Oberflächenanalytische Methoden

Heutzutage kommen eine Reihe von verschiedenen Methoden in der Oberflächenanalytik zum Einsatz. Erst durch die Kombination dieser Methoden ist es möglich, eine umfassende Charakterisierung eines bestimmten chemischen Systems durchzuführen.

Für die Oberflächenanalytik werden die Wechselwirkungen von Teilchen unter Einstrahlung elektromagnetischer Wellen genutzt; dabei können Eigenschaften wie elementare Zusammensetzung, Orientierung der Moleküle, Schichtdicken, Benetzungsverhalten und Oberflächentopographie ermittelt werden.

Im Folgenden sollen die Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen, vorgestellt und grundlegende Prinzipien erläutert werden.

2.4.1 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS)

Ein weit verbreitetes Standardverfahren zur Untersuchung der chemischen Zusammensetzung von Oberflächen ist die Anwendung von XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy), welche auch unter der Bezeichnung ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) bekannt ist. Durch XPS-Messungen kann sowohl die Elementzusammensetzung als auch der chemische Bindungszustand bestimmt werden. Das Verfahren basiert auf dem photoelektrischen Effekt. Dabei wird die Energieverteilung von Rumpfelektronen, die durch Anregung mit Röntgenstrahlung aus einem bestimmten Material emittiert werden, gemessen (s. Abb. 9). Als Röntgenquellen kommen üblicherweise Mg K α - (1253,6 eV) und Al K α - (1486,6 eV) Strahlen zum Einsatz.

Die mittlere freie Weglänge λ_e der Photoelektronen im Festkörper bestimmt die Informationstiefe; sie ist abhängig von der Eindringtiefe der Röntgenstrahlung und beträgt etwa 1 - 10 μm . λ_e ist abhängig von der kinetischen Energie der Elektronen sowie vom Schichtmaterial und beträgt einige nm [24].

2.4.1.1 Das Prinzip

Bestrahlt man eine Oberfläche mit Röntgenstrahlen der Energie $E = h\nu$, so kann aus dem Atomverband ein kernnahes Elektron mit der Bindungsenergie E_B herausgeschlagen werden. Dabei kommt es zum direkten Austritt eines Photoelektrons (Photoeffekt; [25]), sofern die Energie der Röntgenstrahlung größer ist als die Bindungsenergie. Ein Elektron aus einer energetisch höheren Lage kann das entstandene „Loch“ wieder füllen.

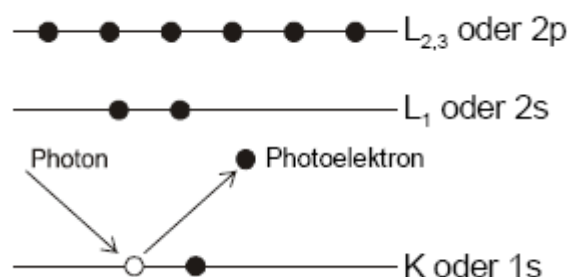


Abb. 9: Darstellung des photoelektrischen Effekts

Die kinetische Energie der emittierten Elektronen beträgt nach der Einstein'schen Formel

$$E_{\text{kin}} = h\nu - E_{\text{B}} \quad (1)$$

Die freigesetzten Photoelektronen werden nun detektiert. Aus ihrer kinetischen Energie lässt sich die Bindungsenergie berechnen. Für jedes Element ist die Bindungsenergie spezifisch und ermöglicht sowohl die Bestimmung des jeweiligen Elements, als auch seine chemische Umgebung.

2.4.1.2 Chemische Verschiebung

Die Bindungsenergie eines Elektrons ist nicht nur elementspezifisch, sondern hängt auch von dessen chemischer Umgebung ab [26, 27]. Die resultierende Änderung der Bindungsenergie liegt im Bereich einiger eV und ermöglicht Aussagen über die chemische Umgebung des betreffenden Atoms. Elektronegativere Nachbaratome vermindern z.B. die Elektronendichte am Zentralatom und verursachen so eine Erhöhung der effektiven Kernladung, welche die Bindungsenergie des betreffenden Photoelektrons erhöht: Dies führt dazu, dass die Rumpfelektronen die Probenoberfläche bei einer niedrigeren kinetischen Energie verlassen. Einen gegenteiligen Effekt bewirken elektropositive Substituenten; sie erniedrigen die effektive Kernladung.

In der Tabelle 3 sind diese Effekte noch einmal zusammenfassend dargestellt.

Substituent	Einfluss auf die kinetische Energie E_{kin}	Einfluss auf die Bindungsenergie (E_{B})
Elektronegatives Atom	niedrigere E_{kin}	höherer E_{B}
Elektropositives Atom	höhrere E_{kin}	niedrigere E_{B}

Tab. 3: Einfluss des Nachbaratoms auf das XP-Spektrum

Die Abbildung 10 zeigt das C1s-Detailspektrum von HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC auf Gold.

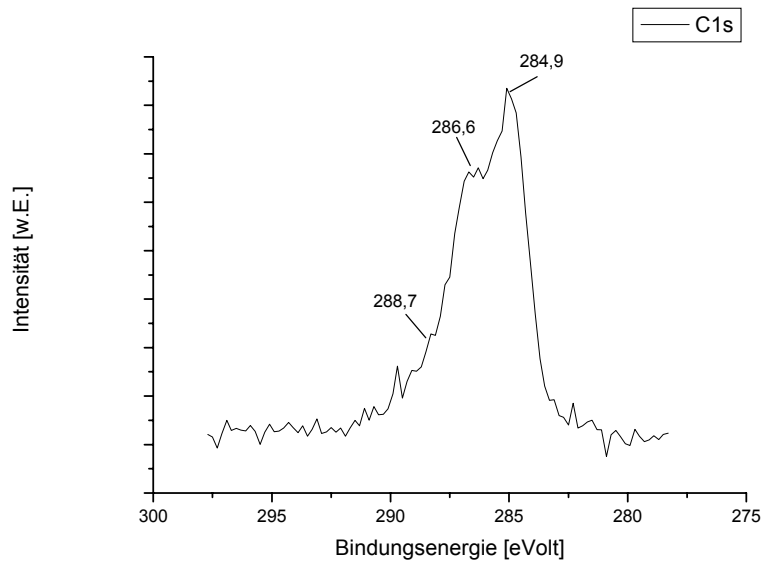


Abb.10: Kohlenstoff-Spektrum von HS(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC Verbindung

Der chemisch unterschiedlichen Kohlenstoff-Atome der Verbindung HS(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC führen zu unterschiedlichen Signallagen im XP-Spektrum. Der Peak bei geringerer Bindungsenergie (284,9 eV) entspricht den aromatischen und dernAlkyl-Kohlenstoffatomen, derjenige bei (286,4 eV) dem Ether-Kohlenstoff und der Peak bei höherer Bindungsenergie (288,4 eV) der Carboxylgruppe.

2.4.1.3 Multiplettaufspaltung

In XPS-Spektren beobachtet man neben Singulettsignalen häufig auch Multiplettsignale. Für das Auftreten von Multiplettstrukturen sind zwei Prozesse verantwortlich:

a) Spin-Bahn-Kopplung

Nach dem Austreten des Rumpfelektrons resultiert ein ungepaartes, kernnahes Elektron. Sein Spin (s) wechselwirkt mit dem Bahndrehimpuls (l) des Orbitals, was als Spin-Bahn-Kopplung bezeichnet wird und den Gesamtdrehimpuls j definiert ($j = l + s$) [28]. Die Stärke der Spin-Bahn-Kopplung steigt mit der Ordnungszahl Z der Atome (\sim zu Z^4) an, welche auch als Schweratomeffekt bezeichnet wird [29]. Der Elektronenspin (s) besitzt zwei Orientierungsmöglichkeiten: er kann parallel ($s = 1/2$) oder antiparallel ($s = -1/2$) zum Bahndrehimpuls ausgerichtet sein, sodass für j die Werte $j=l\pm 1/2$ resultieren und eine Dublettaufspaltung auftritt. Das Intensitätsverhält-

nis der Multiplettlinien wiederum wird durch die Besetzungswahrscheinlichkeit dieser Zustände bestimmt, die sich entsprechend der Multiplizität M nach $M = 2j+1$ berechnet (s. Tab. 4).

Für die Orientierungsquantenzahl des Gesamtdrehimpulses m_j gibt es $2j+1$ Einstellungsmöglichkeiten ($-j \dots j$ mit $\Delta j = 1$).

l=Bahndrehimpuls	Niveau	M = 2j+1	Flächenverhältnis
0	s	1/2	
1	p	1/2, 3/2	1:2
2	d	3/2, 5/2	2:3
3	f	5/2, 7/2	3:4

Tab. 4: Besetzungswahrscheinlichkeit der Zustände

Das Au4f Signal besitzt z.B. einen Bahndrehimpuls von $l = 3$. Hieraus folgt ein Gesamtbahndrehimpuls von $j = 7/2$ bei paralleler und $j = 5/2$ bei antiparalleler Ausrichtung des Elektronenspins s , der eine Dublettaufspaltung von etwa 3.7 eV bewirkt. Die Berechnung der Multiplizitäten für beide Zustände ergibt ein Intensitätsverhältnis von 4:3 (s. Abb. 11).

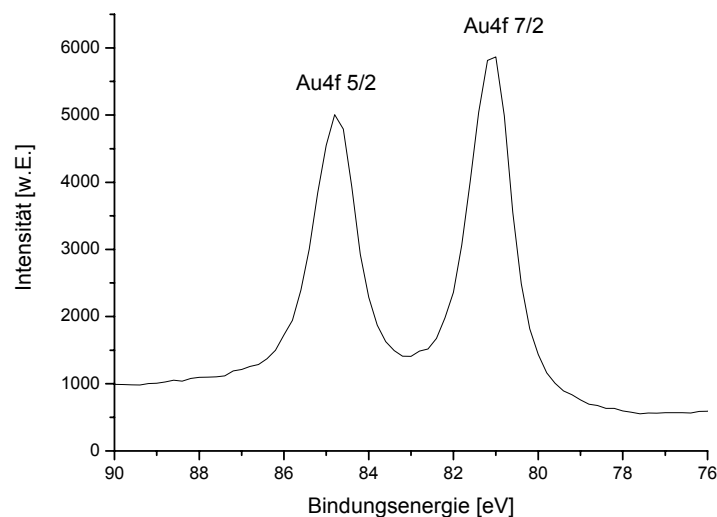


Abb.11: Au4f-Signal von HS(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC auf Gold

b) Spin-Spin-Kopplung

Als Spin-Spin-Kopplung bezeichnet man die Kopplung zwischen dem ungepaarten Rumpfelektron mit einem ungepaarten Elektron aus einem Valenzorbital. Somit tritt dieser Effekt nur bei paramagnetischen Atomen oder Molekülen auf (die im Grundzustand ein ungepaartes Valenzelektron aufweisen). Hierbei kommt es wiederum zu mehr als einem Energiezustand und somit zu einer Signalaufspaltung.

2.4.1.4 Quantitative Analyse

Unter der Annahme, dass die Ionisierungswahrscheinlichkeit (Wirkungsquerschnitt eines Rumpfelektrons) eines kernnahen Elektronenniveaus unabhängig vom Valenzzustand eines Elements (i) ist (Koopman'sches Theorem), ist 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 [30, 36]:

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

$\sigma_i(h\nu)$	Wirkungsquerschnitt für die Emission eines Photoelektrons
$D(E_i)$	Empfindlichkeit des Detektors
E_i	Energieniveau des Rumpfelektrons
γ	Winkel zwischen Einfalls- 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

Diese Gleichung (2) ist für eine numerische Auswertung zu komplex, da einige Parameter quantitativ nicht zugänglich sind (z.B. Detektorempfindlichkeit $D(E_i)$ oder der Photonenfluss J_0).

Eine Vereinfachung ergibt sich aber insofern, als dass diese Variablen als konstant angenommen werden [31].

Auf Grund ihrer Geringfügigkeit können die Einflüsse der räumlichen Ausdehnung der Atomorbitale L_i und des Öffnungswinkels des Analysators φ 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 weiterhin mit relativen anstatt mit absoluten Signalintensitäten gerechnet werden.

Insgesamt folgt aus (2) somit die folgende vereinfachte Gleichung für die Signalintensität:

$$I_i = \sigma_i \cdot N_i \cdot \lambda_i \cdot T(E_i) [1 - \exp(-d_i / \lambda_i \cos \theta)] \quad (3)$$

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 [32, 33]. Die in dieser Arbeit verwendeten Werte sind im experimentellen Teil (s. Tab. 12) aufgeführt. Die Transmissionsfunktion $T(E_i)$ beschreibt die Detektionswahrscheinlichkeit von Elektronen unterschiedlicher Energie und muss für jede XPS-Anlage nur einmal ermittelt werden (sofern an der apparativen Anordnung nichts verändert wird).

Die Intensitätsabschwächung von elektromagnetischer Strahlung, die beim Durchdringen von Materie einer definierter Zusammensetzung und einer Dicke d erfolgt, wird durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben.

$$I_x = I_x^0 \cdot e^{-\alpha d} \quad (4)$$

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

Durch die Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes auf die Photoelektronen-Abschwächung in der XPS, erhält man folgende Gleichung:

$$I_i = I_i^0 \cdot e^{-d / \lambda \cdot \cos \theta} \quad (5)$$

wobei gilt:

$$I_i^0 = \sigma_i \cdot N_i \cdot \lambda_i(E_i) \quad (6)$$

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 die Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Analysatorachse
- λ für die Abschwächungslänge

Bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Messungen betrug θ durchweg 0° , sodass der Ausdruck $\cos\theta$ wegfällt.

2.4.1.5 Molekulare Zusammensetzung der Adsorbatschicht

Es gibt zwei Modelle, welche die Grenzfälle der möglichen Molekülanordnungen auf einer Oberfläche beschreiben.

Schichtmodell

Nach der Chemisorption befinden sich die Moleküle in einer streng geordneten, dicht gepackten Schicht, in der sie gleiche Ausrichtung und Anordnung haben [34]. Auf dieses Modell wird hier nicht näher eingegangen, da es in der vorliegenden Arbeit keine Anwendung fand.

Statistisches Modell

Bei einer statistischen und homogenen Substratverteilung der Elemente A und B, können die Intensitätsverhältnisse der Signale dieser beiden Elemente über die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{\sigma_B}{\sigma_A} \cdot \frac{\lambda_B}{\lambda_A} \quad (7)$$

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

2.4.1.6 Schichtdickenbestimmung

Mit Hilfe der Gleichung $I_x = I_x^0 \cdot e^{-\sigma cd}$ kann die Schichtdicke der abschwächenden Schicht d berechnet werden, welche die Signalintensität des Substrates i mindert [35]. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Trägersystemen handelt es sich um Gold-Substrate, sodass $i = Au$ gesetzt wird:

$$d = \lambda_{Au} \ln \frac{I_{Au}^0}{I_{Au}} \quad (8)$$

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)

2.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

2.4.2.1 Allgemeine Grundlagen

Unter dem Begriff Lumineszenz versteht man allgemein die Leuchterscheinung chemischer Substanzen [28, 37]. Dabei unterscheidet man zwischen

- Photolumineszenz: Anregung durch Photonen (Unterscheidung zwischen Fluoreszenz und Phosphoreszenz)

und der

- Chemilumineszenz: Anregung durch eine chemische oder elektrochemische Reaktion

Bei Raumtemperatur befinden sich alle Moleküle in dem Schwingungsgrundzustand ($u = 0$) des elektronischen Singulett-Grundzustandes (S_0). Erst durch elektromagnetische Bestrahlung findet der Übergang in einen energetisch höheren Zustand (Dauer des Übergangs etwa 10^{-15} s) statt. Aus diesem angeregten Zustand kann das Molekül schnell (in etwa ca. 10^{-12} s) in den Schwingungsgrundzustand des ersten angeregten elektronischen Zustands ($S_1, u'=0$) relaxieren. Die Relaxation kann durch thermische Äquilibrierung (z.B. durch *Schwingungsrelaxation*) oder durch Photonenemission erfolgen. Letztere wird als Fluoreszenz (F) bezeichnet; hierbei findet ein Übergang vom angeregten Singulett-Zustand S_1 (antiparallele Spinanordnung) in den Grundzustand S_0 statt. Dieser ist quantenmechanisch erlaubt, da keine Änderung der Spinorientierung stattfindet.

Bei der Phosphoreszenz hingegen erfolgt zunächst ein Übergang vom angeregten Singulettzustand S_1 in den Triplettzustand T_1 (gleiche Spinorientierung). Dieser Vorgang wird auch als *intersystem crossing* bezeichnet. Später erfolgt unter Aussendung von Licht, der sogenannten **Phosphoreszenz**, der Übergang von T_1 nach S_0 . Dieser ist quantenmechanisch verboten; daher ist die Lebensdauer des angeregten Triplettzustands erheblich größer (ms bis min) als die des angeregten Singulettzustandes. Die Energie des emittierten Lichtes ist geringer als bei der Fluoreszenz, sodass die Phosphoreszenz gegenüber der Fluoreszenz in den längerwelligen Bereich verschoben ist.

Die Moleküle können aber auch unter innerer Umwandlung (*internal conversion*) vom angeregten S_1 -Zustand in den Grundzustand S_0 übergehen (Strahlungslose Desaktivierung).

Die beschriebenen Vorgänge können anhand des Jablonski-Thermschemas (s. Abb. 12) dargestellt werden.

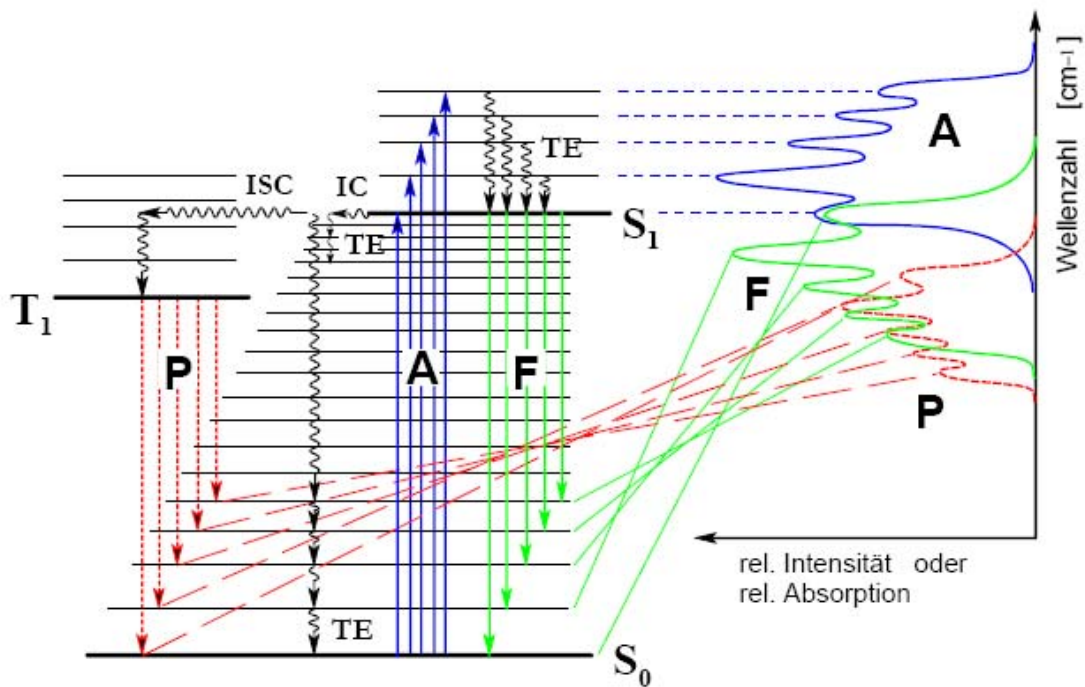


Abb.12: Jablonski-Diagramm [20]

Der Zusammenhang zwischen Konzentration und der Absorption wird durch das Lambert Beersche Gesetz beschrieben. Fällt ein Lichtstrahl mit der Intensität I_0 in eine verdünnte Lösung mit der Konzentration c (mol/l) und der Schichtdicke d (cm), so nimmt die Lichtintensität exponentiell ab; für die Intensität des austretenden Strahls I_T gilt nach Lambert Beer:

$$I_T = I_0 e^{-\alpha \cdot c \cdot d} = I_0 e^{-\epsilon \cdot c \cdot d} \quad (9)$$

Und für die Extinktion gilt demnach:

$$E = \lg I_0 / I_T = \epsilon \cdot c \cdot d = \epsilon \cdot c \cdot N_A \cdot dA \quad (10)$$

α ist der molare und ϵ der molare dekadische Extinktionskoeffizient. Der Extinktionskoeffizient ist eine stoffspezifische Größe, die naturgemäß stark von der Wellenlänge abhängt, aber auch von anderen Größen wie beispielsweise der Temperatur.

2.4.2.2. Aufbau der Fluoreszenzmikroskopie

Bei der Fluoreszenzmikroskopie durchläuft das eingestrahlte Licht (Quecksilberdampflampe) einen Filter, der die Anregungswellenlänge des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs herausfiltert. Dieses Licht trifft auf einen sog. Dichroidischen Spiegel, welcher Licht bis zu einer bestimmten kritischen Wellenlänge reflektiert, Wellenlängen darüber jedoch transmittiert. Er wird so gewählt, dass seine kritische Wellenlänge genau zwischen der Absorptions- und der Emissionswellenlänge des Farbstoffes liegt [38, 39].

Das anregende Licht trifft nun auf die Probe und führt zur Emission von Fluoreszenzlicht. Das emittierte Licht trifft auf einen dichroidischen Spiegel, einen Emissionsfilter und anschließend auf den Detektor (s. Abb. 13).

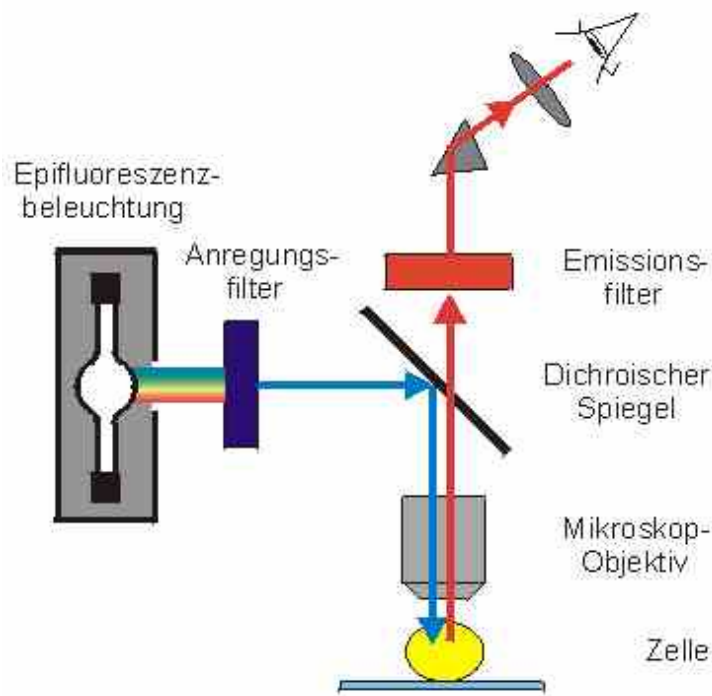


Abb.13: Aufbau von Fluoreszenzspektroskopie [40]

Bei den Fluoreszenzfarbstoffen handelt es sich meist um organische Verbindungen, die ein π -Elektronensystem besitzen. Allgemein zeigen diese Farbstoffe aufgrund einer Oxidation durch reaktive Sauerstoffatome meist Bleachingeffekte. Ist der Fluoreszenzfarbstoff an eine Metalloberfläche gebunden, können das emittierte Fluoreszenzlicht mit den Oberflächenplasmonen des Substrats wechselwirken und so gelöscht werden. Diese strahlungslose Energieübertragung wird auch als sogenannter

Quench-Effekt bezeichnet. Er ist abhängig vom Abstand zwischen dem Farbstoff und der Oberfläche.

Für die Fluoreszenzmikroskopie weiterhin von Bedeutung ist außerdem die maximale Auflösung des Mikroskops, welche durch die Rayleigh-Gleichung beschrieben wird:

$$d = 1,22 \lambda / 2NA \quad (11)$$

In dieser Gleichung steht d für den minimal auflösbaren Abstand zweier Punkte. λ ist die Wellenlänge des Lichtes, mit dem das Objekt betrachtet wird und NA die numerische Apertur.

Da man die Wellenlänge des verwendeten Licht nicht beliebig verkleinern kann, hängt das Auflösungsvermögen hauptsächlich von der numerischen Apertur ab, für die gilt:

$$NA = n \sin \alpha \quad (12)$$

(α = halber Öffnungswinkel des Objektivs; n = Brechungsindex des umgebenden Mediums).

Um die numerische Apertur und somit auch das Auflösungsvermögen zu vergrößern, werden Immersionsöle ($n_{\text{öl}} = 1,5$), welche einen ähnlichen Brechungsindex wie Glas (größer als Luft) besitzen, zwischen Deckglas und Immersionsölobjektiv deponiert. Dadurch wird das Reflexionsvermögen des Lichtes beim Austritt aus dem Deckglas vermindert und der Abstand d verringert. Die NA -Werte können so von etwa 0,95 (Umgebung = Luft) auf etwa 1,4 gesteigert werden.

2.4.3 Quarzmikrowaage (QCM-D)

Bei der QCM-D Technik wird der Energieabfall der gedämpften Schwingung eines Quarzkristalls registriert und die Dissipation D (= Verhältnis zur Gesamtenergie) berechnet.

Auf diese Weise können einzelne Absorptionsprozesse verfolgt und absorbierende Massen im Nanogramm-Bereich bestimmt werden. Die Dissipation liefert zusätzlich Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften der absorbierenden Moleküle.

2.4.3.1 Theoretischer Hintergrund

Die QCM-D – Technik [41, 42] basiert auf dem sogenannten piezoelektrischen Effekt: mit Hilfe von aufgedampften Goldelektroden wird eine elektrische Spannung an den Quarz angelegt, welche diesen zum Schwingen bringt (s. Abb. 14).

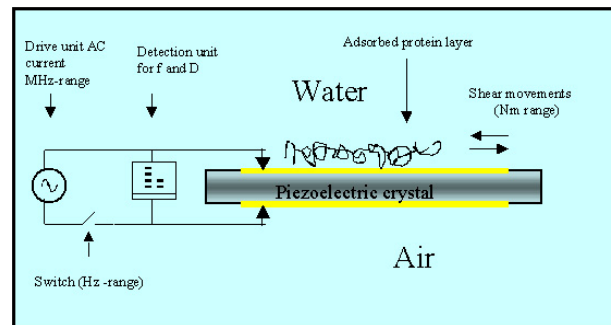


Abb. 14: Schematischer Aufbau eines QCM-D-Messgerätes [41].

Eine Gleichspannung induziert im Kristall eine Scherbewegung, eine Wechselspannung hingegen führt zu Schwingungen des Kristalls. Die Schwingungen des Kristalls wiederum führen zum Aufbau eines elektrischen Feldes im Kristall. Nach Abschalten der Wechselspannung tritt eine Dämpfung dieses elektrischen Feldes auf, welche gemessen werden kann.

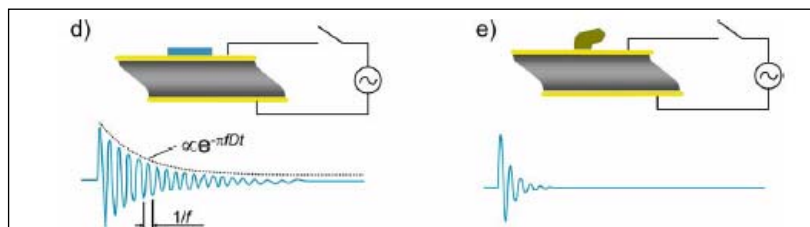


Abb. 15: Auswirkung einer adsorbierten Masse auf Frequenz- und Dissipationsänderung [41].

- Adsorption einer rigiden Masse
- Adsorption einer viskoelastischen Masse

Eine gedämpfte Schwingung wird durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$A(t) = A_0 \cdot e^{-(\pi f D t)} \cdot \sin(2\pi f t + \theta) \quad (13)$$

- A_0 = Anfangsschwingung
 f = Frequenz
 D = Dissipation
 Θ = Phasenwinkel

2.4.3.2 Bestimmung der absorbierten Masse

Grundlage einer Verfolgung von Adsorptionsprozessen ist nun, dass die Resonanzfrequenz des Kristalls durch eine adsorbierte Masse verändert wird. Nach Sauerbrey gilt:

$$\Delta m = -\frac{v_q \rho_q}{2f_0^2} \frac{\Delta f_n}{n} = -C \frac{\Delta f_n}{n} \quad (14)$$

n = n -ter Oberton (ungerade: 1, 3, 5, ...)

v_q = Schallgeschwindigkeit im Kristall (3340 m/s)

ρ_q = Dichte des Quarzes (2,65 g/cm³)

f_0 = Eigenfrequenz des Quarzes ($f_0 = v_q / 2 t_q$, 5 MHz)

Δf_n = Frequenzänderung des Obertons n

t_q = Dicke des Kristalls

C = Massensensitivitätskonstante (17,7 ng/cm² Hz, $v_q \wedge \rho_q$)

Die Änderung der Resonanzfrequenz ist somit proportional zur adsorbierenden Masse.

Durch die Messung der Frequenzänderung und Dissipation ist es außerdem möglich, Rückschlüsse auf die viskoelastischen Eigenschaften eines adsorbierenden Materials zu treffen: handelt es sich um eine flache und rigide Masse, so schwingt der Kristall nur langsam ab und man beobachtet eine geringe Dissipation. Dagegen zeigen weiche und viskose Massen (z. B. Matrices, die viel Wasser einlagern können) einen hohen Dissipations-Wert, sodass die Kristallschwingung deutlich schneller abklingt.

Die Gleichung (14) stellt allerdings nur eine Näherung dar, die nur im Vakuum oder in Gasen und nur für rigide Festkörper bedingungslose Gültigkeit hat. Bei der Quantifizierung biologischer Materialien stößt sie somit an ihre Grenzen, da sich diese meist in wässriger Lösung befinden und in der Regel auch nicht starr sind.

2.4.3.3 Viskose Masse

Für die rein viskosen Newtonschen Flüssigkeiten (konstante Viskosität η) kann die Änderung der Frequenz (Δf) und der Dissipation (ΔD) nach der folgenden Gleichung (16 und 17) berechnet werden:

$$\Delta f = \frac{1}{\sqrt{\pi v_q \rho_q}} \sqrt{nf_0^3 \eta_l \rho_l} = 0,64 \cdot 10^{-7} \frac{\text{m}^2 \text{s}}{\text{kg}} \cdot \sqrt{nf_0^3 \eta_l \rho_l} \quad (16)$$

$$\Delta D = \frac{2}{\sqrt{\pi v_q \rho_q}} \sqrt{\frac{f_0}{n} \eta_l \rho_l} = 1,27 \cdot 10^{-7} \frac{\text{m}^2 \text{s}}{\text{kg}} \cdot \sqrt{\frac{f_0}{n} \eta_l \rho_l} \quad (17)$$

Hier spielt somit die Viskosität η_l und die Dichte ρ_l der adsorbierten Flüssigkeit eine entscheidende Rolle.

2.4.3.4 Der Einfluss von Wasser

Da QCM-D Messungen in Lösung erfolgen, muss stets beachtet werden, dass die Feuchtmasse (hydratisierte Masse) und nicht die Trockenmasse bestimmt wird. Die Trockenmasse kann z.B. mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) oder der Ellipsometrie bestimmt werden. In wässriger Lösung trägt auch das gebundene Hydratwasser zum QCM-D-Signal bei. Je nach Umgebung wirkt es als ein starrer Körper, eine Flüssigkeit oder wie eine viskoelastische Substanz.

2.4.3.5 QCM-D – Aufbau

Diese flüssige Probe wird auf einer konstanten Temperatur von 24°C gehalten und über eine peristaltische Pumpe mit konstanter Fließgeschwindigkeit (20 $\mu\text{l}/\text{min}$) in die Gerätekammer eingeleitet, in der sich der Kristall befindet.

Hier erfolgt die Messung der mit einer Adsorption verbundenen Frequenz- und Dissipationsänderung.

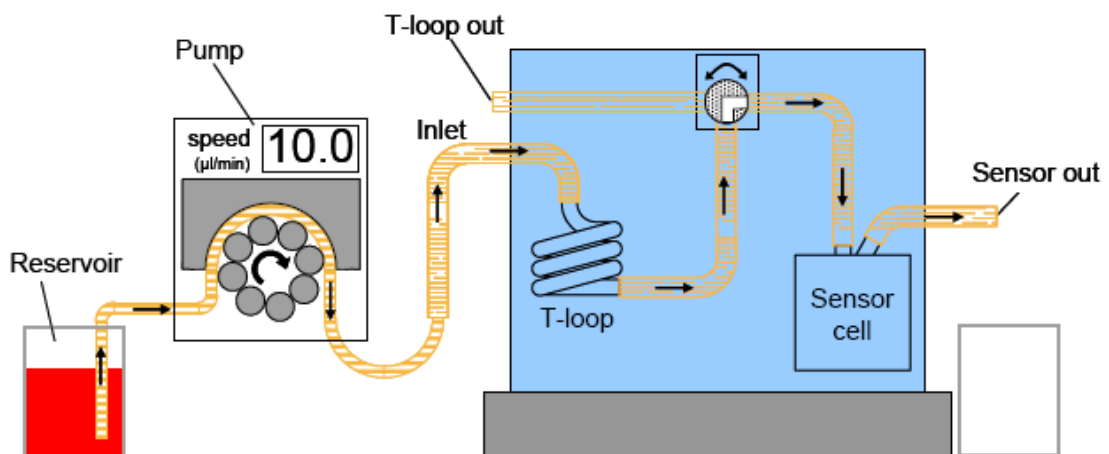


Abb.16: Aufbau des QCM-D-Messgerätes [41]

2.4.4 Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie (IRRAS)

2.4.4.1 Grundlagen der Infrarotspektroskopie

Für die infrarotspektroskopischen Untersuchungen wird Licht im infraroten Spektralbereich (800 bis 4000 cm^{-1}) durch die Probe gestrahlt. Durch die Wechselwirkung mit der IR-Strahlung beginnt das Molekül zu rotieren und zu schwingen. Die Absorptionsmaxima sind charakteristisch für bestimmte Molekülschwingungsübergänge und erlauben daher eine Zuordnung zu bestimmten funktionellen Gruppen.

Auswahlregel

IR aktiv sind nur solche Moleküle, die ein permanentes oder induziertes Dipolmoment aufweisen. Moleküle, die symmetrisch zum Symmetriezentrum sind, lassen keine Änderung des Dipolmoments zu und sind deshalb nicht IR-aktiv [43].

2.4.4.2 Modell des harmonischen Oszillators

Die Entstehung von Schwingungsspektren kann anhand des harmonischen Oszillator-Modells erklärt werden:

Der harmonische Oszillator besteht aus einer Spiralfeder, welche an einer Wand befestigt ist. Am Ende dieser Spiralfeder befindet sich ein Massepunkt, dessen Bewegungsrichtung auf die x-Richtung beschränkt ist (s. Abb. 17).



Abb.17: Grafische Darstellung der Spiralfeder

Wird der Massepunkt durch die Dehnung der Feder um die Strecke x aus der Ruhelage gebracht, so wird der Massepunkt mit der Federkraft

$$F = -kx \text{ (Hookesches Gesetz)} \quad (17)$$

in Richtung der Ruhelage zurückgezogen. Dabei steht F für die Kraft, k für die Federkonstante, welche ein Maß für die Bindungsstärke zwischen den Atomen ist und x für die Auslenkung aus der Ruhelage.

Zur Bewegung des Massepunkts aus der Ruhelage wird eine potentielle Energie benötigt. Sie besitzt am Ort x die Energie $V=1/2kx^2$. An der Gleichgewichtslage $x=0$ beträgt die potentielle Energie $V = 0$.

Die Gesamtenergie E (Summe aus kinetischer Energie T und der potentiellen Energie V) bleibt konstant. Daher besitzt der Massepunkt in der Gleichgewichtslage die maximale kinetische Energie ($T=E$).

Für den einfachsten Fall eines zweiatomigen Moleküls gilt für die Schwingungsfrequenz:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \qquad \mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2} \qquad (18)$$

(μ = reduzierte Masse)

Daraus folgt, dass Molekülschwingungen von Gruppen, die stärkere chemische Bindungen und Atome mit kleinerer Masse enthalten, im IR-Spektrum bei höherer Wellenzahl (höherer Energie) erscheinen.

Die Gesetze der Quantenmechanik erlauben jedoch nur diskrete Werte für die Schwingungsenergie des harmonischen Oszillators:

$$E_\nu = (\nu + 1/2)h\nu \qquad (19)$$

ν = Frequenz

ν = 0,1,2... Schwingungsquantenzahl

h = $6.626 \cdot 10^{-34}$ Js Planck Konstante

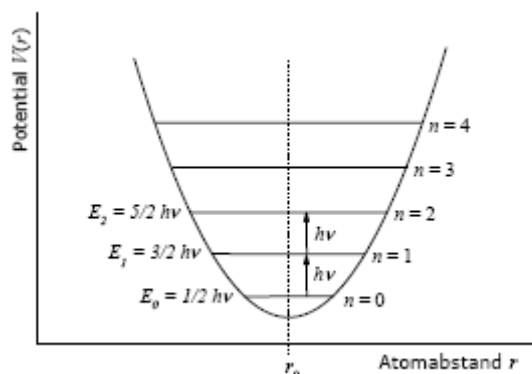


Abb.18: Harmonische Potential mit verschiedenen Energieniveaus

Für den Schwingungsgrundzustand ($v = 0$) gilt:

$$E_v = (1/2)h\nu \quad (20)$$

Das bedeutet, dass immer eine Grundschiwingung vorhanden ist.

Für erlaubte Schwingungsübergänge gilt:

$$\Delta v = \pm 1 \quad (21)$$

Demnach sind nur Übergänge zwischen benachbarten Niveaus erlaubt.

2.4.4.3 Modell des anharmonischen Oszillators

Wird die chemische Bindung stark gedehnt und gestaucht, so verliert das harmonische Modell seine Gültigkeit. Der Potentialverlauf ist nicht mehr harmonisch, sondern asymmetrisch aufgebaut: innen ist die Potentialkurve steil, weil die Elektronenhüllen sich gegenseitig abstoßen; außen ist sie jedoch flach, weil die Bindungskraft mit wachsendem Kernabstand abnimmt. Die Schwingung kann in diesem Fall durch die anharmonische Morse-Potentialkurve beschrieben werden.

2.4.4.4 Schwingungsmoden

Die Zahl der möglichen Schwingungsmoden nimmt mit der Zahl der Atome zu. Bei linearen Molekülen mit N Atomen treten $3N-5$ und bei gewinkelten Molekülen $3N-6$ Normalschwingungen auf.

Es kommen zwei Arten von Gruppenschwingungen vor:

- Valenzschwingungen, bei denen sich die Länge der Bindungen ändert
- Deformationsschwingungen, die mit einer Änderung des Bindungswinkels verbunden sind

In den meisten Fällen treten beide Schwingungsarten miteinander gekoppelt auf. Deshalb kommt es zu Verschiebungen der Resonanzfrequenz, die nicht exakt berechnet werden können. Dies ist die Ursache dafür, dass lediglich für Atomgruppen charakteristische Frequenzbereiche angegeben werden können.

2.4.4.5 IR-Spektroskopie an Metalloberflächen

Die IR-Spektroskopie kann auch zur Analyse von Molekülen eingesetzt werden, die auf einer Metalloberfläche immobilisiert sind. Dabei fällt das eingestrahlte IR-Licht bei konstantem Einfallswinkel auf die Oberfläche und wird reflektiert – daher die Bezeichnung *Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie (IRRAS)*. Hierbei kommt es zu einer Wechselwirkung mit den Molekülen auf der Metalloberfläche.

Für die IR-Spektroskopie an Metalloberflächen gelten weitere Auswahlregeln, die es ermöglichen, zusätzlich Informationen über die Orientierung der Moleküle zu erhalten, die an der Metalloberfläche adsorbiert sind. Diese sind auf das sogenannte *Spiegelladungsprinzip* zurückzuführen:

An der Oberfläche kann man das E-Feld der eingestrahnten Welle in zwei Komponenten zerlegen, die einmal senkrecht (E_z) und zum anderen parallel (E_x) zur Oberfläche verlaufen. Bei der Wechselwirkung des elektrischen Anteils des IR-Lichts (E) mit der Metalloberfläche kommt es nun zur Verschiebung der frei beweglichen Elektronen im Metall. Infolgedessen wird das Metall an der Oberfläche polarisiert. Die parallel zur Oberfläche gerichtete Komponente des E_x -Feldes verursacht eine parallele Verschiebung von Elektronen zur Oberfläche. Diese Polarisation ist dem äußeren Feld (E) entgegengerichtet. Die Ladungsverschiebung erfolgt genau so lange, bis das äußere und das durch die Polarisation erzeugte Feld (E_s) auf der Oberfläche gleich stark sind. Dann addieren sich die beiden Felder zu Null und heben sich somit auf. Die senkrecht zur Oberfläche gerichtete Feldkomponente (E_z) erzeugt hingegen ein Polarisationsfeld, das dem äußeren Feld gleichgerichtet ist und sich zu diesem hinzu addiert [34]. Es kommt so zu einer Verstärkung der Normalkomponente des einfallenden Feldes.

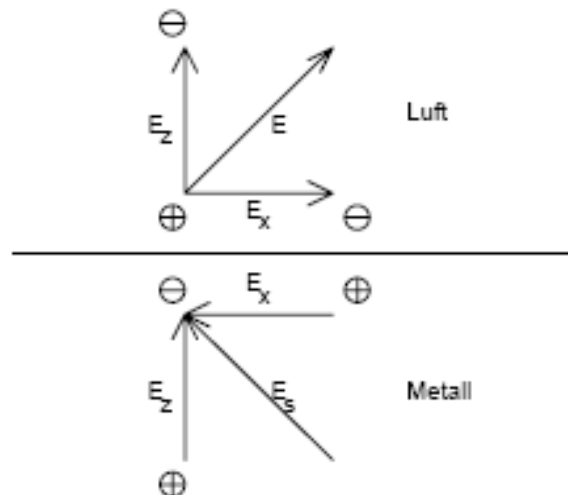


Abb. 19. Grafische Demonstration des Spiegelladungsprinzips [44]

Da die Parallelkomponente des IR-Lichts aufgrund des Spiegelladungsprinzips nahezu verschwindet, können mit der IRRAS nur Molekülschwingungen detektiert werden, die eine Dipolmomentänderung senkrecht zur Oberfläche zeigen. Schwingungen, die nur eine Dipolmomentänderung in der x,y-Richtung aufweisen, können aufgrund mangelnder Feldintensität hingegen nicht angeregt werden.

Die Intensität I_z der Schwingung eines Adsorbatmoleküls ist proportional zum Betragsquadrat des Übergangsdipolmoments μ und dem Kosinus des Winkels θ zwischen der Richtung des Übergangsdipolmoments und der Oberflächennormalen:

$$I_z \sim |\mu \cdot \cos\theta|^2 \quad (22)$$

Daraus folgt, dass mit Hilfe der IRRAS außerdem auch Auskünfte über die Ordnung und Orientierung des Oberflächenadsorbats erhalten werden können.

2.4.5 Kontaktwinkelmessung

Die Benetzbarkeit einer Oberfläche lässt sich mit Hilfe von Kontaktwinkelmessungen bestimmen.

Der Kontaktwinkel θ ist der Winkel, den man nach Aufbringen eines Flüssigkeitstropfens auf eine Festkörperoberfläche messen kann, indem man im Dreiphasenpunkt fest/flüssig/gasförmig eine Tangente an die Grenzfläche 1/v legt und den Winkel zwischen dieser Tangente und der Festkörperoberfläche bestimmt (s. Abb. 20).

Man unterscheidet zwischen dem *Fortschreitwinkel*, der bestimmt wird, indem man während der Messung zusätzliche Flüssigkeit zuführt und dem *Rückschreitwinkel*, bei dessen Bestimmung dem Wassertropfen während der Messung Flüssigkeit entnom-

men wird. In der Regel liegen die Werte für den Fortschreitwinkel über den Werten für den Rückschreitwinkel.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Fortschreitwinkel bestimmt.

Mit Hilfe der Youngschen Gleichung kann quantitativ die Oberflächenspannung (Grenzflächenspannung) σ_{ij} an den Zweiphasengrenzen bestimmt werden:

$$\cos \Theta = (\sigma_{sg} - \sigma_{sl}) / \sigma_{lg} \quad (23)$$

- σ_{lg} = Oberflächenspannung der Flüssigkeit
- σ_{sg} = Freie Oberflächenenergie des Festkörpers
- σ_{sl} = Grenzflächenenergie zwischen Flüssigkeit und Festkörper
- Θ = Kontaktwinkel

Die Oberflächenspannung ist ein Maß für die Energie, die benötigt wird, um die Grenzfläche zwischen den zwei Phasen zu vergrößern. Sie wird als Vektor dargestellt, der ausgehend vom Dreiphasenkontakt in die Richtung der Grenzfläche zeigt.



Abb. 20: Kontaktwinkel eines auf einer Festkörperoberfläche aufliegenden Wassertropfens [45]. links: hydrophile Oberfläche (kleiner Kontaktwinkel); rechts: hydrophobe Oberfläche (großer Kontaktwinkel)

Die Größe des Kontaktwinkels hängt von der Wechselwirkung zwischen Flüssigkeit und Oberfläche ab. Ein großer Kontaktwinkel ist auf eine geringere Benetzbarkeit zurückzuführen; d.h., dass die Wechselwirkung zwischen Flüssigkeit und Oberfläche gering ist und der Tropfen nur eine geringe Auflagefläche besitzt [46, 47].

Bei einer starken Wechselwirkung zwischen Oberfläche und Flüssigkeit versucht der Tropfen die Kontaktfläche dagegen zu maximieren und die Tropfenform ist flach.

Wird Wasser als Kontaktflüssigkeit eingesetzt, so gelten die folgenden Aussagen:

Hydrophile Oberflächen, die z.B. eine OH-, COOH- oder NH₂-Terminierung aufweisen, ergeben einen geringeren Kontaktwinkel; hydrophoben Oberflächen mit Endgruppen wie -CH₃ oder -CF₃ weisen dagegen einen Kontaktwinkel um 90° auf.

2.4.6 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM oder engl. SEM, scanning electron microscopy) können Oberflächen abgebildet werden. Dabei wird die Probenoberfläche mit einem fein gebündelten Elektronenstrahl, der von einer Elektronenkanone im Vakuum erzeugt wird, abgerastert.

Der Elektronenstrahl wird mit Hilfe eines Kondensator-Systems auf die Probe fokussiert und zeilenweise über den zu untersuchenden Probenbereich geführt.

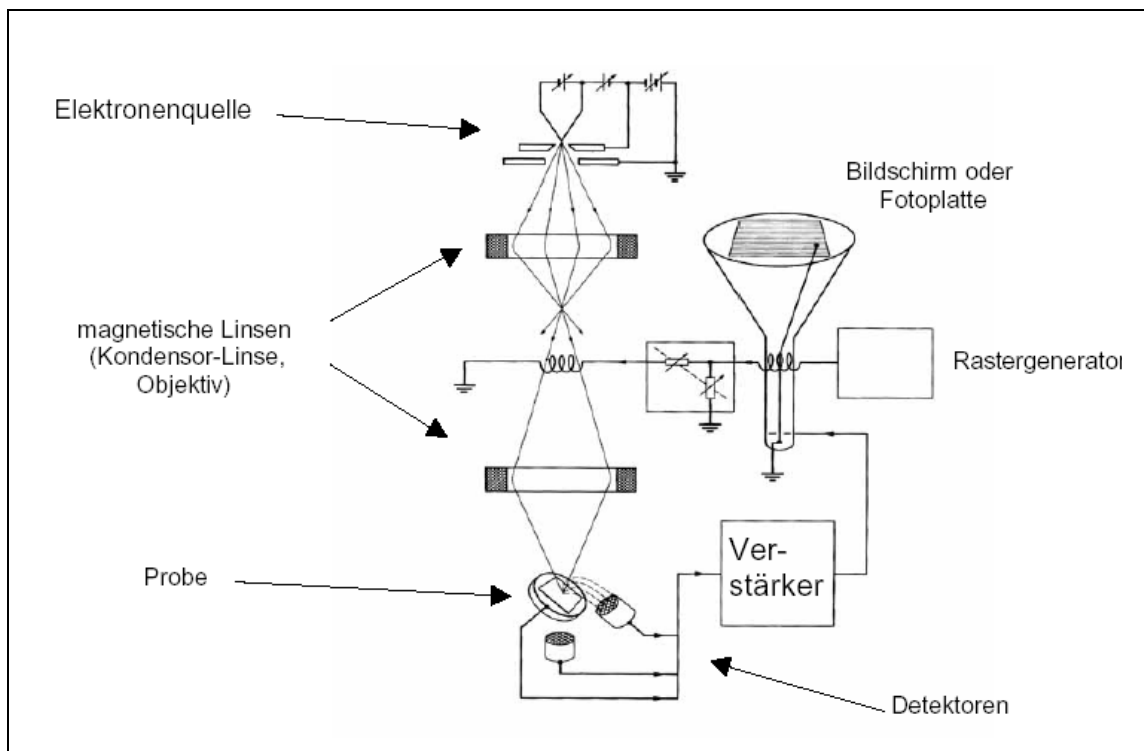


Abbildung 21 : Schematischer Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops[99, 102]

Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops

Die Hauptbestandteile eines Elektronenmikroskops sind (s. Abb. 21.):

- die Elektronenkanone
- die Elektronenlinsen
- das Vakuumsystem
- die Probenhalterung
- die Detektoren

Die Elektronenkanone erzeugt die freien Elektronen. Durch das Erhitzen einer Wolfram-Kathode werden Elektronen freigesetzt und durch den Wehnelt-Zylinder in Richtung einer ringförmig um die Strahlachse liegenden Anode hin beschleunigt. Zwischen Anode und Kathode liegt eine Hochspannung, die je nach Mikroskop von wenigen kV bis zu drei MV variiert; diese bestimmt die Beschleunigung der Elektronen.

Die Elektronenlinsen können die Flugbahnen der Elektronen ablenken. Meistens werden magnetische Linsen verwendet, in der Elektronenkanone zum Teil auch elektrostatische.

Elektronenlinsen haben die gleiche Funktion wie Glaslinsen im Lichtmikroskop.

Während die Brennweite der Glaslinsen festliegt, ist sie bei Elektronenlinsen regelbar.

Die Detektoren registrieren die Primärelektronen selbst oder Sekundärelektronen. Durch die Einwirkung des Elektronenstrahls auf die Oberfläche erhält man rückgestreute Elektronen. Dies sind Elektronen aus dem Strahl des REM (*Primärelektronen*), die von der Oberfläche oder tieferen Schichten des Präparates gestreut werden. Sie geben keine Information über die Oberflächenbeschaffenheit des Präparates.

Durch einen inelastischen Stoß des Elektronenstrahls mit einem Elektron eines Atoms kann ein Elektron aus seiner Hülle geschlagen werden (*Sekundärelektron*). Diese Sekundärelektronen sind energieärmer als die gestreuten Elektronen. Über einen Kollektor werden sie aufgefangen, über einen Plastik-Szintillator in eine Lichtwelle umgewandelt und mit Hilfe eines Photovervielfachers verstärkt. Ein Richtstrahler bildet die Information dann auf einem Bildschirm ab. Je nach Neigung des Präparates zum Kollektor lässt sich der Kontrast des Bildes erhöhen.

2.5 Übersicht der eingesetzten analytischen Methoden und ihre Information

Untersuchungsmethode	Informationsgehalt
Photoelektronen-Spektroskopie (XPS)	Quantitative Elementanalyse; Schichtdicken, Sensitivität gegenüber chemischer Umgebung
Rasterelektronenmikroskopie (REM)	Morphologie der Oberfläche
Infrarot-Absorptions-Spektroskopie	Molekulare Orientierung, Bindungsbildung
Kontaktwinkelmessung	Benetzbarkeit (z.B. Hydrophobie bzw. Hydrophilie) der Oberfläche
Fluoreszenzspektroskopie	Anregung des Farbstofflinkers
UV/vis-Spektroskopie	Absorptionsmaxima der funktionellen Gruppe
Quarzkristallmikrowaage (QCM-D)	Messung von Adsorptionsprozessen, viskoelastische Eigenschaften
^1H -NMR	Chemische Verschiebung von Verbindung
Massenspektroskopie	Massenbestimmung von Substanz

Tabelle 5: Untersuchungsmethoden und ihre Information

2.6 Adsorption von Thiolverbindungen auf Goldoberflächen

Allgemeines

Alkanthiole bilden durch Ausbildung einer Gold-Schwefelbindung auf einer Goldoberfläche spontan selbst-organisierende Monolagen (SAM) aus. In einer verdünnten Thiollösung führt dies zur Ausbildung einer zweidimensionalen, kompakten, geordneten Schicht der adsorbierenden Moleküle [48, 49].

In vergangenen Zeiten konnte die hohe Ordnung dieser SAMs (Self-Assembled Monolayers) durch verschiedene Methode, wie z.B. durch LEED- (Low Energy Electron Diffraction) [50], Röntgenbeugungs- [51], IR-RAS- (Infrared Reflection Absorption Spectroscopy) [52], STM- (Scanning Tunneling Microscopy) [53], SFG- (Summenfrequenzspektroskopie) [54] und NEXAFS-Messungen (Near Edge X-ray Absorption Fine Structure) Spectroscopy [55] nachgewiesen werden.

Die Struktur der adsorbierenden Moleküle besitzt drei verschiedene Funktionsbereiche:

- Als **reaktive Kopfgruppe** fungiert die Thiolgruppe, welche die Adsorption auf der Oberfläche ermöglicht. Die Chemisorption erfolgt exotherm und führt zur Ausbildung einer kovalenten Bindung.
- Eine längere Molekülkette (auch **Spacer** genannt), welche durch zwischenmolekulare Wechselwirkungen zur Einstellung einer hohen Packungsdichte führt. Dies kann eine Alkylkette oder ein aromatisches System sein. Zwischen den Ketten können van-der-Waals Wechselwirkungen, sowie elektrostatische Kräfte auftreten; außerdem können sich Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden [56], [57], [58].
- Eine **funktionelle Endgruppe**, wie z.B. OH-, COOH- oder NH₂-Gruppen. Diese Terminierung bestimmt die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberfläche.

Dies beeinflusst beispielsweise die Benetzbarkeit der Oberfläche, elektrochemische Eigenschaften und Resistenz gegenüber Adsorption von Molekülen.

Die bei der Adsorption freiwerdende exotherme Energie beträgt im Falle einer Alkylkette durch die auftretenden van-der-Waals Wechselwirkungen etwa 1 kcal/mol pro Methyleneinheit [59]. Mit zunehmender Alkylkettenlänge steigt die Ordnungsgeschwindigkeit [60].

Weisen die adsorbierenden Moleküle funktionelle Gruppen auf, so können zusätzliche Kräfte und Wechselwirkungen auf den Ordnungsprozess Einfluss nehmen.

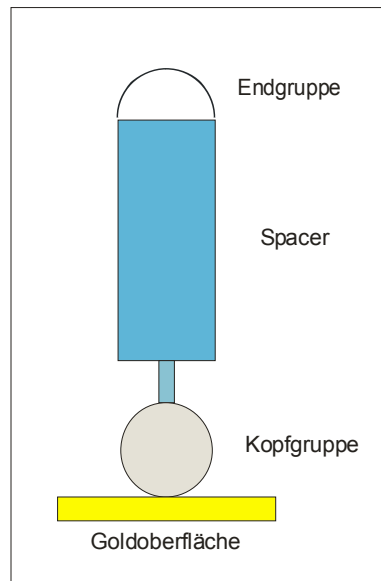


Abb. 22: Abbildung einer Thiolverbindung auf der Au-Oberfläche

2.6.1 Ausbildung von Alkanthiolmonolagen auf Goldoberflächen

Die Adsorptionskinetik von Thiolverbindungen auf einer Goldoberflächen verläuft als zweistufiger Prozess [56], [61].

Zunächst erfolgt ein schneller *Adsorptionsschritt*: Dieser dauert nur wenige Minuten und ergibt eine Oberflächenbedeckung von etwa 80-90%.

Die Adsorption ist abhängig von der Konzentration der Thiollösung. Auch die Alkylkettenlänge spielt eine Rolle. Mit wachsender Alkylkette nimmt die Geschwindigkeit des ersten schnellen Adsorptionsschrittes ab. Der Bedeckungsgrad der Au-Oberfläche nimmt dagegen mit zunehmender Kettenlänge zu [62].

Es folgen *langsamere ordnungsbildende Schritte*, die den Bedeckungsgrad erhöhen [63, 64] und mehrere Stunden dauern können. Ihre Geschwindigkeit wird durch die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Molekülen (van der Waals-Kräfte) bestimmt. Enthalten die Monolagen funktionelle Gruppen, so können auch elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken zwischen den Ketten auftreten, welche die Ordnung der SAMs ebenfalls beeinflussen.

Die Triebkraft der Chemisorption von Thiolverbindungen (R-SH) auf Goldoberflächen ist die frei werdende Bindungsenergie von etwa 165 -190 kJ/mol (40 - 45 kcal/mol) [65], [66], [67].

Gold geht nicht nur mit Thiolen, sondern auch mit anderen weichen Nukleophilen, wie z.B. den Isonitrilen (-NC) kovalente Bindungen ein. Eine hohe Affinität zu Gold zeigen auch die Disulfide (RS-SR) und die Xanthate (ROC(S)-S⁻).

Die Anbindung des Thiols an die Au-Oberfläche erfolgt als oxidative Addition der HS-Bindung an Gold, gefolgt von einer reduktiven Eliminierung von Wasserstoff.

Reaktionsmechanismus der Thiol-Adsorption:



Reaktionsmechanismus der Disulfid-Adsorption:



Der genaue Adsorptionsmechanismus der Thiolverbindungen auf der Au-Oberfläche ist jedoch noch unklar [68], [69]. Vor allem die Frage nach dem Reaktionsweg des Wasserstoffatoms, welcher aus der Thiolverbindung stammt, ist noch nicht beantwortet. Eine Vermutung ist, dass die Anwesenheit von Sauerstoff zur Bildung von Wasser führt [70].

Aufgrund der hohen Reaktionsenthalpie werden alle Adsorptionsplätze auf der Au-Oberfläche nahezu vollständig besetzt. Das Schwefelatom lagert sich an die dreifach koordinierten Muldenplätze (hollow sites) der Goldoberfläche [24]. Die langkettigen Alkanthiole bilden auf der Gold-(111)-Oberfläche eine hexagonale $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ R30°-Überstruktur aus [71], [72], [73]; der S-S-Abstand beträgt 4.97 Å, was etwa dem dreifachen van der Waals Radius des Schwefelatoms (1.85 Å) entspricht [74].

Bei einer all-trans-Konformation (dichtesten Packung der Alkylketten) beträgt der S-S-Abstand jedoch nur 4.24 Å. Deshalb kippen die Alkylketten auf der Au-Oberfläche um etwa 30° bis 35° (Tiltwinkel). Dadurch ergibt sich eine größere Packungsdichte, die maximale van der Waals-Wechselwirkungen zwischen den Ketten ermöglicht [75].

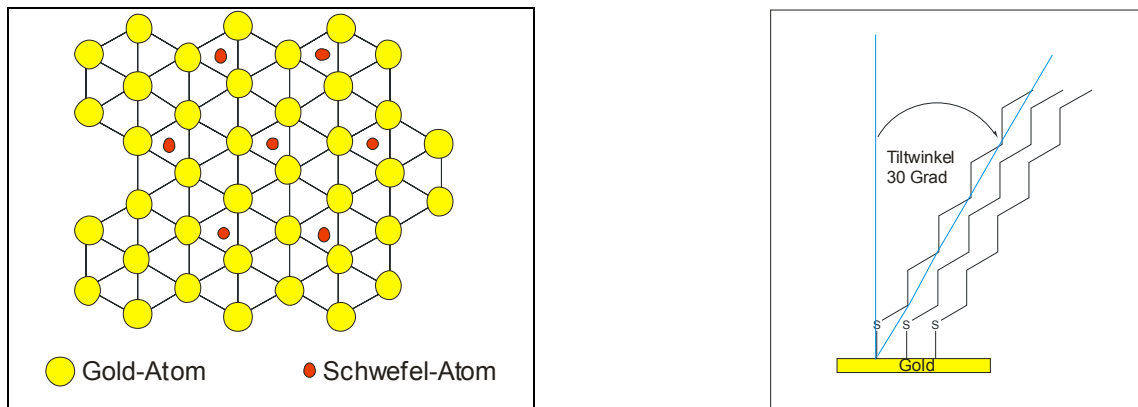


Abb.23.1: Bild rechts stellt eine hexagonale Überstruktur ($\sqrt{3}\times\sqrt{3}$ R30°) auf Goldoberfläche. Das linke Bild stellt die Verkippung der Alkanthiole um den Tiltwinkel 30° bei Adsorption auf einer Au(111) Oberfläche

Diese energetisch günstige gekippte Orientierung ermöglicht dem Schwefelatom weiterhin eine sp^3 -Hybridisierung [76].

Die adsorbierten Moleküle besitzen außerdem eine gewisse laterale Mobilität, was für die ordnungsbildenden Schritte von besonderer Bedeutung ist.

2.7 Das System Biotin-Streptavidin

Streptavidin ist ein Biotin-bindendes Protein, das aus *Streptomyces avidinii* [100, 101] isoliert wird. Sein Molekulargewicht beträgt ca. 60.000 D. Es ist dem Glykoprotein Avidin (68.000 D), das in klarem Eiweiß gefunden wird, strukturell sehr ähnlich. Beide Proteine haben sehr ähnliche chemische und biologische Eigenschaften. Sie sind beide Tetramere. Jede Untereinheit kann ein Biotin-Molekül binden. Eine solche Untereinheit besteht aus 128 Aminosäuren.

Das Biotin, das auch als Vitamin H bekannt ist, wird in Gewebe und Blut gefunden. Sie besitzt eine Masse von 244 D und bindet mit sehr hoher Affinität sowohl an Avidin als auch an Streptavidin ($K=10^{15} \text{ M}^{-1}$). An der Bindung des Biotins zu einer Untereinheit des Streptavidins sind mehrere Aminosäuren über van der Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt.

Aufgrund dieser Eigenschaften findet das Biotin-Streptavidin-System eine breite Anwendung in der Immonoassay.

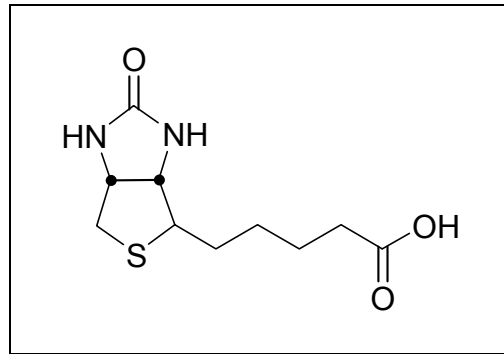


Abb. 23.2: Das Biotin-Molekül

Das kleine Biotin-Molekül wird vollständig in das innere des Proteins Streptavidin aufgenommen [88].

3 Experimenteller Teil

3.1 Materialien und Methoden

Die Synthese der photolabilen Schutzgruppe wurde aufgrund der Oxidations- und Luftempfindlichkeit unter Inertgasatmosphäre durchgeführt.

3.1.1 Plasmaätzer

Plasmabehandlung wurde im Plasma System 100-E der Firma TePla durchgeführt.

Gase	Einsatz	Qualität	Firma
Stickstoff	Synthese	4,6	Messer Griesheim
Wasserstoff	Plasmabehandlung	5.0	
Sauerstoff	Plasmabehandlung	4,5	
Argon	Plasmabehandlung	4,8	

Tab.6: Verwendete Gase

3.1.2 Sputter Coater

Zum Bedampfen der Glasproben mit Graphit wurde das MED 020 Coating System der Firma Bal-Tec verwendet.

Die verwendeten Lösungsmittel wurden über Molekularsieb 3Å der Firma Carl Roth GmbH & Co. getrocknet und aufbewahrt.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelfertigfolien Polygram SIL G/UV254 der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG verwendet. Die Detektion der Substanzspuren erfolgte mit UV-Licht.

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Partikelgröße: 0.04 – 0.063 mm) der Firma Fluka verwendet.

Polyethylenglykol (m-PEG-2000) wurde von Dr. Jacques Blümmel (Universität Heidelberg, AK Prof. Spatz) synthetisiert.

3.1.3 Folgende Chemikalien wurden eingesetzt:

Tab. 7: Chemikalienliste

Verwendete Chemikalien	Firma
Triethylsilan	Fluka
3,4-(methylenedioxy)acetophenon	Aldrich
Phosgen in Toluol (20%w/v)	Fluka
Tritylchlorid (Triphenylchlormethan)	Fluka
Diisopropylethylamin (DIEA)	Aldrich
11-Mercaptoundekansäure	Aldrich
N-hydroxysuccinimid	Aldrich
4-(dimethylamino)pyridin	Fluka
N,N-Dicyclohexylcarbodiimid	Aldrich
2,2`-(ethylenedioxy)bis(ethylamin)	Fluka
Dichlormethan (wasserfrei)	Merck
Magnesiumsulfat	Aldrich
Ammoniumchlorid	Aldrich
70% Salpetersäure (HNO ₃)	Merck
Tetrahydrofuran (p.a.)	J. T. Baker
Ethanol (p.a.)	Riedel-de Haen
Methanol (p.a.)	Merck
Ölfreies NaH-Pulver	Aldrich
Dimethylformamid (DMF)	Fluka
NaOH-Plätzchen (Natriumhydroxid),	Fluka
Salzsäure (HCl)	Theoretikumsbestände der Universität Heidelberg.

3.2 Verwendete Analysemethoden

3.2.1 NMR-Spektroskopie

Mit dem Bruker Ac-300-Spektrometer wurden die ^1H -NMR-Spektren aufgenommen. Die Messfrequenz der Spektrometer war 300 MHz.

Die Angabe der Signallagen erfolgt über die chemische Verschiebung δ [ppm].

Die Signalmultiplizitäten bei NMR-Spektren werden wie folgt abgekürzt:

Tab. 8: Signalabkürzung

s = Singulett	d = Dublett
t = Triplett	q = Quartett
m = Multipllett	

3.2.2 Massenspektroskopie

Die FAB-Massenspektren wurden mit einem JMS 700 der Firma JOEL aufgenommen.

Für die MALDI-Massenspektren wurde ein Biflex-Gerät der Firma Bruker verwendet.

3.2.3 Elementaranalyse

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

3.2.4 Infrarot-Reflexions-Adsorptionsspektroskopie (IR-RAS)

Mit dem Bio-Rad FTS 175c Spektrometer wurden die IR-Spektren aufgenommen.

Auf einem Gold-bedampften Si-Wafer wurde das zu untersuchende Molekül adsorbiert. Der Einfallwinkel des p-polarisierten IR-Licht fällt in einem Winkel von 75° auf die Probe. Dadurch wird gewährleistet, dass ein möglichst großer Anteil des p-polarisierten Lichtes senkrecht zur Metalloberfläche fällt.

Als Detektor dient ein Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Halbleiterdetektor (MCT-Detektor), der mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurde. Durch die Kühlung wird das thermische Rauschen, das durch die Wärmestrahlung der Umgebung verursacht wird, unterdrückt. Die Messkammer wird mit getrockneter Luft gespült, um die Luftfeuchtigkeit zu minimieren. Wasser absorbiert das IR-Licht im Bereich von 3500-

400 cm^{-1} und 2000-1300 cm^{-1} . Bei jeder Messung wurden etwa 1000 bis 2000 Scans mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen. Als Referenz wurde perdeuteriertes Oktadekanthiol (C18D37SH) verwendet. Die Spektren wurden exportiert und mit dem Programm Origin 3.78 der Firma Microcal sowohl bearbeitet als auch qualitativ und quantitativ ausgewertet.

3.2.5 UV-VIS-Spektroskopie

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

3.2.6 Kontaktwinkelmessungen

Zur Bestimmung der Benetzbarkeit der Oberfläche wurde ein Kruss G1 Goniometer Mikroskop verwendet. Das Millipore-Wasser diente als Testflüssigkeit. Zur Vermessung des fortschreitenden Kontaktwinkels wurde ein Tropfen Millipore-Wasser aus einer Mikroliter-Spritze zugegeben. Dabei befand sich die Spritze beim Ablesen des Winkels noch im Kontakt mit dem Wassertropfen [79, 80]. Mit Hilfe einer beweglichen Skala wird eine Tangente an den Tropfen angelegt und direkt abgelesen. Die Messgenauigkeit liegt bei etwa $\pm (1-2)^\circ$.

3.2.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Aufnahmen der REM-Bilder wurden an einem Mikroskop der Firma LEO Typnummer 1530 durchgeführt, die eine Beschleunigungsspannung von 3 bis 10 kV und einem Druck kleiner 5×10^{-6} mbar besitzt.

Von den photochemisch strukturierten Oberflächen (Au-wafer und Gold-Nanodot-Oberflächen) wurden außerdem REM-Bilder aufgenommen.

Sowohl bei der Gold als auch bei der Glasoberfläche wurde die absorbierte photolabile Thiol mittels UV-Lichtes der Wellenlänge 419 nm durch eine Lochmaske bestrahlt. Folgende Lochmaske wurde verwendet:

- Lochdurchmesser 1 mm^2 ; Lochabstand 1mm

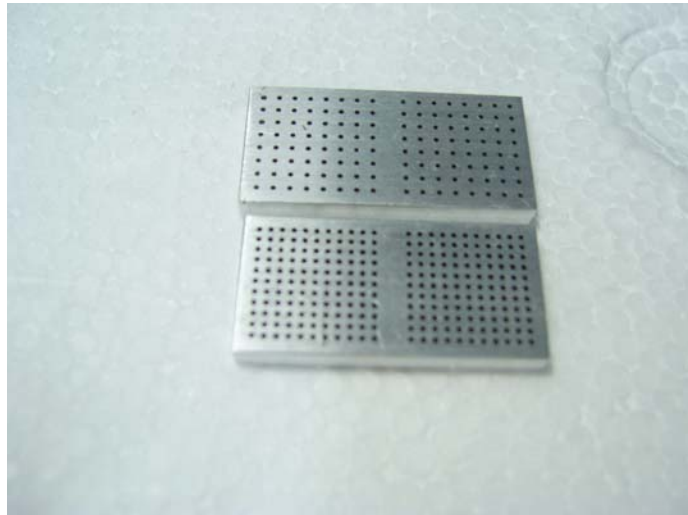


Abb.24: Lochmasken

Für die Aufnahme der REM- Bilder wurden die Proben sowohl vom Glassubstrat, als auch vom Goldwafer mit Aktivekohle besputtert, um eine Aufladung zu verhindern.

3.2.8 Fluoreszenzmikroskope

Mikroskopische Untersuchungen wurden mit Axioplan 2 von der Firma Carl Zeiss AG durchgeführt. Für die Erstellung digitaler Mikroskopiebilder wurde eine AxioCam MRm CCD-Kamera von der Firma Zeiss verwendet. Die damit erzeugten Graustufenbilder werden auf einem angeschlossenen Computer abgespeichert. Die Aufnahmen werden mit dem Programm Image J in RGB-Bilder umgewandelt. Das Farbstofflinker Alexa Fluor besitzt einen Absorptionswellenlänge bei 493 nm und einen Emissionsbereich bei 518 (grün). Als Objektive wurde Achroplan; 4x; NA=0,1 verwendet.

3.2.9 QCM-D Messung

Die Quarz-Kristalle werden vor der Verwendung im QSense E4-Messgerät mit Sauerstoffplasma vollständig von organischen Resten befreit. Nach der Reinigung werden die Kristalle in die vorbereiteten Durchflusskammern gelegt; diese werden verschraubt und in das Messgerät eingesetzt. Die Zulaufschläuche der Durchflusskammern werden in die Pumpe eingelegt und ein Fluss von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ eingestellt; dieser wird während der Messung konstant gehalten. Die Ablaufschläuche werden einem Abfallgefäß zugeführt.

Durchführung

Sämtliche Messungen wurden mit einem Q-Sense E4 Messgerät durchgeführt. Für die Messung wurden das Programm Qsoft401 und für die Auswertung QTools verwendet.

Tab.9: QCM-D-Messung von verschiedenen Adsorptionsschritten

1. Messung	Adsorption von photolabiler Thiolverbindung (vor der Bestrahlung)
2. Messung	Ankopplung von NHS-Biotin und Streptavidin AlexaFluor 488 an aminfunktionalisierte Thiol (nach der Bestrahlung)
3. Messung	Kontroll-Messung der Adsorption auf reiner Goldoberfläche mit NHS-Biotin und Streptavidin AlexaFluor 488

Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde die Frequenz- und die Dissipationsänderung des Quarzkristalls beim Übergang von Luft als umgebendes Medium zu Lösungsmittel gemessen. Dabei kamen folgende Lösungsmittel zum Einsatz.

Tab.10: Eingesetzte Lösungsmittel bei den Adsorptionsversuchen

eingesetzte Lösungsmittel	Anwendung
p.a Ethanol	Adsorption von photolabilen Thiol (vor der Bestrahlung)
PBS-Puffer	Anbindung von NHS-Biotin und Streptavidin AlexaFluor488 an die aminfunktionalisierte Thiol (nach der Bestrahlung)
PBS-Puffer	Anbindung von NHS-Biotin und Streptavidin AlexaFluor488 an reiner Goldoberfläche (Kontroll-Messung)

Dabei wurde die zu Beginn in Luft gemessene Frequenz und Dissipation als Nullwert der Messung definiert und dann die Änderung des Wertes über die Zeit gemessen.

Die Definition der Anfangswerte als neuer Nullwert ist nötig, da sonst die Veränderung der Frequenz und der Dissipation kaum merklich wären.

Die Messzeit der Adsorption von photolabilen Thiolen in Ethanol (0,1 mM-Lösung) betrug im ersten Teil der Messung insgesamt 15 min. Zuerst wurde die Kammer mit Ethanol gespült und nach 3,45 min auf die Thiole zur Anbindung zugesetzt. Die Adsorption der photolabilen Thiole erfolgte 6 min. Nach 9,10 min wurde die Kammer wieder mit reinem Ethanol gespült, dabei wurden ungebundene Thiole weggespült.

Im zweiten Teil der Messung wurden die QCM-Kristalle über Nacht in Thiollösung inkubiert. Anschließend wurde die photolabile Gruppe außerhalb der QCM-D-Kammer bestrahlt. Durch den Abgang der Schutzgruppe entsteht eine aminofunktionalisierte Oberfläche, an welche später die kovalente Anbindung von NHS-Biotin erfolgt. Vor der Anbindung von NHS-Biotin wurde die aminoterminierte Oberfläche mit PBS-Puffer gespült und nach 8 min auf das NHS-Biotin (100 µg/ml) umgestellt. Die Adsorption von NHS-Biotin erfolgte nach 20 min. Nach 28 min wurde die Kammer wieder mit PBS-Puffer gespült, dabei wurde die unspezifische Bindung von Biotin weggespült. Bei 44 min wird die Kammer zur Ankopplung von Streptavidin AlexaFluor 488 (20 µg/ml) an Biotin zugesetzt. Nach 20 min wurde die Kammer wieder mit PBS-Puffer gespült, dabei wurden die ungebundene Protein weggespült.

In dritten Teil der Messung wurde eine Kontrollmessung auf reiner Goldoberfläche durchgeführt.

Zuerst wurde die Kammer mit PBS-Puffer gespült und nach 12 min wurde das NHS-Biotin (100 µg/ml) in die Kammer eingeleitet. Die Adsorption des Biotins erfolgte 15 min und anschließend wurde die Kammer wieder mit PBS-Puffer gespült.

Nach 38 min wird die Kammer auf Streptavidin AlexaFluor 488 (20 µg/ml) umgestellt und nach 16 min Adsorptionszeit wurde die Kammer erneut mit PBS-Lösung gewaschen.

Die in Kapitel 4.2 aufgeführten Tabellen zeigen die jeweilige Änderung der Frequenz und Dissipation, sowie die Massenzunahme der jeweiligen Messungen.

3.2.10 Röntgen-Photoemissions-Spektroskopie (XPS)

An dem MAX-200-Spektrometer der Firma Leybold-Heraeus wurden die XP-Spektren aufgenommen.

Für die Röntgenstrahlung diente eine Aluminiumanode als Quelle mit der Energie der $K\alpha$ -Linie von 1486.6 eV und einer Halbwertsbreite von ca. 1 eV.

Als Messparameter wurden folgende Werte eingestellt.

Tab.11 : Messparameter für die aufgenommenen XP-Spektren.

Orbital/ Bereich	Startenergie/ eV	Endenergie/ eV	Schrittweite/ meV	Verweilzeit/ ms	Passenergie/ eV	Scans
Übersicht	1000	-5	400	10	96	5-10
Au4f,O1s	560	520	200	40	48	10
O1s	545	510	200	40	48	10
C1s	295	275	200	10	48	10
S2p	175	150	200	250	48	10-15
N1s	410	390	200	250	48	10-15
Si2p	110	85	200	40	48	10
Au4f	100	70	200	10	48	10

In einem Übersichtsspektrum wurden die Proben- und die Signalposition im Spektrum (Verschiebungen durch Aufladungseffekte) überprüft, welches vor dem Detailspektrum aufgenommen wurde.

Im Detailspektrum können die Atomspezies dann zur genaueren Quantifizierung herangezogen werden.

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 elementspezifischen Wirkungsquerschnitte σ und Abschwächungslängen λ können der Literatur entnommen werden und sind in der Tabelle 12 aufgeführt.

Tab. 12 : Elementspezifische Wirkungsquerschnitte σ und Abschwächungslängen λ [80].

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

Wenn die Messsignalintensität zu gering ist, wird eine größere Verweilzeit gewählt, um eine verwertbare Auflösung zu erreichen. Da aber bei zu langer Verweilzeit Strahlung eine Schädigung auf der Probe ergibt, muss ein Kompromiss zwischen Auflösung und Schädigung der Probe gefunden werden.

Der Emissionsstrom der Glühkathode lag für alle Messungen bei 16 mA.

- **Analyse der XP-Signale**

Für die quantitative Analyse müssen die gemessenen Rohdaten normiert und angepasst werden. Meistens ist auch eine Korrektur des Untergrunds notwendig. Mit dem Programmpaket Origin 3.78 der Firma Microcal wurden die quantitative Auswertung und die Darstellung der Spektren durchgeführt.

Das darin enthaltene Unterprogramm "PeakFitting Module" ermöglicht die Signalanpassung.

- **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 Au4f7/2-Signals (84 eV) normiert.

- **Untergrundkorrektur**

Auf Grund der inelastisch gestreuter Sekundärelektronen steigt der Untergrund zu höheren Bindungsenergien hin und kann bei den Signalen zu beträchtlichen Asymmetrien führen.

Um eine quantitative Analyse durchführen zu können, ist eine Korrektur des Untergrunds der Messsignale notwendig.

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.

- **Signalanpassung**

Das Flächenintegral des XP-Signals ermöglicht die Bestimmung der jeweiligen Element-Konzentration 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 natürliche Halbwertsbreite. Da alle Anodenatome die gleiche Strahlung emittieren, wird dies als homogene Verbreiterung 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-Profil mit einem festen Verhältnis von Gauß- zu Lorentzprofil (4:1) Anwendung.

3.3 Allgemeine Synthese von photosensitiven Alkanthiolen

Die in dieser Arbeit synthetisierten photolabilen Alkanthiol wurden, wie in Abbildung 25 dargestellt, analog zu einer Vorschrift von Declan Ryan et al [81] und G.H. McGall et. al. [82] durchgeführt.

Dabei reagiert die trityl geschützte Mercaptoundekansäure mit der einen Aminogruppe der 2,2'-(ethylendioxy)bis(ethylamin). Die freie Aminogruppe dieser Verbindung reagiert nun mit der Schutzgruppe MeNPOC, nach der Entfernung der Tritylverbindung wird die photolabile Thiolverbindung $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{EG}_2)\text{NPOC}$ freigesetzt.

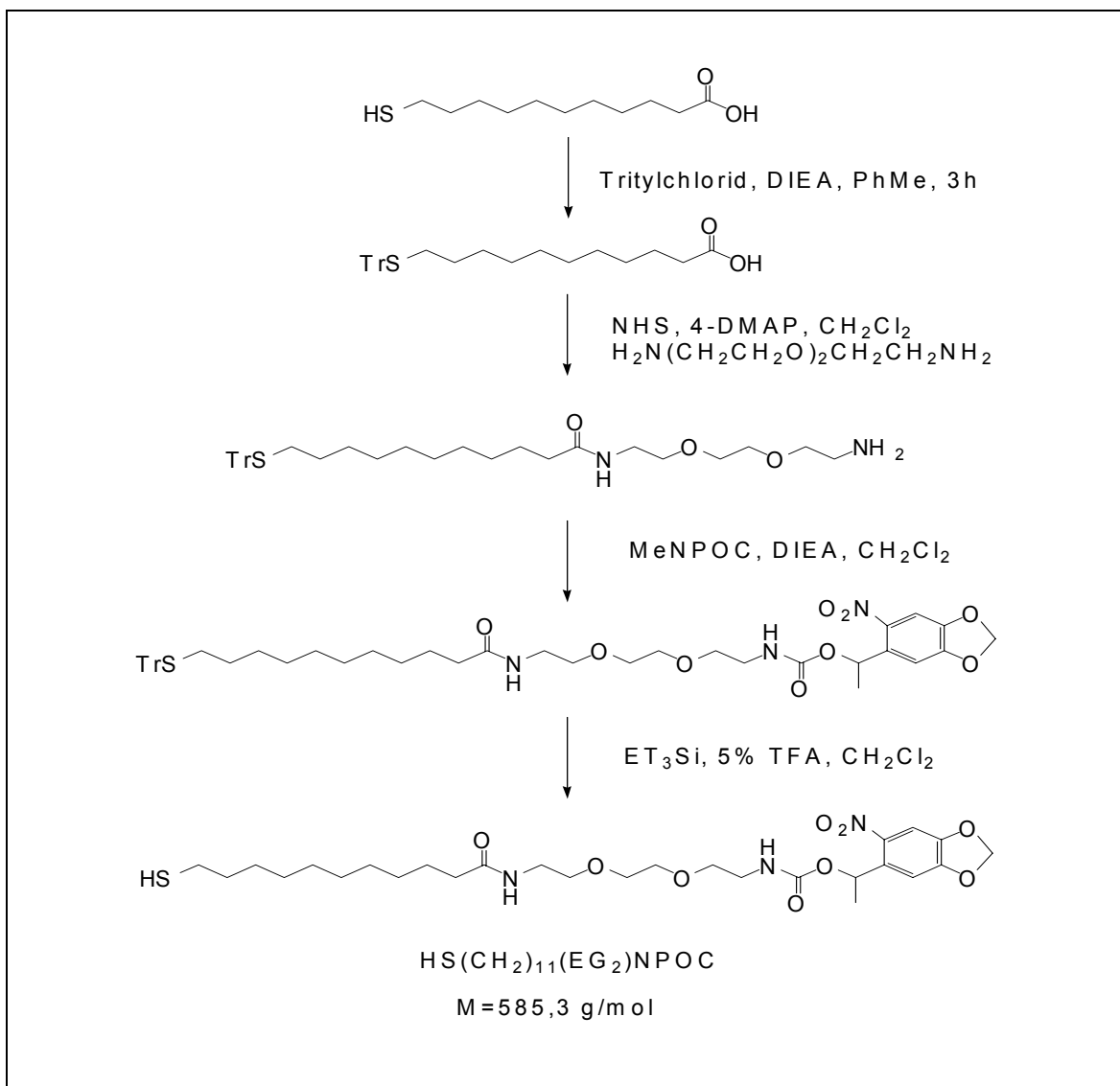
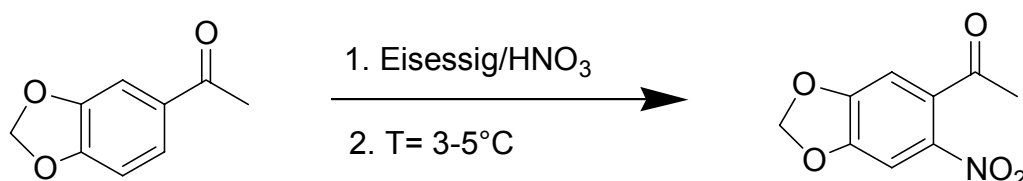


Abb. 25: Synthese der photolabilen Schutzgruppe mit Alkanthiol [81]

3.3.1 Synthese 3,4-(Methylenedioxy)-6-nitroacetophenon (1)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

15 g (91,4 mmol)

3,4(Methylenedioxy)acetophenon

80 ml

Eisessig

150 ml

65% HNO₃

THF/Hexan

Durchführung:

In einem Dreihalskolben werden 83 ml 65%-iger HNO₃ Lösung vorgelegt und im Eisbad auf eine Temperatur von 3-5 °C vorgekühlt.

Zu dieser Säure wird eine Lösung aus 10 g 3,4(Methylenedioxy)acetophenon in 39 ml Eisessig langsam zugetropft und unter Eiskühlung eine Stunde lang gerührt.

Anschließend lässt man die Lösung 2 Stunden bei Raumtemperatur rühren.

Diese Reaktionslösung wird langsam in 400 ml Eis-Wasser geschüttet.

Der entstehende gelbe Feststoff wird mit Wasser gewaschen und unter Vakuum getrocknet und in THF/ Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 7 g (46,7%)

Aussehen: gelb kristalliner Feststoff

Charakterisierung:

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):

δ=7,48 (s, 1H, Aromat), 6,68 (s, 1H, Aromat), 6,10 (s, 2H, CH₂), 2,41 (s, 3H, CH₃)

Elementar Analyse:

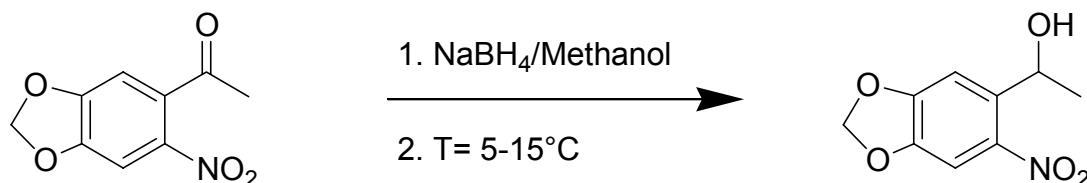
Berechnet: C 51,68 %, H 3,37 %, N 6,70 %

Gefunden: C 51,66 %, H 3,40 %, N 6,76 %

Massenspektrum (EI): 209,01 m/z (M)

3.3.2 Synthese (R,S)-1-(3,4-(Methylenedioxy)-6-nitrophenyl)ethanol (2)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

5,4 g (25,8 mM)	(3,4-(Methylenedioxy)-6-nitroacetophenon (1)
0,86 g (22,6 mM)	Natriumborhydrid
25 ml	Methanol (absolute)
20 ml	gesättigtes Ammoniumchlorid
	Dichlormethan
	Natriumchlorid
	Magnesiumsulfat

Durchführung:

In einem ausgeheizten Kolben werden unter Schutzgas 0,86 g (22,6 mM) g Natriumborhydrid zu einer auf 5-15 °C vorgekühltem Suspension des Produkts 1 [5,4 g (25,8 mM)] in Methanol gegeben und für eine weitere Stunde gekühlt.

Anschließend wird die Reaktionslösung bei Raumtemperatur 3 Stunden gerührt. Um die Reaktion zu beenden wird 20 ml der gesättigten Ammoniumchlorid-Lösung zugegeben und dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit Natriumchlorid gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet.

Das Lösungsmittel wird entfernt und das Produkt unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 5,3 g(98%)

Aussehen: zitronengelber feiner Feststoff

Charakterisierung:

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz):

δ=7,39 (s, 1H, Aromat), 7,19 (s, 1H, Aromat), 6,04 (s, 2H, CH₂), 5,42 (q, 1H, CH), 1,50 (d, 3H, CH₃)

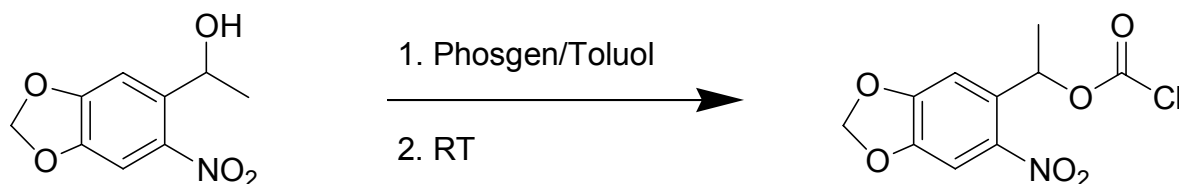
Elementar Analyse:

Berechnet: C 51,19 %, H 4,30 %, N 6,63 %

Gefunden: C 50,05 %, H 4,22 %, N 6,71 %

Massenspektrum (EI): 211,05 m/z (M)**3.3.3 Synthese (R,S)-1-(3,4-(Methylenedioxy)-6-nitrophenyl)ethyl chloroformat (MeNPOC-Cl) (3)**

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

100 ml (0,19 mM)	(20 % w/v) Phosgen in Toluol
5,1 g (0,02 mM)	(R,S)-1-(3,4-(Methylenedioxy)-6-nitrophenyl)ethanol (2)
20 ml	Tetrahydrofurane (getrocknet)
	Hexan

Durchführung:

Unter Schutzgas wird das (20 % w/v) Phosgen in Toluol in einem Dreihalskolben vorgelegt. Mit einem Tropftrichter wird das in 20 ml THF gelöste Produkt 2 [5,1 g (0,02 mM)] langsam zugetropft.

Unter Schutzgas wird diese Reaktionslösung bei Raumtemperatur für weitere 36-48 Stunden gerührt.

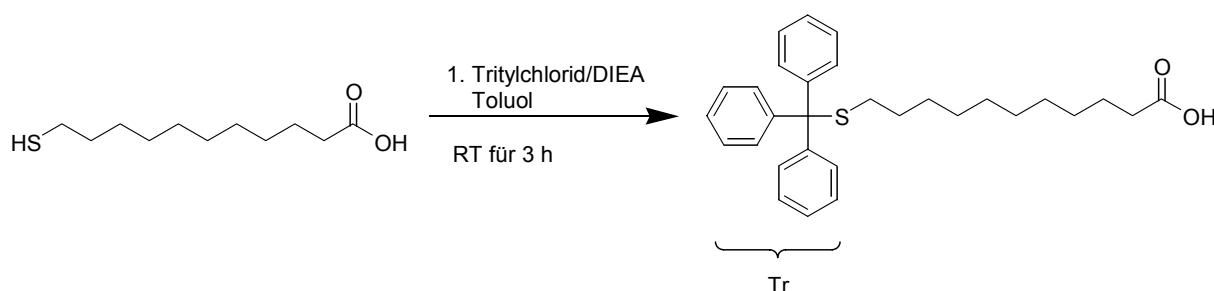
Das überschüssige Phosgen wird bei niedrigem Druck entfernt und in Natronlaugelösung neutralisiert.

Das Lösungsmittel wird entfernt und das Produkt in THF/ Hexan umkristallisiert.

Ausbeute: 4,8 g (95%)Aussehen: brauner zäher Feststoff

Charakterisierung: ^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): $\delta=7,52$ (s, 1H), $7,05$ (s, 1H), $6,47$ (q, 1H), $6,08$ (s, 2H), $1,62$ (d, 3H)**3.3.4 Synthese 11-Tritylsulfanyl-undekansäure (4)**

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

4,6 g (17 mmol)	Tritylchlorid
4,2 g (33 mmol)	Diisopropylethylamin (DIEA)
50 ml	Toluol
6,0 g (14 mmol)	11-Mercaptoundecansäure
	Dichloromethan
	MgSO ₄

Durchführung:

In einem Glaskolben werden 4,6 g (17 mmol) Tritylchlorid und 4,2 g (33 mmol) DIEA in 50 ml Toluol gelöst. Zu dieser Lösung werden 6,0 g (14 mmol) 11-Mercaptoundecansäure zugegeben und die Reaktionslösung wird für weitere drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Nach Beendigung der Reaktion wird das Lösungsmittel entfernt.

Das Produkt wird in Dichloromethan aufgenommen und die organische Phase mit Wasser (2x200 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet.

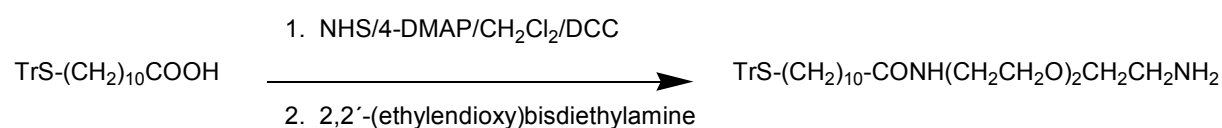
Ausbeute: 6,3 g ,(97%)Aussehen: weißer Feststoff

Charakterisierung: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ =1,14-1,42 (br m, 14 H), 1,59-1,68 (br t, 2H), 2,06-2,09 (br m, 2H) 2,36-2,40 (t, 2H), 7,19-7,23 (m, 6H), 7,26-7,29 (m, 9H)

3.3.5 1-Tritylsulfanyl-undekansäure {2-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]-ethyl}-amid (5)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

0,26 g (2,3 mmol)	N-Hydroxysuccinimid
1%	4-(Dimethylamino)pyridin (4-DMAP)
100 ml	trockenes Dichlormethan
1,03 g (2,2 mmol)	11-Tritylsulfanyl-undekansäure (4)
0,46 g (2,2 mmol)	Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)
5,4 g (33 mmol)	2,2'-Ethylendioxy)bisdiethylamin
	MgSO ₄

Durchführung:

In einem Glaskolben wird N-Hydroxysuccinimid (0,26 g, 2,3 mmol) und eine katalytische Menge von 4-(Dimethylamino)pyridin in Dichlormethan (50 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wird zuerst das Produkt 4 (1,03 g, 2,2 mmol) langsam zugegeben, später erfolgt die Zugabe von Dicyclohexylcarbodiimid (0,46 g, 2,2 mmol).

Die Lösung wird für eine Stunde bei 5 °C gekühlt. Anschließend lässt man über Nacht bei RT weiterrühren.

Die Reaktionslösung wird mit Dichlormethan verdünnt. Das aufgefallene Dicyclohexylurethan wird durch Filtration von der Aktivester-Lösung getrennt. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt und das Aktivester getrocknet.

Der entstandene Aktivester wird in Dichlormethan (50 ml) gelöst. Bei RT wird 2,2'-Ethyldioxy)bisdieethylamin (5,4 g, 33 mmol) langsam innerhalb von 30 Minuten zugetropft und für weitere 12 Stunden gerührt.

Die Lösung wird filtriert und mit milliQ-Wasser (3x200 mL) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird entfernt und das erhaltene Produkt wird über Säulenchromatographie (EtOAc/Methanol (2/1), $R_f = 0,6$) aufgereinigt.

Ausbeute: 1,2 g (95%)

Aussehen: weiß-gelbe zähe Masse

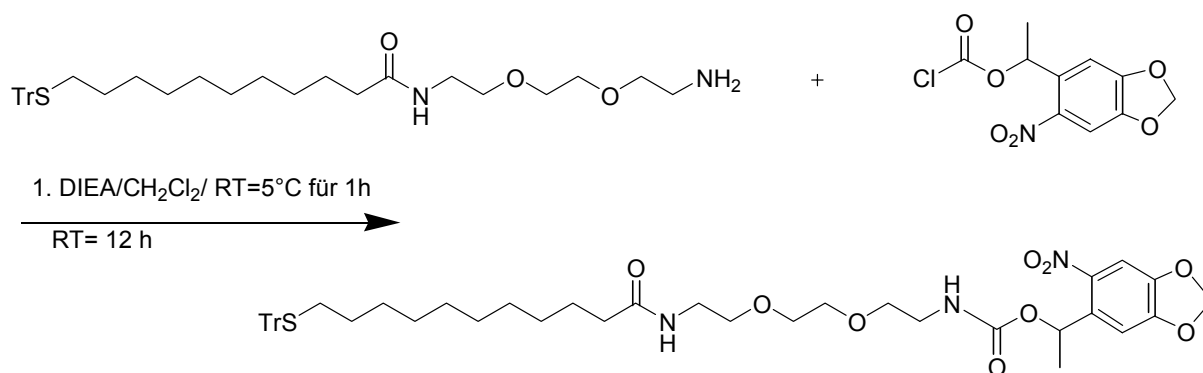
Charakterisierung:

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

$\delta = 1,14-1,42$ (br m, 14 H), 1,59-1,68 (br t, 2H), 2,06-2,09 (br m, 2H) 2,78-2,85 (br t, 2H), 3,38-3,42 (m, 4H), 3,46-3,51 (m, 4H), 3,58-3,63 (s, 4H), 7,19-7,23 (m, 6H), 7,26-7,29 (m, 9H)

3.3.6 2-{2-[2-(11-Tritylsulfanyl-undekanoylamino)ethoxy]-ethyl}-ethyl)-carbamid Säure1-(4,5 Methyleneedioxy-2-nitrophenyl)-ethyl Ester (6)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

1,03 g (1,74 mmol)
 (2-Aminoethoxy)ethoxy]-ethyl]-amid (5)

0,26 g (2,0 mmol)

50 mL

11-Tritylsulfanyl-undekansäure{2-[2-

Diisopropylethylamin (DIEA)

Dichloromethan

1,18 g, (4 mmol)	MeNPOC-Cl (Produkt 3)
100 mL	0,01 M HCl
100 mL	0,2 M NaOH
	gesättigte NaCl Lösung
	MgSO ₄ , Eisessig, Methanol

Durchführung:

Zur einer Lösung aus Produkt 5 (1,03 g, 1,74 mmol) und DIEA (0,26 g, 2,0 mmol) in Dichlormethan (50 mL) wird MeNPOC (1,18 g, 4 mmol) langsam innerhalb von 30 Minuten zugegeben.

Die Reaktionslösung wird bei 5 °C für eine Stunde gekühlt und anschließend über Nacht bei RT gerührt.

Die Lösung wird mit 0,01 M HCl (1x100 mL), 0,2 M NaOH (1x100 mL), und gesättigter NaCl-Lösung (1x100 mL) gewaschen. Das Produkt wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abrotiert. Der erhaltene Feststoff wird über Säulenchromatographie (EtOAc/Methanol (2/1), R_f= 0,6) aufgereinigt.

Ausbeute: 0,3 g (25 %)

Aussehen: gelbes Öl

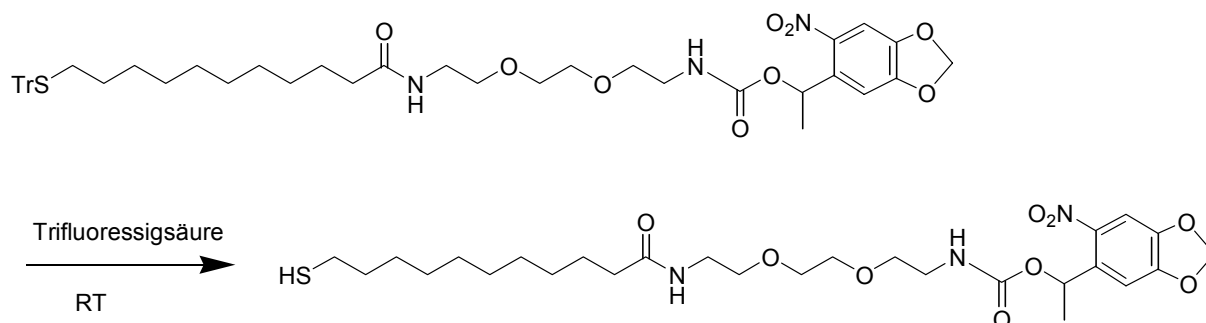
Charakterisierung:

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz):

δ=1,16-1,86 (br m, 10 H), 1,49-1,82 (br m, 6H), 2,02-2,11 (br m, 2H), 2,78-2,85 (br t, 2H), 3,37-3,41 (m, 4H), 3,45-3,46 (m, 4H), 3,46 (s, 4H), 3,52 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 6,01 (s, 2 H), 6,2 (br q, 1H), 6,95 (s, 1H), 7,14-7,23 (m, 6H), 7,31-7,39 (m, 9H)

3.3.7 2-{2-[2-(11-Mercapto-undekanoylamino)ethoxy]-ethyl}-ethyl)-carbamid Säure 1-(4,5 Methylendioxy-2-nitrophenyl)-ethyl Ester (7)

Reaktionsgleichung:



Ansatz:

5 % (v/v)	Trifluoressigsäure/ Dichlormethan
1,2 g (1,4 mmol)	Produkt 6
0,83 g (7,1 mmol)	Triethylsilan
200 ml	0,2 M NaOH
200 ml	NaCl
MgSO ₄	

Durchführung:

Produkt 6 [1,2 g (1,4 mmol)] wird zusammen mit 5 % (v/v) Trifluoressigsäure/ Dichlormethan und 0,83 g (7,1 mmol) Triethylsilan 3 Stunden bei RT gerührt. Anschließend wird die Lösung mit 0,2 M NaOH (200 ml) und NaCl-Lösung (200 ml) gewaschen. Das Produkt wird über Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel abrotiert. Der erhaltene Feststoff wird über Säulenchromatographie (EtOAc/MeOH (2:1), R_f= 0,5) aufgereinigt.

Ausbeute: 0,46 g (54%)

Aussehen: gelbes Öl

Charakterisierung: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz):

δ =1,18-1,29 (s, 14 H), 1,47-1,59 (br t, 2H), 2,07-2,10 (br m, 2H), 2,56-2,61 (q, 2H), 3,37-3,39 (m, 4H), 3,43-3,47 (m, 4H), 3,48 (m, 4H), 3,52 (s, 3H), 3,53 (s, 3H), 6,01 (s, 2 H), 6,19 (br q, 1H), 6,95 (s, 1H), 7,38 (s, 1H)

 ^{13}C - NMR (CDCl_3 , 75 MHz):

δ =22,1 (CH- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$), 25,7-29,4 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 36, 7 (NHCO- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -(CH_2) $_n$); 39,2-40,7 (-CONH- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O), 68,9 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ - CH_3); 69,9-70,3 (NH- CH_2 - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O), 102,9 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O), 105,2-105,6 ($\underline{\text{C}}\text{H}$ -Benzol)

Massenspektrum (FAB): 586,3 m/z (M+H)

UV-Vis-Spektrum (Ethanol):

λ_{max} = 243 nm (log ϵ =1,5), 291 nm (log ϵ =0,3), 340 nm (log ϵ =0,5)

3.4 Herstellung Gold-Nanodot – funktionalisierter Glasoberflächen

Nanostrukturierung von Glasoberflächen

Reinigung der Glasoberflächen

Um organische Verunreinigungen auf der Oberfläche zu entfernen werden die Glassubstrate (20x20 mm) in einer Caroscher Lösung im Verhältnis 1:3 ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{SO}_4$) ausgesetzt. Durch die oxidationsbedingte Reinigung der Substratoberfläche entsteht eine hydrophile Oberfläche. Anschließend wurden die Glassubstrate mit milli-Q-Wasser gespült, 5 Minuten in Ultraschallbad gereinigt, nochmals mit milli-Q-Wasser nachgespült und mit Stickstoff getrocknet.

Herstellung der mizellaren Goldpolymerlösung

Polystyrol-(500)-block-poly(2-Vinylpyridin)-(270) wurde in Toluol (5mg/ml) gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur (RT) gerührt. Anschließend wurde (3,66 mg/1ml Toluol)

Tetrachlorgoldsäure ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) unter Schutzgasatmosphäre hinzugegeben und erneut 24 Stunden bei RT unter Lichtausschluss gerührt.

Die Menge der Goldsäure ergibt sich aus der Anzahl der P2VP-Einheiten und der Konzentration des Diblock-Copolymers sowie der gewünschten Beladung, siehe Kapitel 2.2.

3.4.1 Nanostrukturierung der Glasoberfläche

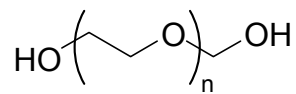
Die gereinigten Glassubstrate wurden bei konstanter Geschwindigkeit von 12 mm/min in die entsprechende Lösung (siehe Kapitel 3.4) eingetaucht und wieder herausgezogen.

Die Glasplättchen wurden anschließend für 30 Minuten bei 150 W und 0,4 mbar einen Wasserstoffplasma ausgesetzt und für 24 Stunden in einem Ofen bei 200 °C getempert.

Passivierung der nanostrukturierten Glasoberfläche

Die nanostrukturierten Glassubstrate wurden für homogene Passivierung der Glasfläche zwischen den Goldpunkten für 10 min im Wasserstoffplasma bei 150 W und 0,4 mbar aktiviert. Dadurch erhalten Glasoberflächen eine hydrophile (OH-terminierten) Eigenschaft.

Diese aktivierten Glasoberflächen wurden anschließend mit der in Abbildung 25 dargestellten Siloxan-terminierten PEG-Verbindung umgesetzt; diese wird im folgenden vereinfachender Weise als PEG2000 bezeichnet.



m-PEG mit $n=45$

Abb. 25: Struktur von Polyethylenglykol (PEG-2000)

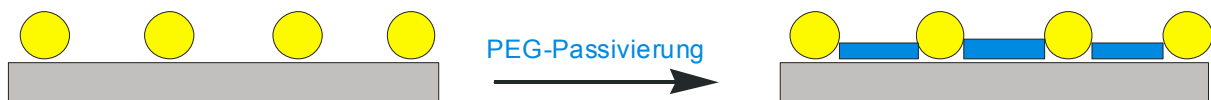


Abb.26: Passivierung des Gold-nanostrukturierten Glassubstrats

In einem 50 ml Schlenckkolben wurden 4 Glassubstrate in 10 ml getrocknetem Toluol und 5 mg PEG-2000 (0,25 mM) vorgelegt. Als Katalysator wurde ein Tropfen Triethylamin hinzugegeben. Die Lösung wurde für 24 h bei 80 °C zur Reaktion gelassen. Zur Aufbereitung wurden die Proben mit Ethylacetat gewaschen und 2 Minuten im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurde nochmals mit Ethylacetat gewaschen und zum Schluß mit Methanol gespült und mit Stickstoff getrocknet.

Die passivierten nanostrukturierte Glassubstrate wurden direkt mit 1 mM ethanolischen Lösung der photolabilen Thiolverbindung (HS-CH₂)₁₁-EG₂-NPOC adsorbiert. Dabei wurde die Thiollösung auf einer Parafilm beschichteten Petrieschale pipetiert, darauf wurden die Glassubstrate eingelegt. Die Proben wurden unter Lichtausschluss aufbewahrt. Nach der Adsorption wurden die Proben mit Ethanol ab gespült und im Stickstoff-Strom getrocknet. Bis zur jeweiligen Anwendung wurden die Proben unter Schutzgas aufbewahrt

3.5 Präparation der Thiolmonolagen auf homogenen Goldwafer

Präparation der homogener Goldwafer

Zur Präparation der Monolagen wurde polykristallines Gold verwendet, welches durch thermisches Aufdampfen auf einen einseitig polierten Silicium(100)-Wafer mit einer Schichtdicke von 0,5 mm hergestellt wurde. 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.

Reinigung der Goldwafer

Sämtliche Gefäße und Pinzetten wurden vor Gebrauch in einer Ethylacetat/Methanol-Lösung im Ultraschallbad gereinigt, um schwefelhaltige Verunreinigungen auszuschließen. Die geschnittenen Goldwafer wurden mit Stickstoff abgeblasen und vor Adsorption des Thiols nochmals für 15 Minuten bei 150 W mit 0,4 mbar einem Wasserstoffplasma ausgesetzt.

Anschließend wurden die Goldwafer über Nacht (ca. 12 Stunden) in eine 1 mM Lösung der Verbindung HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC eingelegt. Als Lösungsmittel für das Thiol diente ausschließlich Ethanol p.a. Nach Adsorption wurden die Wafer aus dieser Lösung herausgeholt und zur Beseitigung physisorbierter Bestandteile 5 Minuten lang in Ethanol im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden die Proben mit Ethanol abgespült und im Stickstoff-Strom getrocknet. Bis zur jeweiligen Anwendung wurden die Proben unter Schutzgas aufbewahrt.

3.6 Photostrukturierung der nanostrukturierten Glasgolddots und der Goldwafer

Nach Adsorption der Verbindung HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC auf den Goldoberflächen (Goldwafer und Gold-Nanodots) erfolgte eine strukturierte Abspaltung der MeNPOC-Schutzgruppe durch den Einsatz von Lochmasken, die auf den Oberflächen aufgelegt wurden.

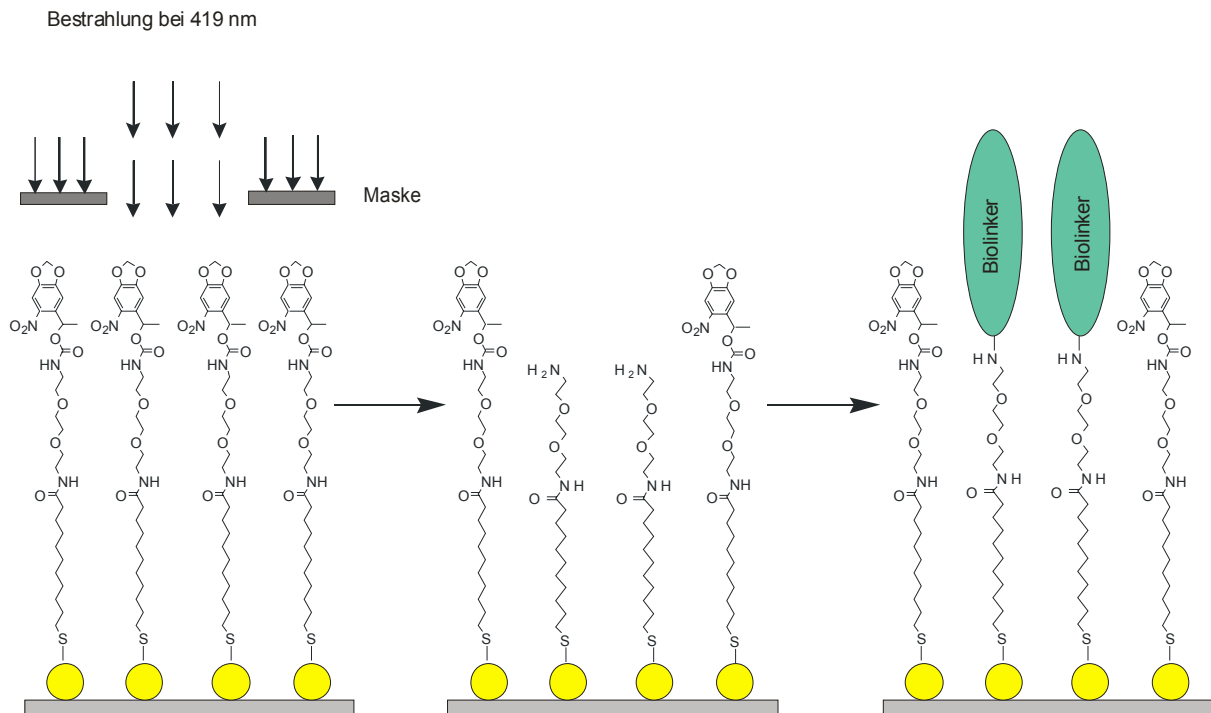


Abb. 27: Schematische Darstellung der Photostrukturierung auf Goldwafer und Glassubstrat

Hierbei kamen 2 verschiedene Lochmasken zum Einsatz:

- Lochdurchmesser 1 mm²; Lochabstand 1 mm

Die Bestrahlung der Oberfläche erfolgte mit einem UV-Reaktor, der 8 UV-Röhren (Firma Southern New England, Brandford, USA) in einem Abstand von etwa 1 cm zueinander aufweist. Diese strahlen Licht einer Wellenlänge von 419 nm aus; die Bestrahlungszeit betrug jeweils 25 min. Während der Bestrahlung befanden sich die Substrate in einer zuvor entgasten absoluten Ethanollösung. Die Bestrahlung erfolgt in Lösung um auszuschließen, dass die SAMs einer reaktiven Sauerstoffumgebung ausgesetzt sind, die einen oxidativen Abbau bewirken würde. Nach der Bestrahlung wurden die Proben mit milli-Q-Wasser und anschließend mit Ethanol abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

3.7 Kovalente Immobilisierung von NHS-Biotin und Umsetzung mit Streptavidin AlexaFluor 488

Nach Abspaltung der MeNPOC-Schutzgruppe (s. Abschnitt 3.6) wird die freigelegte Aminogruppe mit NHS-Biotin unter Ausbildung einer Amidbindung (s. Abb. 28) umgesetzt.

Hierzu wird eine 15µM Lösung von NHS-Biotin in DMF/PBS (1:1) hergestellt und die Lösung auf einer Parafilm beschichteten Petrischale pipettiert und darauf werden die Substrate eingelegt; die Reaktionszeit beträgt etwa 5 h. Anschließend werden die Proben mehrmals für ca. 1 h mit einer frischen PBS-Tween-20 – Lösung gewaschen. Nach der kovalenten Anbindung von Biotin erfolgt die Umsetzung mit Streptavidin AlexaFluor 488 (s. Abb. 28). Dieses wird in einer Konzentration von 25 µg/ml in PBS eingesetzt; die Reaktionszeit beträgt 5h. Die Proben werden wieder mehrmals mit einer PBS-Tween-20 – Lösung und anschließend mit milliQ-Wasser gewaschen. Anschließend werden die Proben im Stickstoff-Strom getrocknet und unter Stickstoff aufbewahrt.

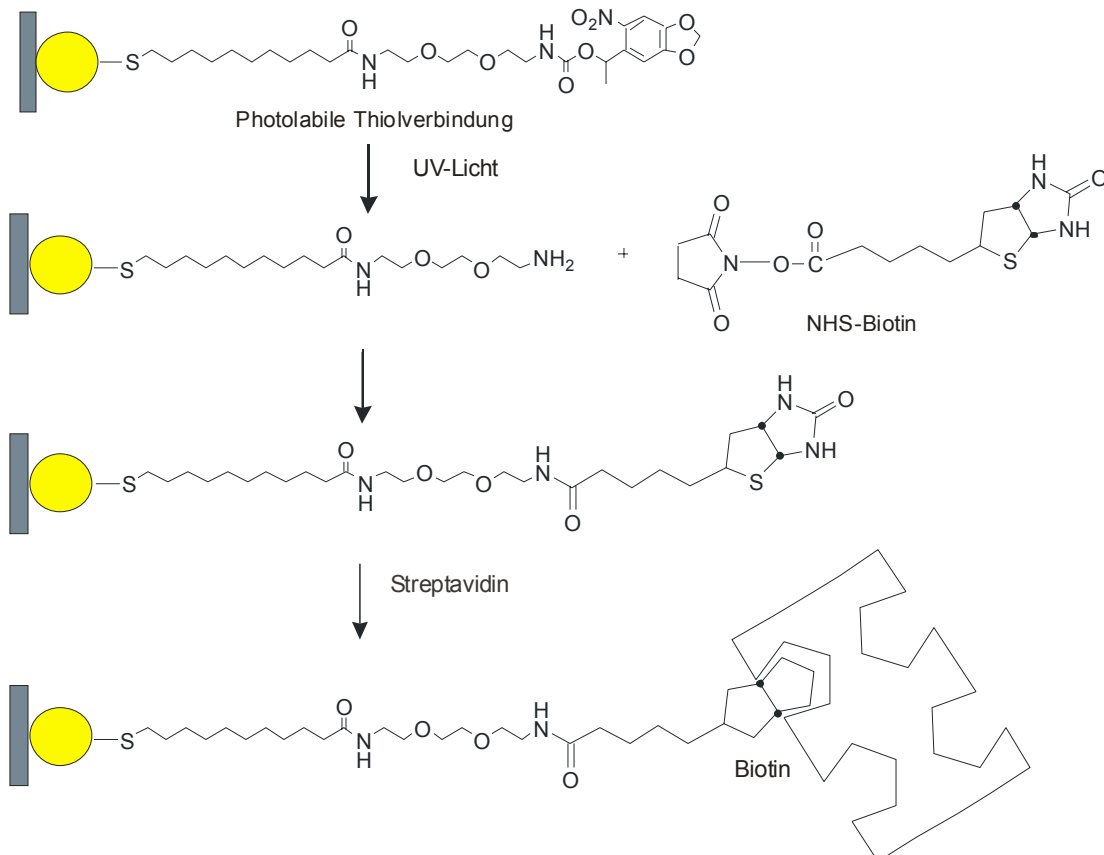


Abb. 28: Schematische Ankopplung von NHS-Biotin und Streptavidin Alexa Fluor 488

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 XPS-Messungen

Aus der Abschwächung des Gold 4f-Signals (s. Abb. 11) lassen sich nach der Formel (8) die Schichtdicken d der Filme berechnen. Aus dem Vergleich der gemessenen Schichtdicke und der im Fall einer vollständigen Bedeckung theoretisch zu erwartenden Schichtdicke kann der Bedeckungsgrad bestimmt werden.

Als Referenz zur Berechnung eines Bedeckungsgrades wurde eine Schichtdicke veranschlagt, welche einer vollständig gestreckten Anordnung der Verbindung entspricht. Diese entspricht einem hypothetischen Zustand, dem eine Bedeckung von 100% zugeordnet wurde; der so berechnete Bedeckungsgrad gibt jedoch Aufschluss über die Orientierung der adsorbierten Moleküle auf der Oberfläche. Zur Berechnung des beschriebenen Referenzwertes wurde eine Inkrementrechnung herangezogen; für die einzelnen funktionellen Bestandteile der Verbindung wurden hierbei die folgenden Werte veranschlagt [83, 84, 85, 86, 87]:

- 1,26 Å für die CH₂-Einheit einer Alkylkette, die senkrecht auf der Oberfläche liegt
- 2,78 Å für die OCH₂CH₂-Einheit einer (EG)_n-Kette, die sich in einer helikal-gestreckten trans-gauche-trans Konformation befindet
- 1,0 Å für eine C-O – Bindung
- 1,2 Å für eine C=O-Bindung
- 1,45 Å für die C-N-Einfachbindung
- 1,32 Å für die C-N-Peptidbindung
- 1,3 Å für die Schwefel-Kopfgruppe

Mittels dieser Werte ergeben sich für die nach den einzelnen Umsetzungen resultierenden Adsorbatlagen im Fall einer hypothetischen 100%-igen Bedeckung die in der Tabelle 13 aufgeführten Schichtdicken d_{100} . Die Tabelle enthält außerdem die tatsächlich gemessenen Schichtdicken d und den nach der Formel

$$\Theta = d/d_{100} \quad (26)$$

berechneten Bedeckungsgrad θ .

Tab.13: Schickdickenbestimmung mittels XPS [88, 89, 90]

Monolage	Tatsächliche Schichtdicke [Å]	Hypothetische Schichtdicke [Å] (100% bedeckt)	Bedeckungsgrad θ [$\pm 4\%$]
Thiol mit Schutzgruppe	34,7	34,1	100
Nach der Schutzgruppen-Abspaltung	24,9	25,6	97,2
Nach der Biotin-Anbindung	33,4*	35,9	93
Nach Umsatz mit Streptavidin Alexa-Fluor 488	87,70	35,9 + 49,3= 85,2	

Es ist zu erwarten, dass die Alkanspacer einen dicht gepackten Basisfilm ausbilden und so die adsorbierten Moleküle in eine gestreckte Ordnung zwingt. Ein realistischer Bedeckungsgrad würde somit zwischen etwa 70-80% liegen. Der berechnete Bedeckungsgrad von etwa 100% deutet somit darauf hin, dass zwar eine gestreckte Molekülordnung vorliegt, jedoch auch eine Multilagen-Bildung stattgefunden hat. Diese physisorbierten Bestandteile sind wahrscheinlich für die erhöhten Schichtdicken verantwortlich.

Es ist zu erwarten, dass sich die Schutzgruppe MeNPOC (9,6 Å) nach der Bestrahlung der HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC-Film vollständig abspalten wird.

Dabei beträgt die Schichtdicke des bestrahlten Films 24,9 Å, insgesamt hat die Schichtdicke des HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC-Film um 9,8 Å abgenommen. Dieser Wert bestätigt unsere Erwartungen. Daher kann auf eine quantitative MeNPOC-Schutzgruppenspaltung geschlossen werden.

Nach der Ankopplung des NHS-Biotins an die aminoterminierte Oberfläche beträgt die Schichtdicke des Biotin-Films 33,9 Å [88], das bei einem Theoriewert von 35,9 Å auf eine vollständig ausgebildete Monoschicht hindeutet.

Die anschließende Umsetzung des Biotin-Films mit dem Streptavidin-Molekül [89, 90] zeigt eine Proteinschicht von 87,7 Å. Dieser Wert deutet auf eine dichtgepackte, quantitative ausgebildete Monoschicht hin. Denn laut Literatur von Spinke et. al [88] beträgt die Breite des Protein-Moleküls Streptavidin (45x45x58 Å).

4.1.2 XP-Spektren der Monolagen vor und nach der Bestrahlung

4.1.2.1 Kohlenstoff-(C1s)-Signal

In der Tabelle 14 sind die für eine Monolage der Verbindung HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC (s. Abb. 29) theoretisch zu erwartenden C1s-Signale aufgeführt.

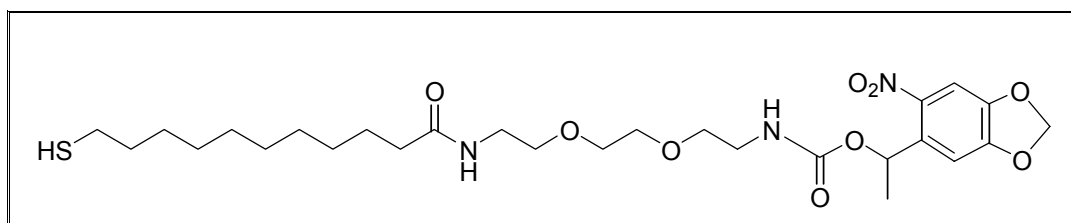


Abb.29: Schematische Zuordnung der Kohlenstoffatome im photolabilen Thiol

Tab. 14: Referenzwerte [91] für C1s-Bindungsenergie der photolabilen Thiol

C1s-Signal [eV]	Bindungszustand des C-Atoms
285,0 - 285,9	(-CH ₂ -CH ₂ -) _n
288,6	-CH ₂ -CONH-
286,45	(-CH ₂ -CH ₂ -O) _n
285,0	(-CONH-CH ₂ -CH ₂ -) _n
286,02	(-CONH-CH ₂ -CH ₂ -) _n
289,0	(-NH-COO-C)
285,0	(-NH-COO-CH-CH ₃ -)
286,98	(-NH-COO-CH-CH ₃ -)
284,5 – 284,7	aromatische C-Atom
287,9	(O-CH ₂ -O-)

Nach der Abspaltung der photolabilen Schutzgruppe (MeNPOC) liegt der in Abbildung 30 dargestellte aminoterminierte SAM vor. In der Tabelle 15 sind die für diese Monolage theoretisch zu erwartenden C1s-Signale aufgeführt.

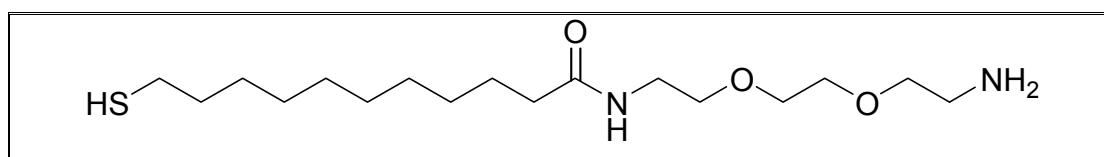


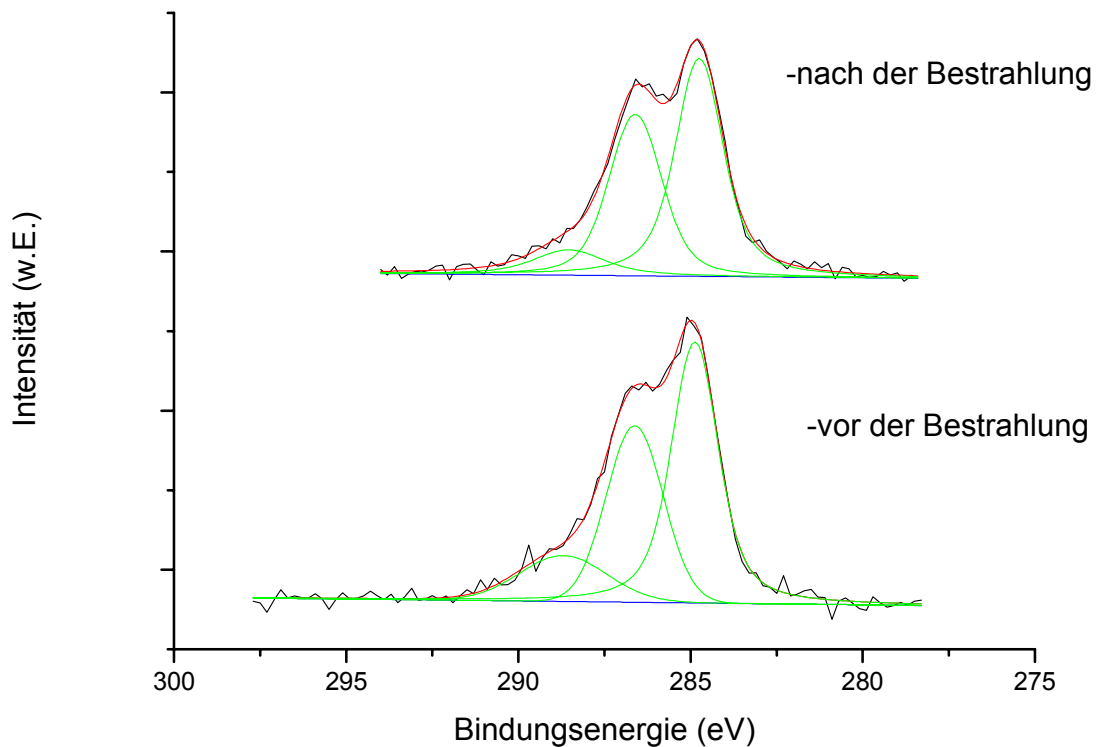
Abb. 30: Schematische Zuordnung der C1s-Atome im aminoterminierte Thiolverbindung

Tab. 15: Referenzwerte [91] für C1s-Bindungsenergie der aminoterminierte Thiolverbindung

C1s-Signal [eV]	Bindungszustand des C-Atoms
285,0 - 285,9	(-NH-COO-CH- CH ₃ -)
288,6	-CH ₂ - C ONH-
285,0	-CONH- C H ₂ -CH ₂ -
286,02	-CONH-CH ₂ - C H ₂ -
286,45	(-CH ₂ - C H ₂ -O) _n
285,0 – 286,22	-O- C H ₂ -CH ₂ -NH ₂

In der Abbildung 31 ist das C1s-Detailsspektrum einer Monolage der Verbindung HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC (vor Abspaltung der Schutzgruppe) dargestellt. Die C1s-Signale der Alkyl- und der Nitrophenylgruppe konnten nicht separiert werden und wurden daher für ein Signal angepasst (Signallage 284,9 eV). Ebenso war es auch nicht möglich, die C1s-Signale der Ethylenglykol-Kohlenstoffe und der methylenischen C-Atome getrennt anzupassen, diese ergaben eine Signallage bei 286,6 eV.

Insgesamt wurde das C1s-Detailsspektrum daher mit 3 Signallagen angepasst; das Signal bei 288,7 eV ist auf die -CH₂-**C**ONH; -NH**C**OO-C; (-O-**C**H₂-O)-Gruppe zurückzuführen.



**Abb.31: Vergleich der C1s-Spektren einer Monolage der Verbindung (HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC); vor (unten) und nach (oben) der Schutzgruppen-Abspaltung
blau=Basislinie, grün= angepasste Signallagen; rot= aufgenommenes Spektrum**

Wie schon oben beschrieben wurden die aromatischen C-Atome und die methylenischen C-Atome (-CH₂-CH₂-; -CONH-CH₂-CH₂-) als ein Signal angepasst. Dieses hat sein Maximum bei 284,9 eV.

Bei 286,6 eV erscheint das Signal der methylenischen C-Atome, die der Amidgruppe direkt benachbart (-CONH-CH₂-CH₂-) sind, sowie der Peak für die Ethylenglykol-Kohlenstoffe (-CH₂-CH₂-O) und den Methyl-Kohlenstoff, die an ein tertiäres C-Atom gebunden sind (-NH-COO-CH-CH₃-) .

Der Referenzwert für diese Gruppen liegen laut der Tabelle 14 in einem Bereich zwischen 286,0 bis 286,4 eVolt.

Das dritte Signal bei 288,7 eVolt kann den carboxylischen C-Atomen der Amidgruppe (-CH₂-CONH; -NHCOO-C) (Referenzwert bei 288,6 eVolt und 289,0 eVolt) sowie dem C-Atom der Methylendioxy-Gruppe (O-CH₂-O-) am Aromaten (Referenzwert bei 287,9 eVolt) zugeordnet werden.

Nach Abspaltung der Schutzgruppe wird erwartungsgemäß eine Veränderung in den C1s-Detailspektren beobachtet (s. Abb. 31). Das Signal für die methylenischen Kohlenstoffatome erscheint nun bei 284,7 eV. Durch den Verlust der Aromatengruppe ist das Signal um 0,2 eV zu niedrigerer Bindungsenergie verschoben; wie zu erwarten, wird ebenfalls eine Intensitätsabnahme festgestellt: Das Flächenintegral nimmt von 688 um 89 willkürliche Einheiten (w.E.) ab.

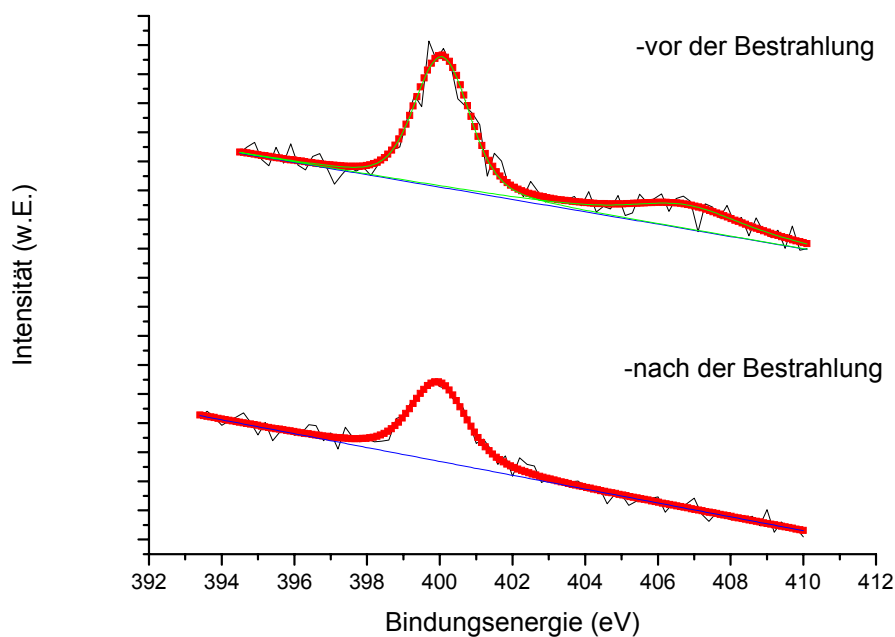
Die Signale der methylenischen C-Atome, die der Amidgruppe direkt benachbart sind sowie der Ethylenglykol-Kohlenstoffe zeigen hingegen keine Veränderung.

Die den carboxylischen C-Atomen entsprechende Signallage bei 288,5 eV zeigt durch den Verlust der NHCOO- und der Methylendioxy-Gruppe einen Intensitätsverlust; das Flächenintegral dieses Signals nimmt von 183 um 76 Einheiten ab.

4.1.2.2 Das Stickstoff-(N1s)-Signal

In der Abbildung 32 sind die vor und nach der Schutzgruppen-Abspaltung aufgenommenen N1s-Detailspektren abgebildet. Die Tabelle 16 enthält die für die unterschiedlich gebundenen Stickstoffatome theoretisch zu erwartenden Signallagen.

Das N1s-Detailspektrum der photolabilen Thiolverbindung sollte erwartungsgemäß zwei Signallagen mit einem Flächenverhältnis von 2:1 aufweisen, die dem Stickstoff der Amid- und der Nitrophenylgruppe zugeordnet werden können.



**Abb. 32: Vergleich des N1s-Spektrums vor (oben) und nach (unten) der Bestrahlung
blau=Basislinie, grün= angepasste Signallagen; rot= aufgenommenes Spektrum**

Tab. 16: Referenzwerte [91] für N1s-BE der Thiolverbindung vor und nach der Bestrahlung

N1s-Signallage [eV]	Bindungszustand des N-Atoms
399,84	-CH ₂ -CONH-CH ₂ -
400,32	-CH ₂ -NH-COO-C-
405,2	-NO ₂ -C ₆ H ₆ -
399,84	-CH ₂ - CH ₂ -NH ₂ -

Das N1s-Signal des Amid-gebundenen Stickstoffs (-CONH und -NHCOO) des photolabilen Thiol-Spektrums erscheint bei 400,05 eV. Dies stimmt mit dem Referenzwert von 399,84 für die CONH- und von 400,32 eV für die NHCOO-Gruppe gut überein.

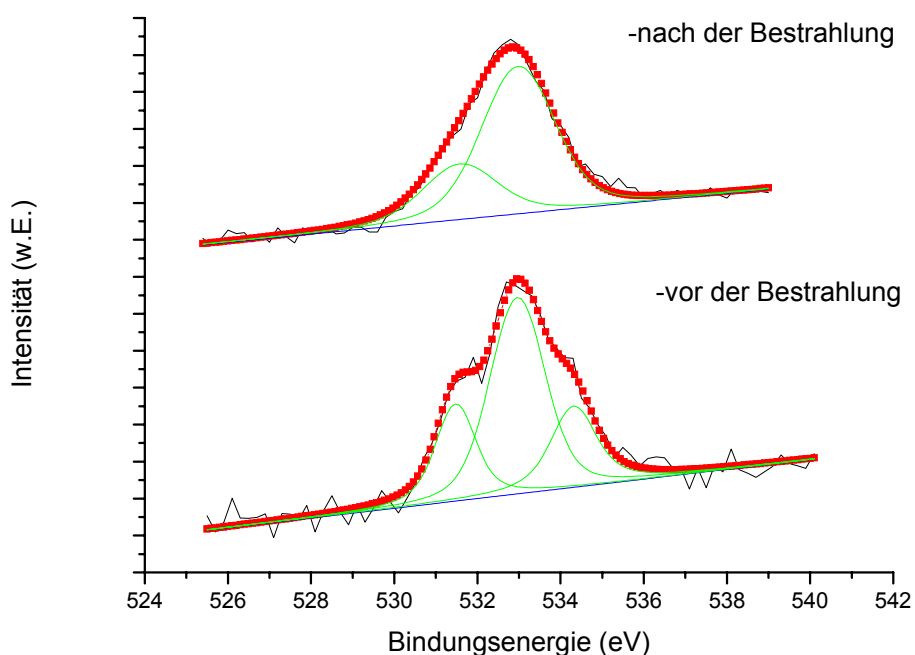
Bei 406,7 eV erscheint das auf die Aromat-gebundene Nitrogruppe zurückzuführende N1s-Signal; der Referenzwert für dieses Signal liegt bei 405,0 eV.

Durch die photochemische Schutzgruppen-Abspaltung sollte es zu einer Veränderung in den N1s-Spektren kommen. Der mit der Schutzgruppen-Abspaltung verbundene Verlust der Nitrogruppe (Signal bei 406,7 eV) ist in den Spektren anhand einer Intensitätsabnahme deutlich erkennbar (s. Abbildung 32). Bei 399,9 eV erscheint das Signal für die N1s-CONH und N1s-C-NH₂-Gruppen.

4.1.2.3 Das Sauerstoff-(O1s)-Signal

In der Abbildung 33 sind die vor und nach der Schutzgruppen-Abspaltung aufgenommenen O1s-Detailspektren abgebildet. Die für die unterschiedlich gebundenen Sauerstoffatome zu erwartenden Signallagen sind in der Tabelle 17 aufgeführt.

Das Sauerstoffspektrum der photolabilen Thiolverbindung (vor Schutzgruppen-Abspaltung) sollte drei verschiedene Sauerstoff-Signallagen aufweisen.



**Abb. 33: Vergleich des O1s-Signals vor (unten) und nach (oben) der Bestrahlung
blau=Basislinie, grün= angepasste Signallagen; rot= aufgenommenes Spektrum**

Tab. 17: Referenzwerte [91] für O1s-Bindungsenergie vor und nach der Bestrahlung

O1s-Signallage [eV]	Bindungszustand des O1s-Atoms
531,33	-CH ₂ -CO-NH-
532,83	(-CH ₂ -CH ₂ -O-) _n
531,9	-CH ₂ -NH-CO-O-C-
533,63	-CH ₂ -NH-CO-O-C-
532,45	-NO ₂ -C ₆ H ₆ -
533,06	- O-CH ₂ -O-

Die in den $-\text{CH}_2\text{-CONH}$ und NHCO-O -Gruppen gebundenen carbonylischen O-Atome führen zu einer Signallage bei 531,5 eV (s. Abbildung 33); dies stimmt mit dem Referenzwert von 531,3 eV gut überein.

Die Sauerstoff-Atome der Ethylenglykol-Einheiten ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$) und der am Aromaten gebundenen Nitrogruppe ($-\text{NO}_2\text{-C}_6\text{H}_5\text{-}$) erscheinen bei 532,9 eV. Auch dies stimmt mit dem Referenzwert von 532,8 und 532,4 eV (s. Tabelle 17) gut überein.

Der Signallage bei 534,3 eV können die in der $-\text{CH}_2\text{-NH-CO-O-C-}$ und $-\text{O-CH}_2\text{-O-}$ Gruppe gebundenen Sauerstoffatome zugeordnet werden.

Nach Abspaltung der Schutzgruppe sollte das O1s-Detailspektrum nur noch 2 Signallagen aufweisen: Das Signal bei 531,6 eV ist auf die $-\text{CONH}$ -Gruppe und das Signal bei 532,9 eV auf die ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$)-Gruppe zurückzuführen.

Der Verlust des vor der Schutzgruppen-Abspaltung beobachteten Signals bei 534,4 eV (Alkoxyisauerstoff in der NH-COO -Gruppe) zeigt eindeutig den Verlust der MeNPOC-Schutzgruppe an.

In der Abbildung 33 ist ein nach der Schutzgruppen-Abspaltung aufgenommenes O1s-Detailspektrum abgebildet. Das Signal bei 531,6 eV ist dem Carbonylsauerstoffatom der CONH -Gruppe zuzuordnen; der zugehörige Referenzwert liegt bei 531,3 eV.

Das Signal bei 532,9 eV ist den Ether-Sauerstoffatomen ($-\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$) zuzuordnen.

4.1.2.4 Das Schwefel-(S2p)-Signal

Die Abbildung 34 zeigt ein vor und nach der Schutzgruppen-Abspaltung aufgenommenes S2p-Detailspektrum.

Die theoretisch zu erwartenden Signallagen sind in der Tabelle 18 aufgeführt.

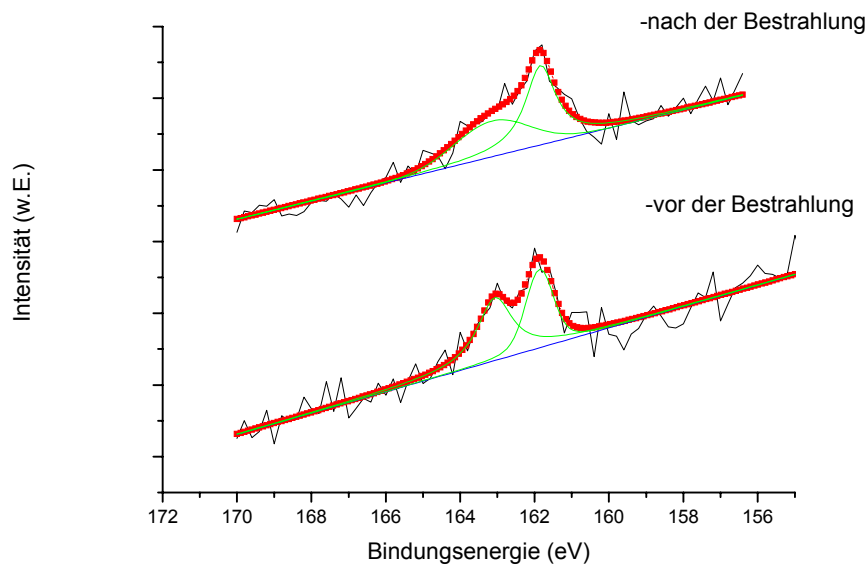


Abb. 34: Vergleich der S2p-Signal vor (links) und nach (rechts) der Bestrahlung blau=Basislinie, grün= angepasste Signallagen; rot= aufgenommenes Spektrum

Tab. 18: Referenzwerte [91] für S1s-Bindungsenergie vor und nach der Bestrahlung

S2p-Signallage [eV]	S2p-Bindungszustand
162	S2p _{1/2}
164	S2p _{3/2}

Das S2p-Signal des geschützten Thiols (Abbildung 34) zeigt sowohl vor als auch nach der Schutzgruppenabspaltung das typische Schwefeldoublett. Das Intensitätsverhältnis der beiden Peaks beträgt dabei erwartungsgemäß 2:1.

Aufgrund des geringen Wirkungsquerschnitts des Schwefels und der Signallabschwächung durch den darüberliegenden Film wird nur eine geringe Signalintensität beobachtet. Die Verfolgung der Signalintensität erlaubt daher gegebenenfalls nur qualitative Aussagen. Deshalb wird im folgenden auf Interpretation der S2p-Detail-Spektrum verzichtet.

4.1.3 XP-Spektrum nach Umsatz mit NHS-Biotin und Streptavidin Alexa Fluor 488

Die Bestrahlung führt zur Schutzgruppen-Abspaltung und somit zur Freilegung einer Aminogruppe. An diese wird im folgenden Schritt unter Ausbildung einer Amidbindung Biotin gebunden (durch Umsatz mit NHS-Biotin). Anschließend erfolgt eine selektive Anbindung von Streptavidins Alexa Fluor488 an das Biotin.

4.1.3.1 Das Kohlenstoff-(C1s)-Signal

In der Tabelle 20 sind die nach Umsetzung mit Biotin theoretisch zu erwartenden Signallagen aufgeführt.

Anhand der aufgenommenen XP-Spektren können die Bindung der Proteinadsorption ebenfalls qualitativ analysiert werden. Durch die proteineigenen Kohlenstoff-, Sauerstoff- und der Stickstoffspezies treten zusätzliche Signallagen im C1s-Detailspektrum auf. In der Tabelle 19 sind die Signallagen der Proteinadsorption aufgeführt.

Tab. 19: Referenzwerte [92] für die Bindungsenergien der Proteinadsorption

C1s-Signallage [eV]	Bindungszustand des C1s-Atoms
284,3	$(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-)_n$
287,1	-C-N
288,3	-C=O
O1s-Signallage [eV]	Bindungszustand des O1s-Atoms
531,7	(-C=O)
532,7	(-C-O)
N1s-Signallage [eV]	Bindungszustand des N1s-Atoms
400,3	$(-\text{CH}_2-\text{NH}-)$; $(-\text{CO}-\text{NH})$

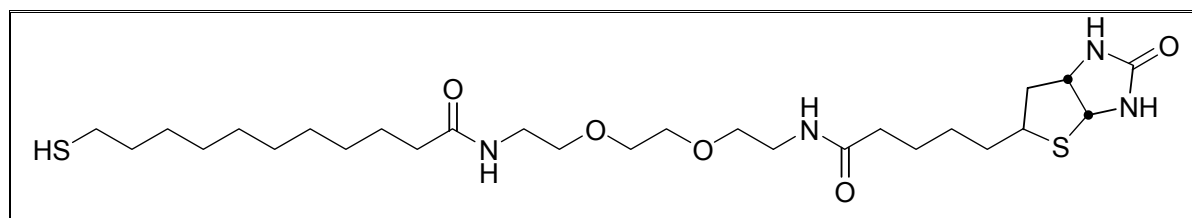


Abb. 35: Schematische Zuordnung des NHS-Biotins an die aminoterminierte Thiolverbindung

Tab. 20: Referenzwerte [91] für C1s-Bindungsenergie der NHS-Biotin Ankopplung an die amin-terminierte Thiolverbindung

C1s-Signallage [eV]	Bindungszustand des C1s-Atoms
285,0 - 285,9	(-CH ₂ -CH ₂ -) _n
287,97	-CH ₂ -CONH-
285,0	(-CONH-CH ₂ -CH ₂ -) _n
286,02	(-CONH-CH ₂ -CH ₂ -) _n
286,45	(-O-CH ₂ -CH ₂ -) _n
285,5	(-CH ₂ -S-CH ₂ -) _n
288,84	-NH-CO-NH-
285,2	(-C-CH-C)

Auch hier kommt es aufgrund zu geringer Auflösung zu einer Überlagerung mehrerer Signallagen. Die nach der Biotin- und Streptavidin-Umsetzung aufgenommenen C1s-Detailspektren wurden mit insgesamt 3 verschiedenen Signallagen angepasst.

Bei dem Biotin-C1s-Spektrum beobachtet man für die (-CH₂-CH₂-), (-CH₂-S-CH₂-) und die (-C-CH-C)-Gruppen eine Überlagerung zu einem Signal bei 284,4 eVolt.

Bei 286,3 eVolt werden die C1s-Signale der Verbindung (-CONH-CH₂-CH₂-) und (-O-CH₂-CH₂-) zu einem Signal zugeordnet.

Und als nächstes folgen die Signale der Carbonyl-C-Atome (-CH₂-CONH- und NH-CO-NH-) in der Amidgruppierung bei 288,6 eVolt.

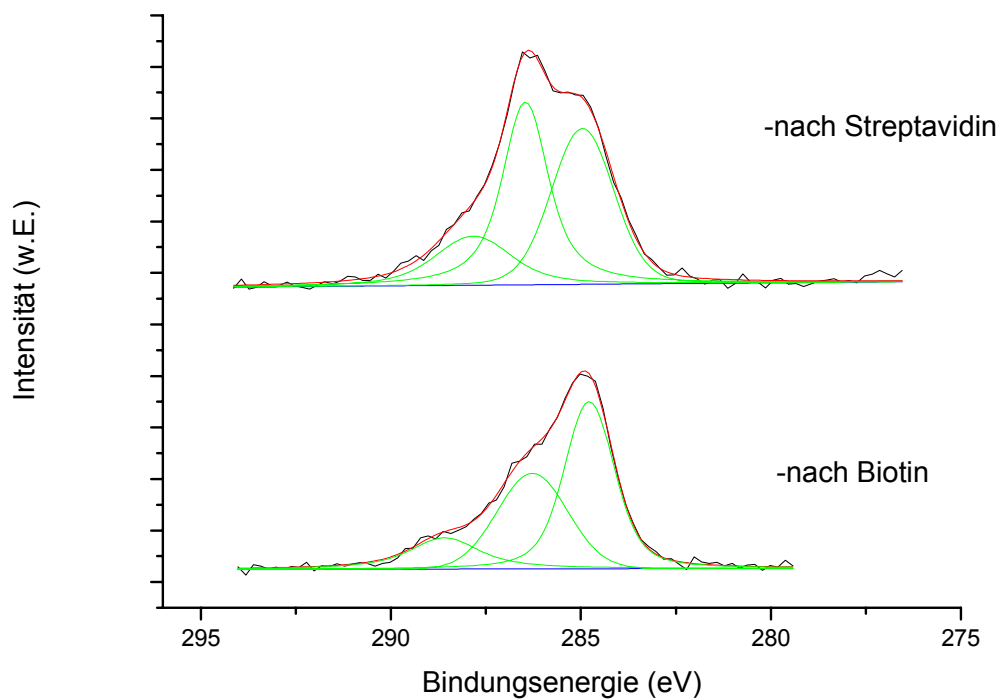


Abb. 36: Vergleich der C1s-Bindungsenergie mit Biotin (unten) und Streptavidin Alexa Fluor488 (oben); blau=Basislinie, grün= angepasste Signallagen; rot= aufgenommenes Spektrum

Nach der Umsetzung mit Streptavidin werden ebenfalls diese 3 Signallagen beobachtet. Durch diese Proteinanbindung wird jedoch eine erhebliche Signallage bei 286,3 eV von 430 um 457 willkürliche Einheiten beobachtet. Ebenso beobachtet man bei 288,1 eV eine Erhöhung der Intensität um 100 Einheiten.

4.1.3.2 Das Stickstoff-(N1s)-Signal

In der Tabelle 21 sind die nach Umsetzung mit Biotin theoretisch zu erwartenden Signallagen aufgeführt.

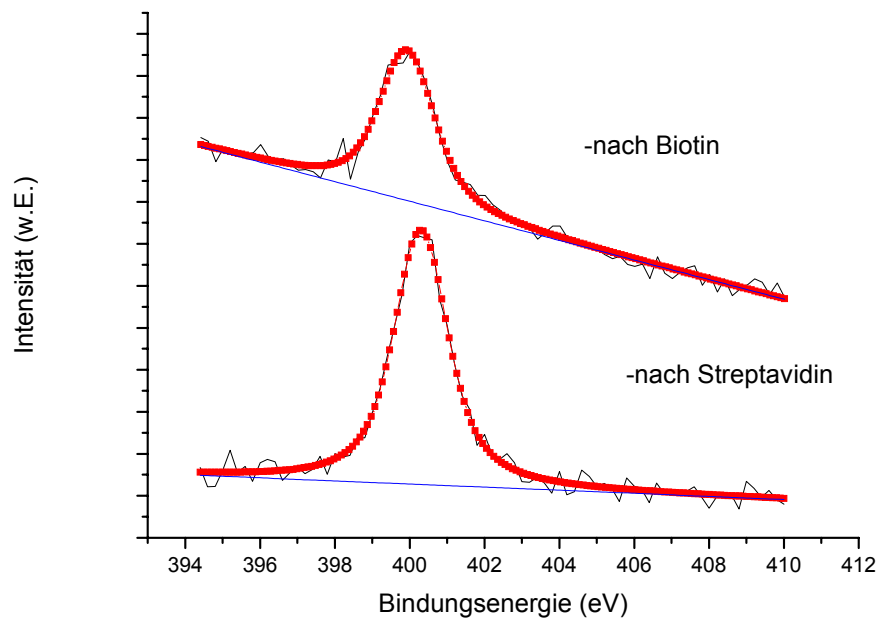


Abb. 37: Vergleich der N1s-Spektrum nach der Ankopplung von Biotin (oben) und Streptavidin AF 488 (unten); blau=Basislinie, rot= angepasste Signallagen

Tab. 21: Referenzwerte [91] für N1s-Bindungsenergie für Biotin und Streptavidin AF488

Referenz-BE [eV]	Zuordnung der N1s-Signal für das anbinden von Biotin und Streptavidin
399,84	-CO-NH-CH ₂ -
399,89	-NH-CO-NH-
400,32	-CH ₂ -NH-COO-C-

Das N1s-Signal des amidischen Stickstoffes (-CO-NH-CH₂- und -CH₂-NH-COO-C-) erscheint bei 399,9 eV, dies entspricht dem Referenzwert von 399,89 eV gut überein. Nach der Ankopplung des tetrameren Streptavidin erscheint das N1s-Signal (Tab.19) für die amidische Gruppe bei 400,3 eV. Wie zu erwarten, wird ebenfalls eine Intensitätszunahme nach der Adsorption des Proteins festgestellt: Das Flächenintegral nimmt von 170 um 120 willkürliche Einheiten zu.

4.1.3.3 Das Sauerstoff-(O1s)-Signal:

In der Tabelle 22 sind die nach Umsetzung mit Biotin theoretisch zu erwartenden Signallagen aufgeführt.

Bei dem Sauerstoff-Spektrum kommt es nach der Umsetzung von Biotin- und Streptavidin zu einer Überlagerung. Insgesamt beobachtet man im Spektrum 2 verschiedene Signallagen. Hier werden die Gruppen (-CH₂-CO-NH-), (-NH-CO-NH-) und (-CH₂-NH-CO-O-C-) zu einem Signal bei 531,9 eV zugeordnet. Und bei 533,1 eV erscheint das Signal für die (-CH₂-NH-CO-O-C-)-Gruppe.

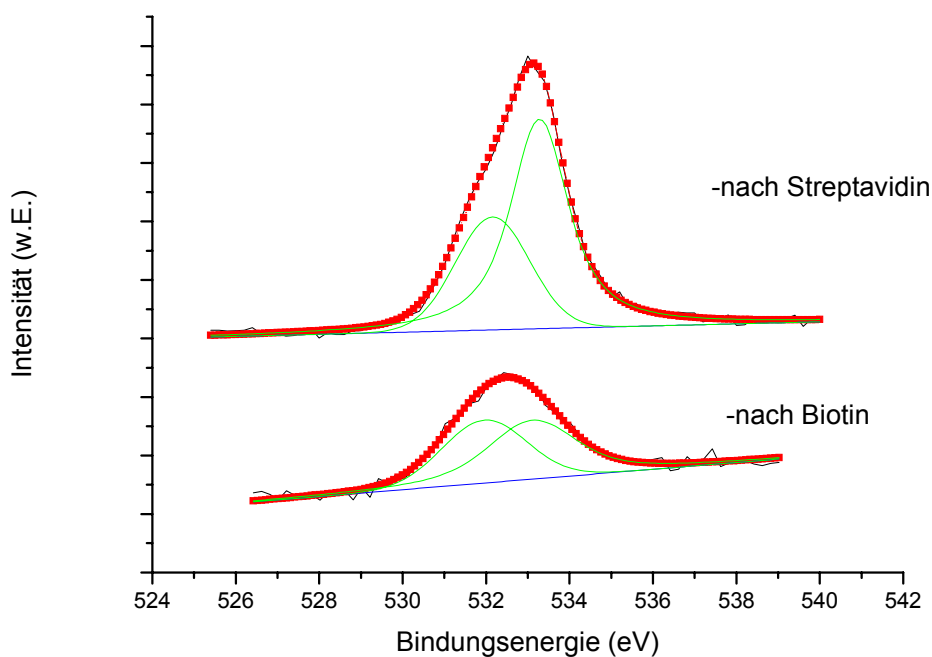


Abb. 38: Vergleich der O1s-Bindungsenergie von Biotin (unten) mit der von Streptavidin AF 488 (oben); blau=Basislinie, grün= angepasste Signallagen; rot= aufgenommenes Spektrum

Tab. 22: Referenzwerte [91] für O1s-Bindungsenergie von Biotin und Streptavidin

Referenz BE [eV]	Zuordnung der O1s-Signal für das anbinden von Biotin und Streptavidin
531,33	-CH ₂ -CO-NH-
532,83	(-CH ₂ -CH ₂ -C-O-) _n
531,41	-NH-CO-NH-
531,9	-CH ₂ -NH-CO-O-C-
533,63	-CH ₂ -NH-CO-O-C-

Für das Sauerstoff-Spektrum wird nach der Proteinadsorption (siehe Tabelle 19), wie zu erwarten, eine Intensitätszunahme festgestellt: Dabei steigt das Flächenintegral der amidischen Sauerstoff-Atom der Carbonyl ($-C=O$)-Gruppe bei 532,1 eVolt von 270 um 160 Einheiten zu. Der Flächeninhalt des Signals bei 533,3 eVolt ($C=O$ -Gruppe der Amidbindung) nimmt von 340 um 520 Einheiten zu.

4.2 QCM-D-Messung

In der Abbildung 29 ist das QCM-D-Spektrum dargestellt, das während der Adsorption der Thiolverbindung auf dem goldbedampften Quarzplättchen aufgenommen wurde. Auch die weiteren Umsetzungsschritte (s.Abb. 40, 41) wurden über QCM-D-Messungen verfolgt.

In der Tabelle 23 sind die jeweils ermittelten Daten sowie die berechnete Massenzunahme (s. Kapitel 2.4.3, Gleichung 14) aufgeführt. Zu erwarten sind in den Spektren bei einer Massenzunahme eine Abnahme der Frequenz- und Zunahme der Dissipationsänderung.

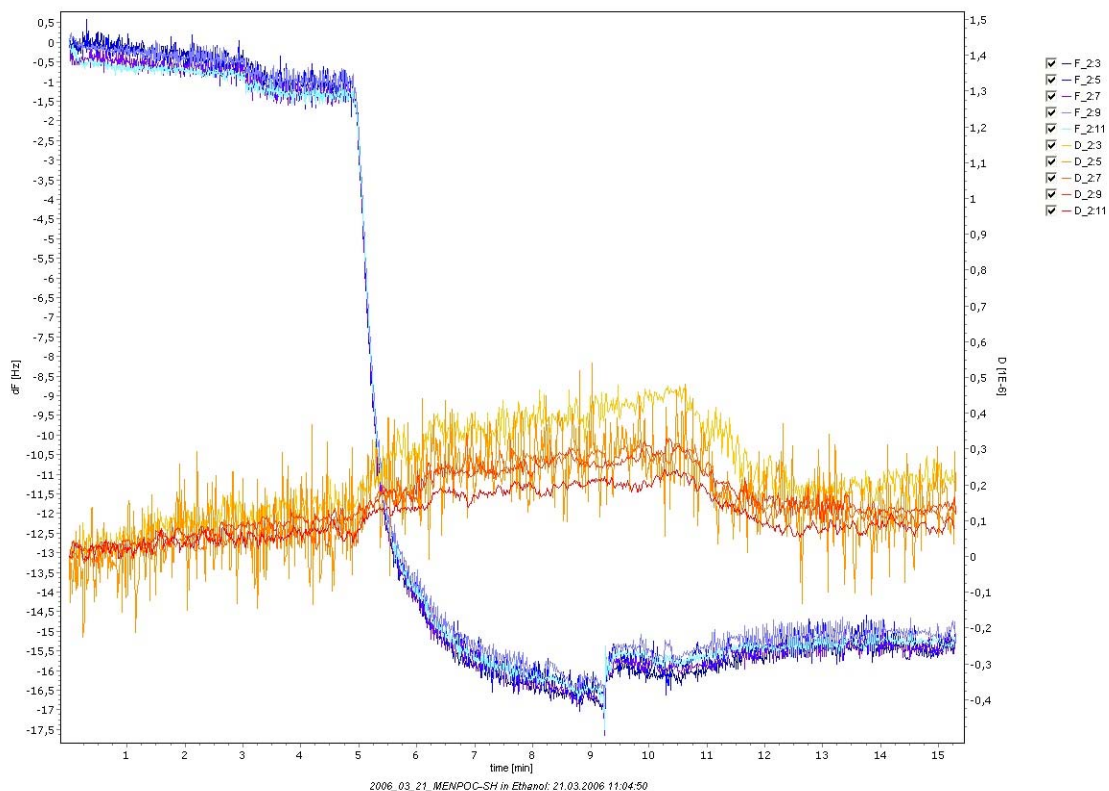


Abb. 39: QCM-D-Spektren von photolabilen Thiolverbindung
blaue Kurve: Frequenzänderung, rote Kurve: Dissipationsänderung
x-Achse: Zeit (min), rechte y-Achse: Dissipation (10^{-6}), linke y-Achse: Frequenz (Hz)

Aus der Abbildung 39 von photolabilem Thiol werden die Daten für die Frequenz- und Dissipationsänderungen als Funktion der Zeit abgelesen. Die blauen Kurven zeigen jeweils die Frequenzänderung und die rote Kurve stellt die Dissipationsänderung dar.

Das QCM-D-Spektrum zeigt bei der Adsorption des photolabilen Thiols nach 3,45 min eine Frequenzänderung von etwa $14 \pm 0,5$ Hz, für die eine Massenzunahme von $247,8 \text{ ng/cm}^2$ berechnet wurde.

Tab.23: QCM-D-Spektrum von photolabilem Thiol mit der Frequenz- und Dissipationsänderung bei dem Oberton $n=3$

Ereignis	Frequenzänderung $\Delta f_3 [\pm 0,5 \text{ Hz}]$	Dissipationsänderung $\Delta \gamma_3 [\pm 0,5]$	$\Delta \gamma_3 / \Delta f_3$ [1/Hz]	Massenzunahme $m [\pm 0,5 \text{ ng/cm}^2]$
Photolabile Thiolverbindung	14	0,1	0,007	$247,8 = 2,5 \text{ nm}$

Im zweiten Teil der Messung wurde die Schutzgruppe des photolabilen Thiols abgespalten. An die entstandene aminoterminierte Gruppe wurde NHS-Biotin und Streptavidin AF488 gebunden.

Aus den Spektren (siehe Abb. 40) ist deutlich zu erkennen, dass das NHS-Biotin kovalent an die aminoterminierte Oberfläche bindet. Hierbei zeigt sich nach 10 min eine Frequenzänderung von 8 Hz, welche eine Massenzunahme von $141,6 \text{ ng/cm}^2$ entspricht. Dieser Wert entspricht unsere Erwartung. Auch die Ankopplung von Streptavidin AlexaFluor 488 an das Biotin erfolgt wie erwartet mit einer Frequenzänderung von 29 Hz. Die Massenzunahme für das Protein beträgt $513,3 \text{ ng/cm}^2$. Insgesamt wurde eine Massenzunahme von $654,9 \text{ ng/cm}^2$ an die aminoterminierte Thiolverbindung beobachtet.

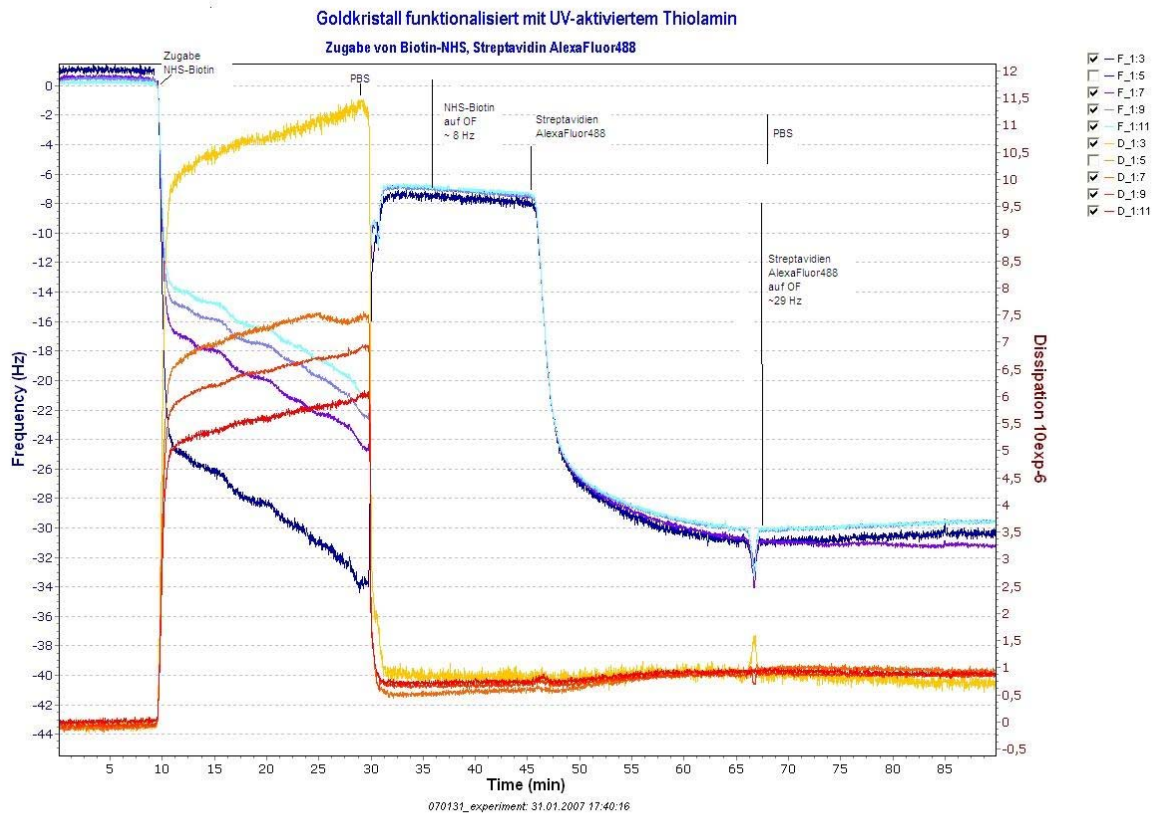


Abb. 40: Anbindung von NHS-Biotin mit Streptavidin AF488 an eine aminoterminierte Oberfläche; x-Achse: Zeit (min), rechte y-Achse: Dissipation (10⁻⁶), linke y-Achse: Frequenz (Hz)

Tab. 24: Anbindung von NHS-Biotin und Streptavidin AF 488 an die aminoterminierte Oberfläche

Ereignis	Frequenzänderung Δf_3 [$\pm 0,5$ Hz]	Dissipationsänderung $\Delta \gamma_3$ [$\pm 0,5$]	$\Delta \gamma_3 / \Delta f_3$ [1/Hz]	Massenzunahme m [$\pm 0,5$ ng/cm ²]
NHS-Biotin	8	0,8	0,1	141,6 = 1,42 nm
Streptavidin AF488	29	0,9	0,03	513,3 = 5,13 nm

Im dritten Teil des Versuches wurde eine Kontrollmessung an einer reinen Goldoberfläche durchgeführt.

In dem Spektrum (Abb. 41) ist zu erkennen, dass das NHS-Biotin von der PBS-Puffer-Lösung fast vollständig gewegewaschen wurde. Die Frequenzänderung beträgt ungefähr 3 Hz. Die Massenzunahme an unspezifischer Bindung beträgt 53,1 ng/cm². Die Ankopplung von Streptavidin AlexaFluor 488 zeigt eine Frequenzänderung von 17 Hz mit einer Massenzunahme von 300,9 ng/cm².

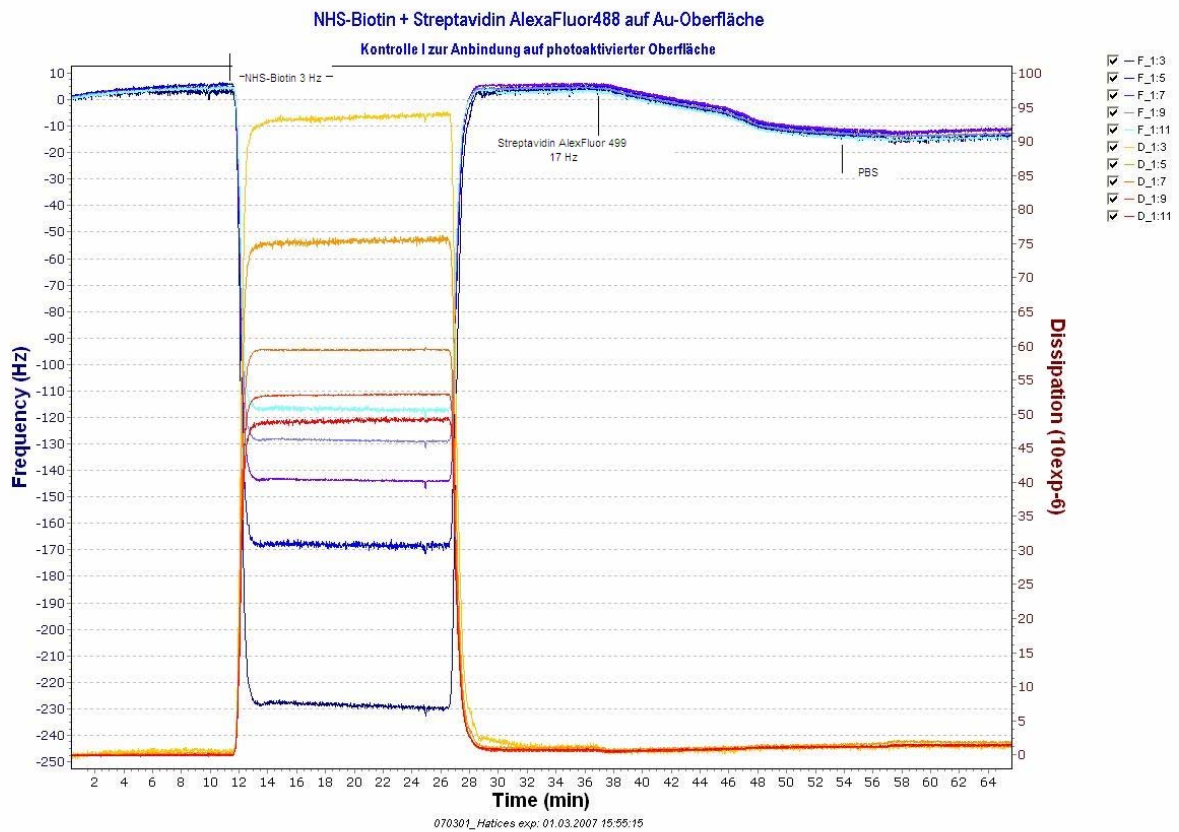


Abb. 41: Kontrollmessung an eine reiner Goldoberfläche
x-Achse: Zeit (min), rechte y-Achse: Dissipation (10^{-6}), linke y-Achse: Frequenz (Hz)

Tabelle 25: Kontrollmessung von NHS-Biotin mit Streptavidin AF488 an Gold

Ereignis	Frequenzänderung Δf_3 [$\pm 0,5$ Hz]	Dissipationsänderung $\Delta \gamma_3$ [$\pm 0,5$]	$\Delta \gamma_3 / \Delta f_3$ [1/Hz]	Massenzunahme m [$\pm 0,5$ ng/cm ²]
NHS-Biotin	3	1,0	0,33	53,1 = 0,53 nm
Streptavidin AF488	17	1,1	0,06	300,9 = 3 nm

4.3 IR-RAS-Messungen

Die auf Gold-bedampften Si-wafern hergestellten Adsorbatlagen (Umsetzungsschritte s. Abschnitt 3.5) wurden außerdem mittels IRRS-Spektroskopie untersucht.

In der Tabelle 26 sind für das IRRA-Spektrum der photolabilen Thiolverbindung theoretisch zu erwartenden Schwingungsmoden aufgeführt.

4.3.1 Zuordnung der Schwingungen von aktivierten Alkanthiol-Monofilmen auf Gold

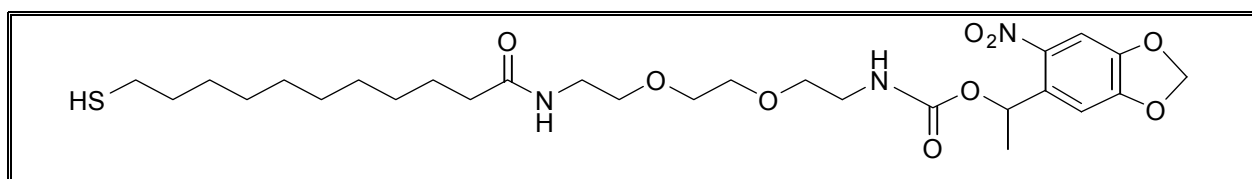
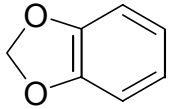


Abb. 29: Struktur der photolabilen Thiolverbindung (HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC)

Tab. 26 : Referenzwert [93, 43] für die HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC

funktionelle Gruppe	Schwingungsart	Referenz-Wellenzahl [cm ⁻¹]
N-H	ν_a (strong)	3300
N-H	ν_s (weak)	3100
=C-H	ν_a	3065
	ν_s	3035
	$\delta_a(\text{op})$	813
	$\delta_s(\text{op})$	762
C=C (Aromat)	$\nu_a(\text{ip})$	1482
	$\nu_s(\text{ip})$	1002
-CH₂-	ν_a	2925
	ν_s	2855
	δ_s	1463
-CH₃	$\nu_a(\text{op})$	2965

	ν_s $\delta_a(\text{op})$ $\delta_s(\text{op})$	2934 1465 1378
-C-H (aliphatic)	ν_s δ_s	2900 1350-1315
O=C-N-H (Amid I) O=C-N-H (Amid II) O=C-N-H	$\nu(\text{strong})$ ν $\nu(\text{weak})$	1680 1550 1250
-O-O=C-NH- HN-OC-O HN-OC-O-C	ν_s ν_a ν_a	1725 1260-1230 1060-1035
Aromat- NO₂	ν_a (strong) ν_s (weak)	1530-1500 1370-1330
-H₂C-O-CH₂- (aliphatische ether)	ν_a	1140-1085
-EG-CH₂-	ν_a ν_s δ_s	2955-2922 2878-2835 1475-1200
	ν (strong, arom. ether) ν (strong, aroma. ether) ν ν (strong)	1266-1227 1047-1025 1376-1350 938-919

ν_a = asymmetrische Schwingung; ν_s = symmetrische Schwingung;

δ_a = asymmetrische Deformationsschwingung; δ_s =symmetrische Deformationsschwingung;

op= out-of-plane; ip= in-plane

Die Abbildung 42 zeigt von der photolabilen Thiolverbindung aufgenommene IRRA-Spektren.

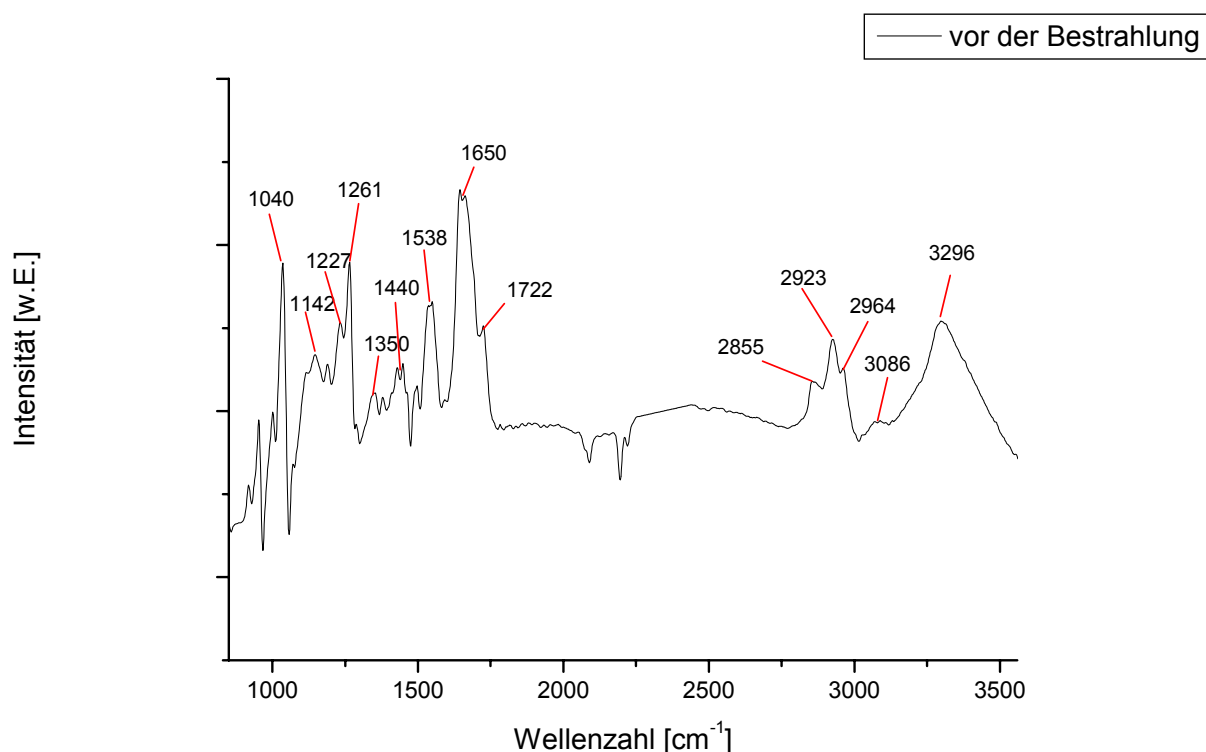


Abb. 42: IR-Spektrum von HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC (vor der Bestrahlung)

Bei 3296 cm⁻¹ und 3086 cm⁻¹ erscheint die asymmetrische und symmetrische-Bande der **N-H**Streckschwingung. Die Bande bei 3086 cm⁻¹ stellt zudem eine Überlagerung mit der **C-H**-Streckschwingung der Aromaten dar. Im Spektrum erscheint die asymmetrische **CH₃**-Streckschwingung bei 2964 cm⁻¹. Im Bereich des Spektrums 2923 cm⁻¹ überlagern sich die Banden der symmetrischen **CH₃**-Streckschwingung und der asymmetrischen **CH₂**-Streckschwingung. Bei 2855 cm⁻¹ erscheint die symmetrische **CH₂**-Streckschwingung.

Bei 1650 cm⁻¹ beobachtet man ein starkes Signal für die Carbonylgruppe in der Amid I-Verbindung (-**O=C-NH**-, -**O-O=C-NH**-). Das wenig intensive Amid II-Signal (**O=C-N-H**) erscheint bei 1538 cm⁻¹.

Für die Bande bei 1538 cm⁻¹ kommt es zudem zu einer Überlagerung mit der asymmetrischen **NO₂**-Streckschwingung der Aromaten. Die symmetrische Aromat-**NO₂**-Streckschwingung erscheint bei 1340 cm⁻¹.

Bei 1440 cm⁻¹ beobachtet man die Deformationsschwingung der symmetrischen EG-**CH₂**-Verbindung und der asymmetrischen -**CH₃**-Schwingung.

Das Signal der asymmetrischen $\text{-H}_2\text{C-O-CH}_2\text{-}$ (aliphatische Ether) kommt bei 1142 cm^{-1} . Für das Methylen-1,2-dioxybenzen erscheint ein starkes Signal für die aromatische Etherbande bei 1262 cm^{-1} für die -C-O-C- Streckschwingung und bei 1041 cm^{-1} für die $\text{-O-CH}_2\text{-}$ Streckschwingung.

Die Tabelle 27 führt die für theoretisch zu erwartenden Schwingungsmoden auf, die im IRRAS-Spektrum nach der Schutzgruppenabspaltung auftreten sollten. Die Abbildungen 43.1 und 43.2 zeigen die nach der Schutzgruppenabspaltung aufgenommenen FT-IR-Spektren.

4.3.2 Zuordnung der Schwingungen von aktivierten Alkanthiol-Monofilmen auf Gold

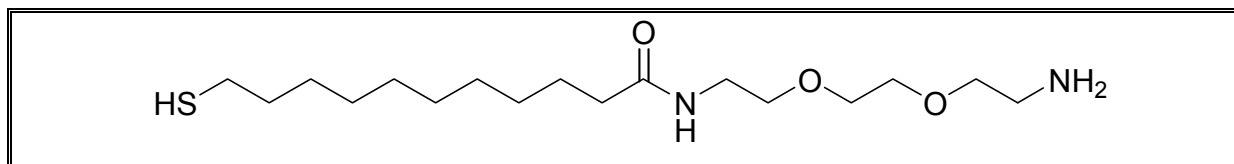


Abb. 30: Struktur der aminoterminierten Thiolverbindung (nach der Bestrahlung)

Tab. 27: Referenzwert [93, 43] für das aminoterminierte Thiol (nach der Bestrahlung)

funktionelle Gruppe	Schwingungsart	Referenz-Wellenzahl [cm^{-1}]
N-H	ν_a (strong)	3300
N-H	ν_s (weak)	3100
-CH₂-	ν_a	2925
	ν_s	2855
	δ_s	1463
O=C-N-H (Amid I)	ν (strong)	1680
O=C-N-H (Amid II)	ν	1550
O=C-N-H	ν (weak)	1250
-CH₂-NH₂	ν (strong)	1090-1068
- H₂C-O-CH₂-	ν	1140-1085
-EG-CH₂-	ν_a	2955-2922
	ν_s	2878-2835

	δ_s	1475-1200
--	------------	-----------

ν_a = asymmetrische Schwingung; ν_s = symmetrische Schwingung;

δ_a = asymmetrische Deformationsschwingung; δ_s =symmetrische Deformationsschwingung;

op= out-of-plane; ip= in-plane

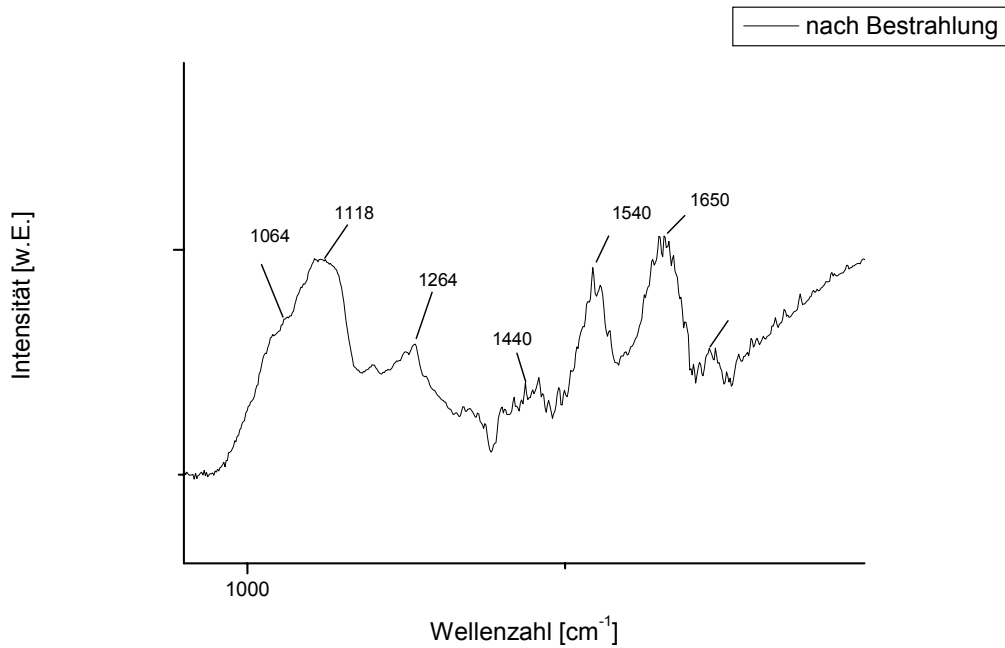


Abb. 43: IRRAS-Spektren nach der Bestrahlung der photolabilen Schutzgruppe

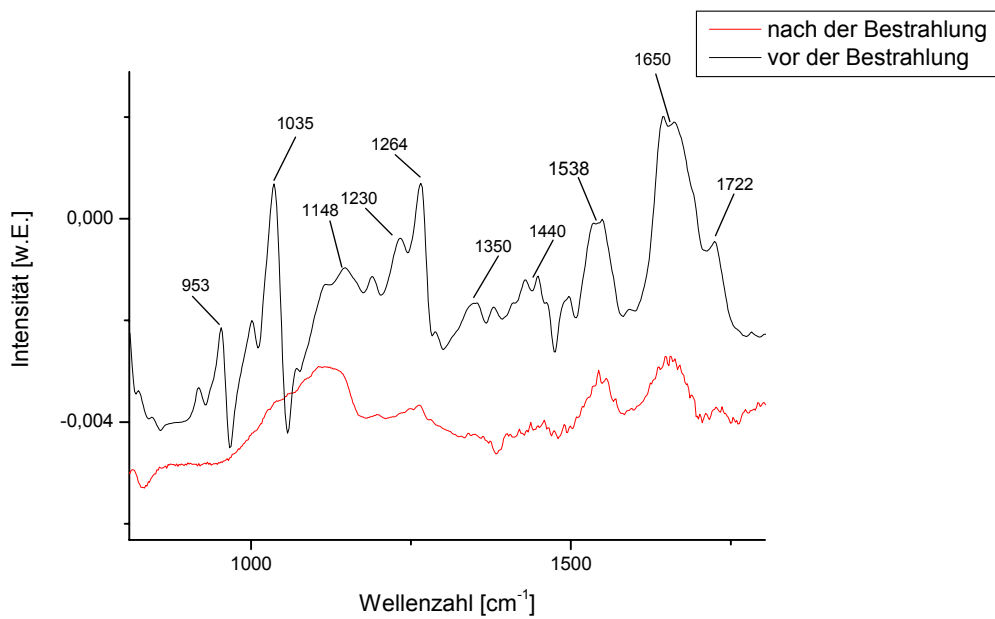


Abb. 43: Vergleich der IRRAS-Spektren vor (oben=schwarz) und nach (unten=rot) der Bestrahlung bei einem Wellenlängenbereich von 900-1800 [cm^{-1}]

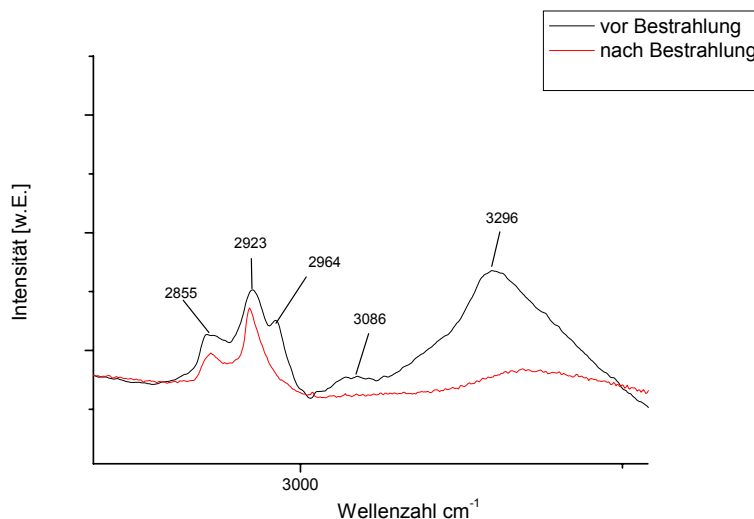


Abb. 44: Nach der Schutzgruppenabspaltung aufgenommene IRRAS-Spektren bei einer Wellenzahl von 2000 bis 3300 [cm⁻¹]

Nach der Bestrahlung der Probe mit UV-Licht kommt es zu einer auffälligen Veränderung in den IRRAS-Spektren.

Durch die Abspaltung der aromatischen Schutzgruppe kommt es bei 3086 cm⁻¹ und bei 2964 cm⁻¹ zum Verlust der **C-H**-Streckschwingung der Aromaten und der asymmetrischen **CH₃**-Streckschwingung.

Bei 1650 cm⁻¹ und bei 1538 cm⁻¹ kommt es durch den Verlust der (-O-**OC**-NH-, (-O-**OC**-NH-)-Gruppe zur Intensitätsabnahme für die Amid-I- und Amid-II-Verbindung. Wie zu erwarten, ist die MeNPOC-Schutzgruppeabspaltung mit dem Verlust der **NO₂**-Streckschwingung bei 1538 cm⁻¹ und 1340 cm⁻¹ verbunden. Ebenso treten im Spektrum nun auch nicht mehr die aromatische Etherbande (**O-CH₂-O**) bei 1264 cm⁻¹ und bei 1035 cm⁻¹ auf. Bei 1118 cm⁻¹ beobachtet man ein breites Signal für die H₂**C-O-CH₂**-Streckschwingung. Ebenso beobachtet man eine Überlagerung für die CH₂-**NH₂**-Streckschwingung bei 1064 cm⁻¹.

Anhand der beschriebenen Veränderungen in den IRRAS-Spektren kann daher auf eine quantitative MeNPOC-Schutzgruppenabspaltung geschlossen werden.

Die Tabelle 28 führt die nach der Biotin-Ankopplung im IRRAS-Spektrum theoretisch zu erwartenden Schwingungsmoden auf.

4.3.3 Zuordnung der Schwingungen nach der Ankopplung von NHS-Biotin an Gold

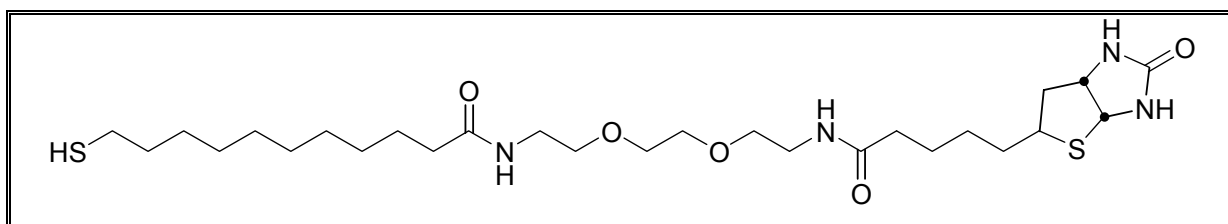


Abb.31: Ankopplung von Biotin an eine aminoterminierte Thiolverbindung

Tab. 28: Referenzwert [93, 43] für die Ankopplung von Biotin und Streptavidin

funktionelle Gruppe	Schwingungsart	Referenz-Wellenzahl [cm ⁻¹]
N-H	ν_a (strong)	3300
N-H	ν_s (weak)	3100
-CH₂-	ν_a	2925
	ν_s	2855
	δ_s	1463
O=C-N-H (Amid I)	ν (strong)	1680
O=C-N-H (Amid II)	ν	1550
O=C-N-H	ν (weak)	1250
-H₂C-O-CH₂-	ν	1140-1085
-EG-CH₂-	ν_a	2955-2922
	ν_s	2878-2835
	δ_s	1475-1200
-HN-CO-NH- (Amid I)	ν (strong)	1625 (C=O)
	ν (weak)	1585, 1535 (CNH)
- H₂C-S-CH₂-	ν_a	2948-2922
	ν_s	2878-2846

	δ_s	1435-1410
	$\nu(\text{strong})$	1270-1220

ν_a = asymmetrische Schwingung; ν_s = symmetrische Schwingung;

δ_a = asymmetrische Deformationsschwingung; δ_s =symmetrische Deformationsschwingung;

op= out-of-plane; ip= in-plane

Die Abbildung 45 zeigt die nach der Biotin-Ankopplung aufgenommenen IRRAS-Spektren.

Im Bereich von 3341 cm^{-1} und 3070 cm^{-1} erscheinen die asymmetrische und symmetrische **N-H**-Streckschwingungen. Im Spektrum beobachtet man für die asymmetrischen Streckschwingungen der **-CH₂-S-CH₂-** und **-EG-CH₂-**Gruppen eine Überlagerung bei 2940 cm^{-1} . Die symmetrischen Streckschwingungen für diese Gruppe (**-CH₂-S-CH₂-** und **-EG-CH₂-**) erscheint das Signal bei 2857 cm^{-1} .

Bei 1667 cm^{-1} beobachtet man ein starkes Signal für die Carbonylgruppe in der Amid I-Verbindung (**-O=C-NH-**, **HN-OC-NH-**). Das wenig intensive Amid II-Signal (**O=C-N-H**) erscheint bei 1550 cm^{-1} .

Die Deformationsschwingungen der **EG-CH₂-** und **CH₂-S-CH₂-**Gruppen kommen im Spektrum bei 1430 cm^{-1} . Der Fingerprint-Bereich ist durch die starke und schmale Resonanz der **S-CH₂-**Waggingschwingung und der **CO-NH**-Deformationsschwingungen bei 1261 cm^{-1} gekennzeichnet. Ebenso findet man ein starkes Signal für die **-H₂C-O-CH₂-**Streckschwingung bei 1108 cm^{-1} .

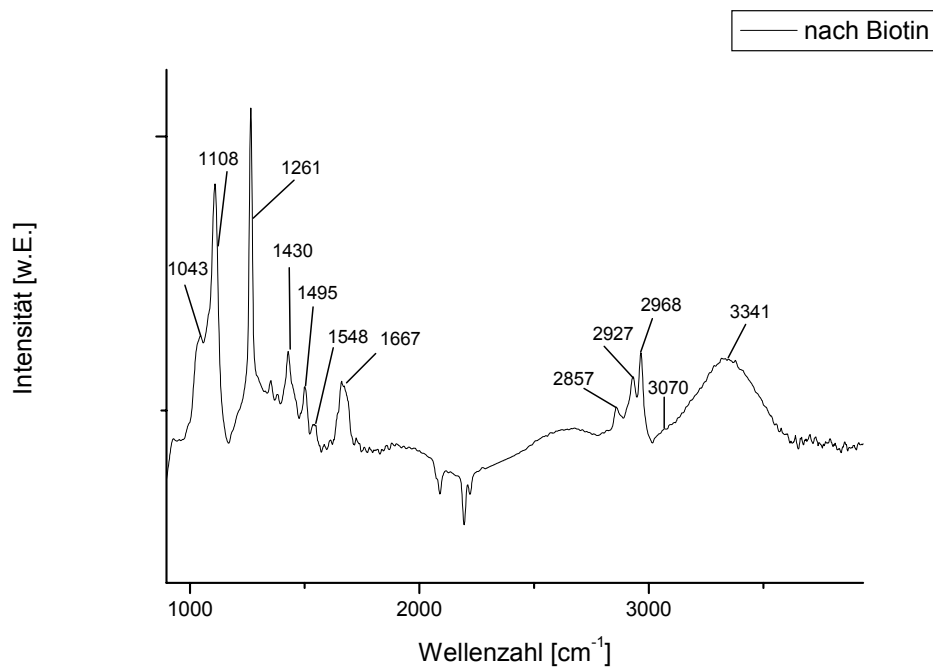


Abb. 45: IR-Spektrum von Biotin-Ankopplung an die aminoterminierte Thiolverbindung

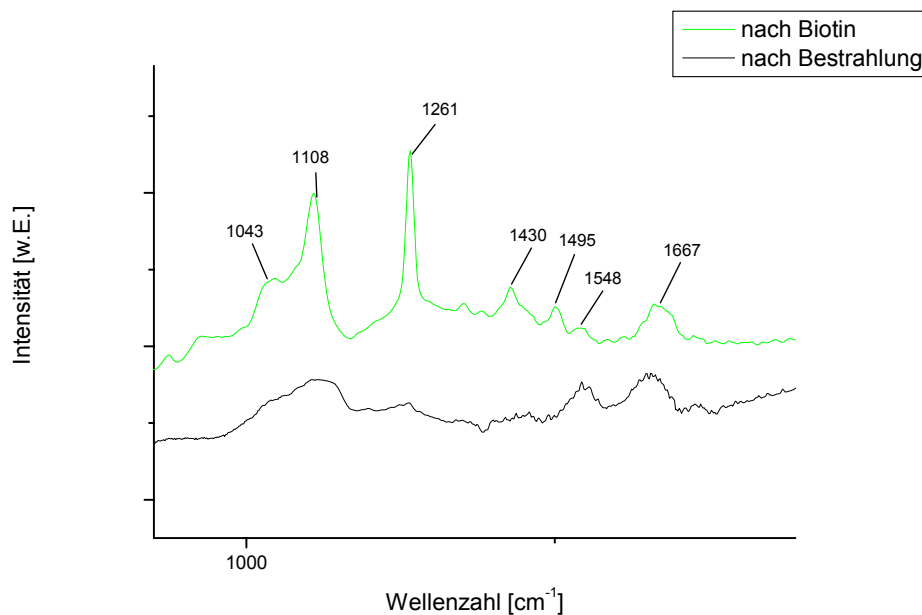


Abb. 46: Vergleich der IR-Spektren vor (unten) und nach (oben) der Biotin-Ankopplung

An die biotinfunktionalisierte Oberfläche wird nun das Streptavidin angebunden.

Die Abbildung 47 zeigt eine deutlich Änderung in dem charakteristischen Peptidbindungsbereich.

Nach der Anbindung des Proteins Streptavidin treten im Spektrum wie zu erwarten bei 1662 cm⁻¹ und 1550 cm⁻¹, die Amid-I- und der Amid-II-Banden auf. Dies ist auf

das C=O-Streckschwingung der Peptidbindung zurückzuführen. Im Spektrum kommt es zu einem deutlichen Intensitätsanstieg, der auf eine effektive Anbindung des Proteins hindeutet.

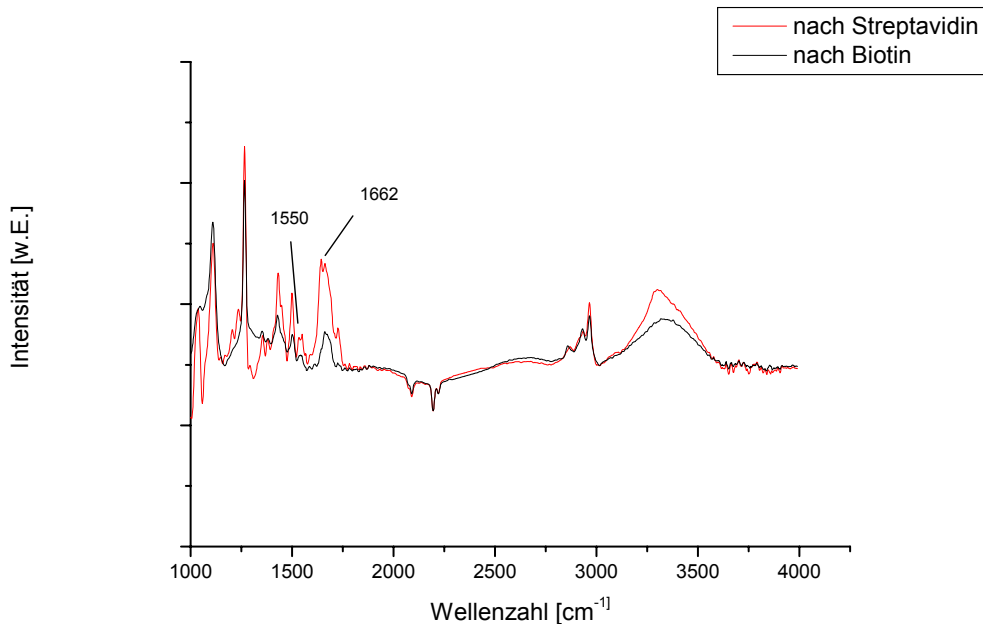


Abb.47: Vergleich der IRRAS-Spektren nach der Anbindung der Proteine (Bild rot) und der aminoterminierten Oberfläche (Bild schwarz).

4.4 UV-Vis-Spektren:

Von der photolabilen Thiolverbindung in Ethanol wurde das UV-Vis-Spektrum aufgenommen. Die Bestrahlung erfolgte in einem UV-Reaktor. Als Lichtquelle kam 8 UV-Röhre 4190 Å (8V) von der Firma Southern New England, Brandford, USA zum Einsatz.

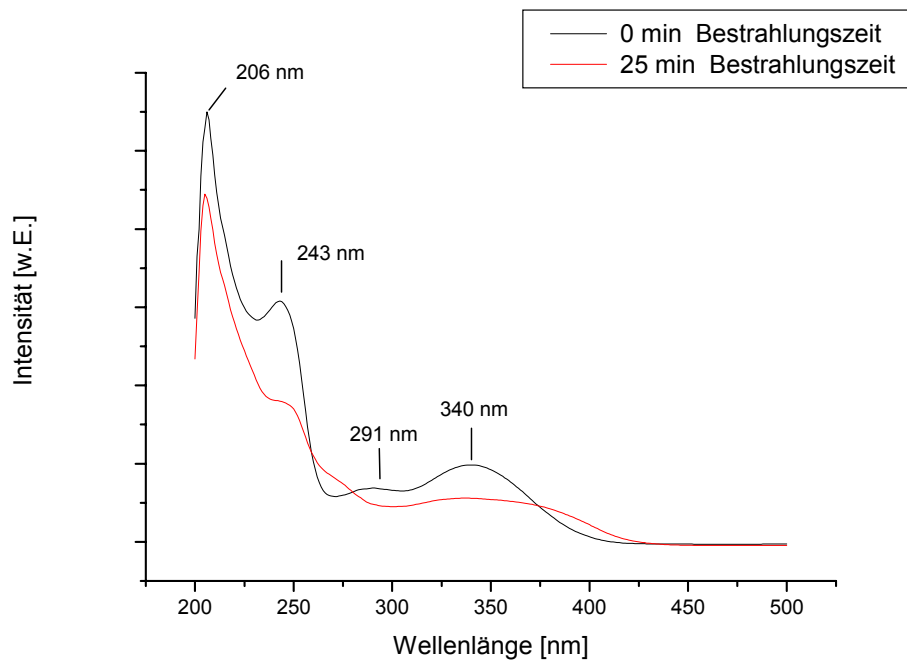


Abb. 48: UV-Vis-Spektren vor (schwarz) und nach (rot) der Bestrahlung des HS-(CH₂)₁₁-EG₂-NPOC-Verbindung

Dabei zeigt das Methylen-1,2-dioxybenzen (-O-CH₂-O-) ein Absorptionsmaximum bei 340 nm. Für die Nitro-Gruppe der Aromaten beobachtet man einen Schulter bei 291 nm. Die Aromaten-Ringe zeigen eine Absorptionmaxima bei 243 nm (langwelliger verbotener Übergang) und 206 nm (langwelliger intensiver Übergang) [94, 95, 96, 97, 98].

Nach der Bestrahlung nimmt das Absorptionsmaximum der Methylen-1,2-dioxybenzen bei 340 nm und der Nitrogruppe bei 291 nm ab; dies weist auf den Abgang der Schutzgruppe hin.

4.5 Fluoreszenzmikroskopie:

Die Abbildung 49 und 50 zeigt das Fluoreszenzbild der mikrostrukturierten Nanodots-Glasoberfläche.

Zur Bestrahlung der Glasoberfläche kam folgende Lochmaske zum Einsatz:

- Lochdurchmesser 1 mm²; Lochabstand 1 mm

Nach der Bestrahlung wurde die aminoterminierte Oberfläche mit NHS-Biotin und Streptavidin AlexaFluor 488 gebunden.

Eine Aufnahme der Fluoreszenzbilder auf den homogenen Goldwafern war aufgrund des Quenching-Effekts nicht möglich.

Die aufgenommenen Fluoreszenzbilder auf der Glasoberfläche zeigen die Geometrie und Ausmaße der erzeugten Strukturen in einer guten Übereinstimmung mit der der verwendeten Lochmaske. In Abbildung 49 kann man deutlich den Lochdurchmesser von 1 mm^2 und in Abbildung 50 den Loch-zu-Loch Abstand von 1 mm erkennen. Auf den Bildern sind unspezifische Bindungen zu erkennen. Trotz der Passivierung mit PEG-2000 konnte dies nicht unterdrückt werden.

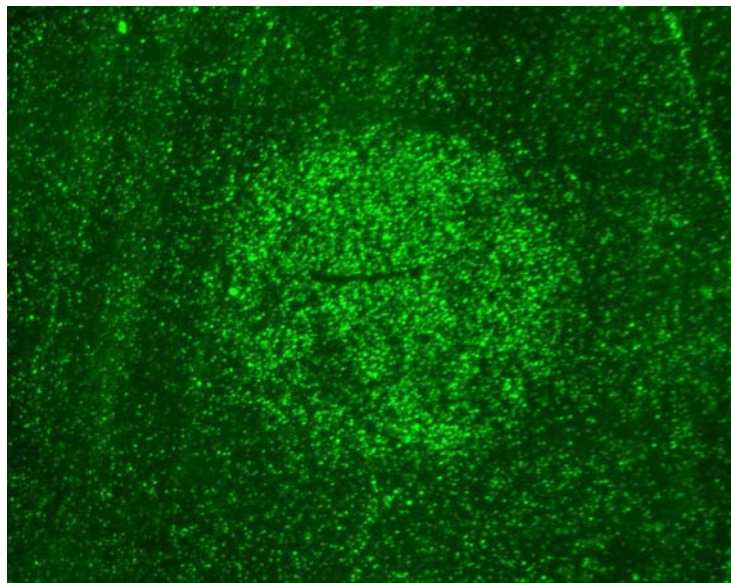


Abb. 49: Überstrukturierung der Glasnanodots-Oberfläche (heller Kreis) mit einem Kreisdurchmesser von 1 mm^2 nach der Behandlung mit Streptavidin Alexa Fluor 488

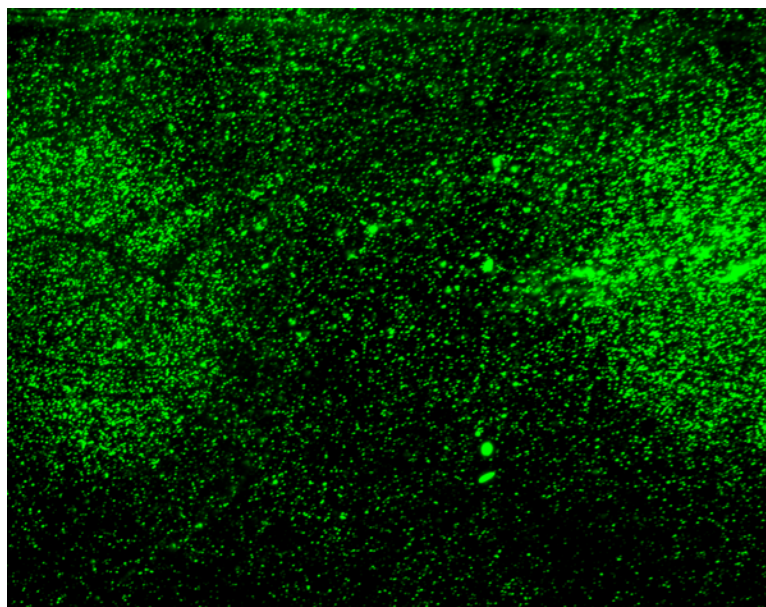


Abb.50: Überstrukturierung der Glasnanodot-Oberfläche mit einem Loch-zu-Loch-Abstand von 1 mm

4.6 Kontaktwinkelmessung

Vor und nach der Schutzgruppenabspaltung fanden außerdem Kontaktwinkelmessung auf Goldwafer statt: Als Lösungsmittel wurde Wasser verwendet und der fortschreitende Wasser-Kontaktwinkel auf den frisch präparierten Monolagen bestimmt. In der Tabelle 29 sind die gemessenen Kontaktwinkel der verschiedenen Präparationsstufen aufgeführt.

Tab. 29: Kontaktwinkelmessung der verschiedenen Präparationsstufen

Verbindung	gemessene Kontaktwinkel ($\pm 1^\circ$)
Reine Goldoberfläche	45°
Alkanthiol mit Schutzgruppe	61°
aminoterminierte Oberfläche (bestrahlt)	55°
Angekoppelt mit Biotin	58°
Angekoppelt mit Streptavidin AF 488	35°

Für die photolabile Thiolverbindung wurde ein Kontaktwinkel von 61° gemessen. Nach der Abspaltung der Schutzgruppe besitzt die aminoterminierte Oberfläche hydrophile Eigenschaften. Dabei nimmt der Kontaktwinkel auf 55° ab. Nach der kovalenten Biotin-Ankopplung kommt es zur Zunahme des Winkels auf 58°, die auf eine hydrophobe Oberflächeneigenschaft hinweist.

Nach der Streptavidin-Ankopplung zeigt die Oberfläche wieder sehr hydrophile Eigenschaften, da im Protein viele polare Amidbindungen vorhanden sind. Dabei nimmt der Kontaktwinkel wieder ab und beträgt nur 35°.

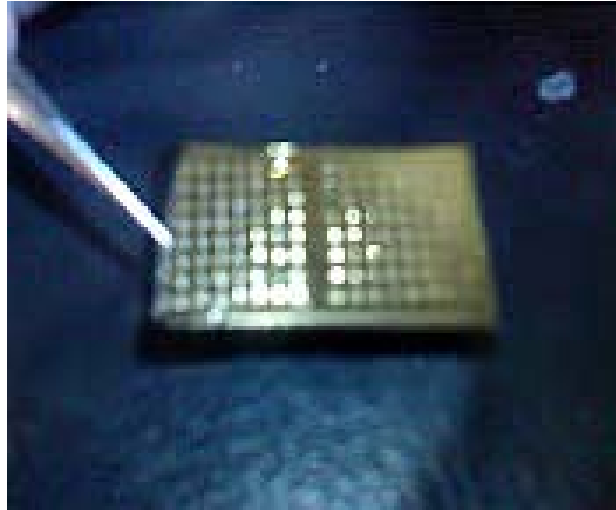


Abb. 51: Wasserperlen, die die Struktur der ursprünglich zur Bestrahlung eingesetzten Lochmaske wiedergibt. Das Wasser benetzt an den Flächen, welche durch Licht initiierte Amino-Gruppen aufweisen.

Die Abspaltung der MeNPOC-Schutzgruppe führt zu einer hydrophile aminotermi- nierten Oberfläche. Wird die Bestrahlung über die bereits beschriebenen Photomas- kendurchgeführt und die Oberflächen anschließend mit Wasser benetzt, so haften die Wassertropfen nur an den zuvor bestrahlten Stellen (s. Abbildung 51). Auf diese Weise erhält man ein strukturiertes Adsorptionsmuster, welches ein Abbild der Pho- tomasken darstellt. Auch dieser Effekt weist sowohl die Schutzgruppen-Abspaltung nach als auch eine erfolgreich durchgeführte photochemische Strukturierung.

4.7 REM-Aufnahmen

Von den verschiedenen Substratoberflächen (homogene Goldwafer und Goldnano- dots-Glasoberfläche) wurden nach der Anbindung von Streptavidin AlexaFluor 488 REM-Bilder aufgenommen, die in den folgenden Abbildungen dargestellt sind. Der schwarze Kreis inmitten der Bilder ist auf einen Artefakt der bildlichen Darstellung zurückzuführen.

Für die Strukturierung wurde eine Lochmaske mit folgendem Strukturierungsmuster eingesetzt:

- Lochdurchmesser 1 mm²; Lochabstand 1mm

Die Abbildungen 52 und 53 zeigen die von den photochemisch strukturierten Gold-Nanodot-Oberflächen aufgenommenen REM-Bilder; in den Abbildungen 54 und 55 ist die analoge Struktur auf homogenen Goldoberflächen dargestellt.

Auf beiden Substratoberflächen weisen die aufgenommenen Bilder einen Kreisdurchmesser von ungefähr $1000 \mu\text{m}^2 = 1\text{mm}^2$ und einen Loch-zu-Loch-Abstand von etwa $1000 \mu\text{m} = 1\text{mm}$ auf. Diese Strukturen sind mit der verwendeten Lochmaske identisch.

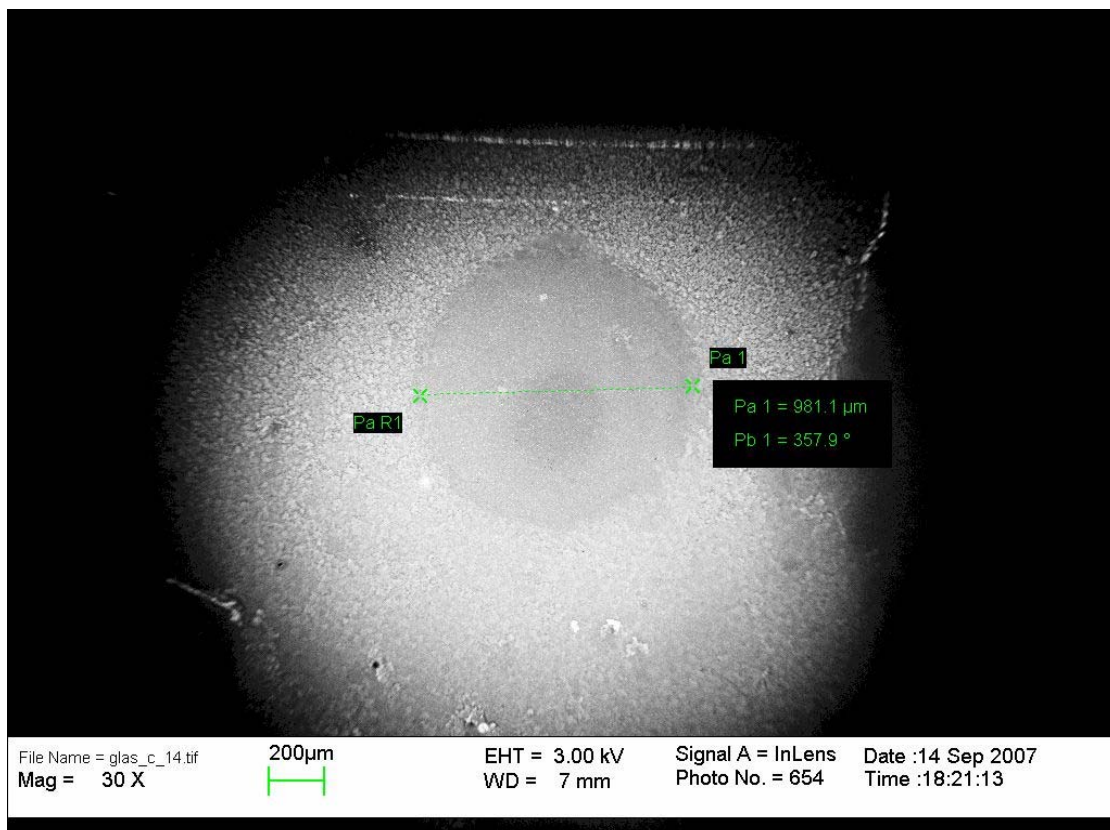


Abb. 52: Überstrukturierung der Goldnanodots-Oberfläche: Die Ausmaße der photochemisch erzeugten Strukturen (großer Kreis) betragen nach der Protein-Ankopplung von ca. $980 \mu\text{m}^2$.

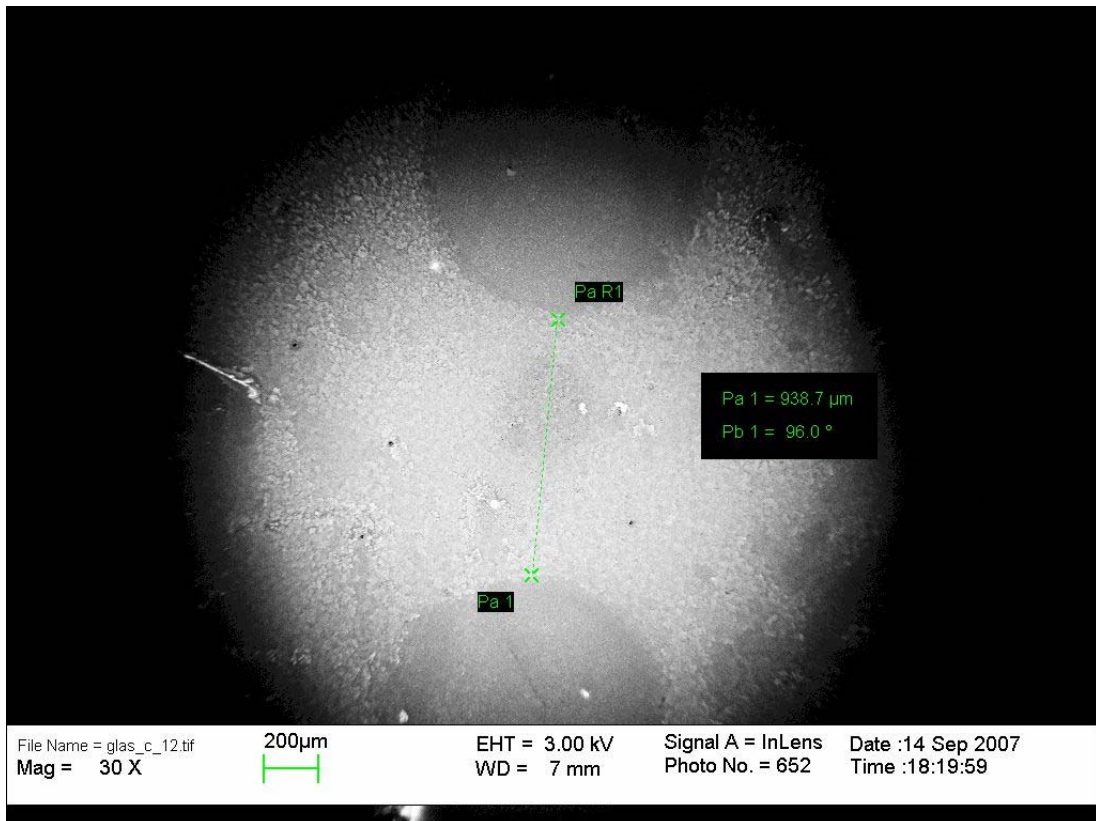


Abb. 53: Photochemische Überstrukturierung der Goldnanodots-Oberfläche: Nach der Protein-Ankopplung weisen die kreisförmigen Strukturen einen Abstand von ca. 938 μm auf.

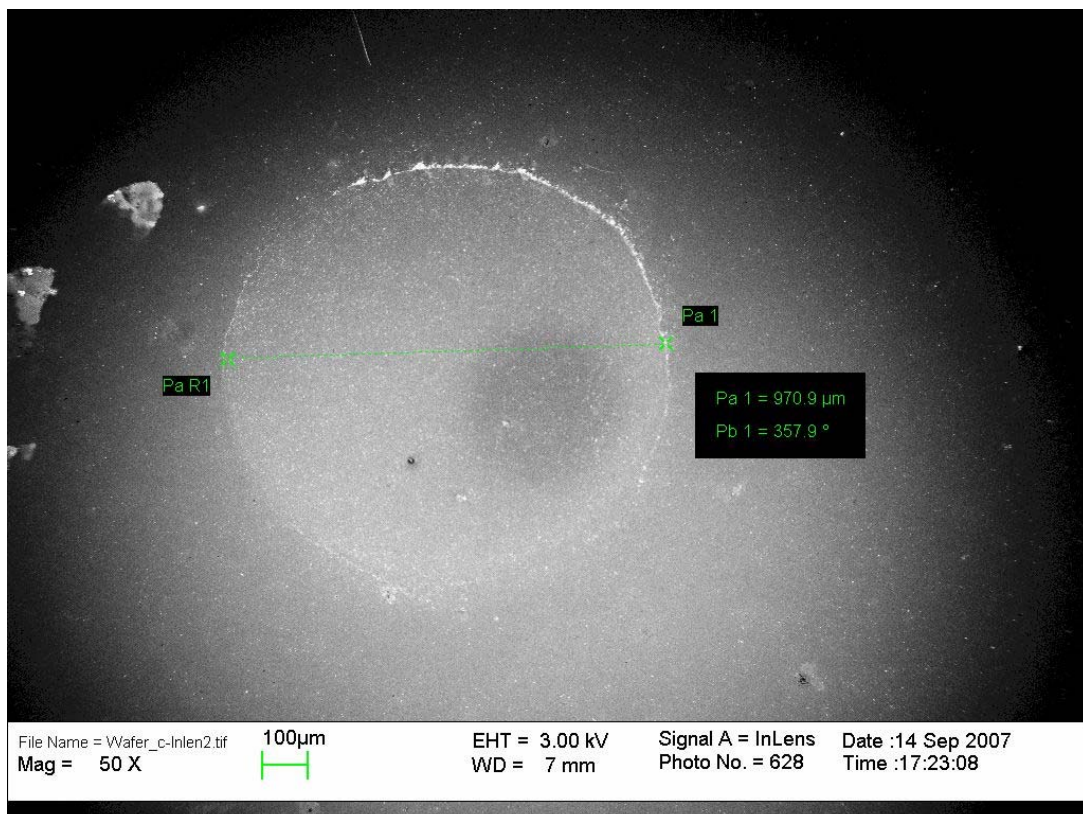


Abb. 54: Photochemisch strukturierte Goldwafer: Nach der Protein-Ankopplung weisen die erzeugten Strukturen einen Kreisdurchmesser von ca. 970 μm^2 auf.

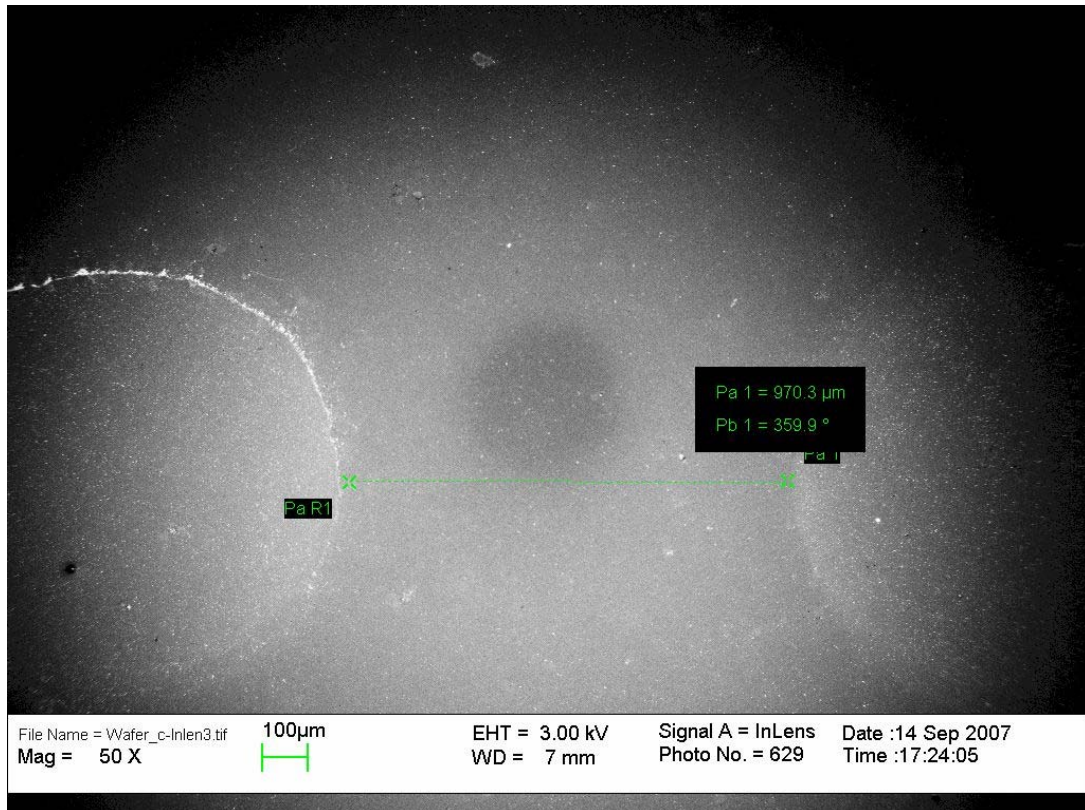


Abb. 55: Photochemisch strukturierte Goldwafer: Nach der Protein-Ankopplung weisen die kreisförmigen Strukturen einen Abstand von ca. 970 μm auf.

5 Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Überstrukturierung Gold-Nanodot-funktionalisierter Oberflächen entwickelt. Letztere wurden nach der bereits etablierten Methode der mizellaren Nanolithographie hergestellt, bei der Gold-beladene Mizellen auf einem festen Träger selbstordnend abgeschieden werden. Nach einer anschließenden reduktiven Behandlung kommt es so zu einer regulär-hexagonalen Anordnung von Gold-Punkten auf der Oberfläche. Diese weisen einen Durchmesser von etwa 5 nm und einen Abstand von etwa 58 nm zueinander auf. Wie bereits gezeigt wurden, können einzelne Zellen an diesen Gold-Dots durch eine geeignete Kopplungschemie kovalent fixiert werden. Auf diese Weise ist es möglich abstandsabhängige Zell-Zell-Wechselwirkungen studieren zu können.

Der entwickelte Ansatz zur Überstrukturierung dieser Oberflächen bedient sich nun einer Adsorption photoreaktiver Thiolverbindungen, die unter Ausbildung einer kovalenten Gold-Schwefelbindung auf den Gold-Punkten adsorbieren. Die hierbei eingesetzte Thiolverbindung wurde eigens synthetisiert – sie zeichnet sich durch eine Amino-Endgruppe aus, welche durch die photolabile MeNPOC-Schutzgruppe geschützt ist. Zur Überstrukturierung wurden nach einer Adsorption dieser Verbindung Photomasken auf den Oberflächen aufgelegt; dies führt dazu, dass das Muster der Photomasken in eine analoge aminoterminierte Oberflächenstruktur umgesetzt wird. Die freigelegten Aminofunktionalitäten können anschließend für weitere Kopplungsreaktionen eingesetzt werden. Auf diese Weise können z.B. Biomoleküle, wie Proteine oder ganz Zellen in Form der photochemisch erzeugten Aminostruktur an die Träger gebunden werden. Werden Zellen eingesetzt, befinden sich diese zudem in einem Kontakt, der durch die Abstände der benachbarten Nanodots bestimmt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde als biologisches Modellsystem jedoch eine Funktionalisierung mit Proteinen vorgenommen: nach einer kovalenten Biotin-Anbindung wurde mit Streptavidin umgesetzt. Dieses Protein besitzt insgesamt 4 Bindungsstellen, an welchen das Biotin-Molekül spezifisch binden kann.

Die beschriebenen Umsetzungsschritte konnten mittels verschiedener oberflächenanalytischer Verfahren, wie der XP- und FT-IRRA-Spektroskopie sowie anhand von QCMD-Messungen nachgewiesen. Mittels bildgebender Methoden, wie der Fluoreszenz- und Rasterelektronen-Mikroskopie konnten ebenso auch die photochemisch generierten Strukturen visualisiert werden.

Ausblick

Einsatzmöglichkeiten einer solchen Überstrukturierungsmethode liegen z.B. in dem Gebiet der Zellbiologie. So können, wie bereits gezeigt wurde [15], die Gold-Nanopartikel zu einer kovalenten Immobilisierung einzelner Zellen genutzt werden; die quasi-hexagonale Ordnung der Nanopartikel ermöglicht weiterhin ein gezieltes Studium Zell-Zell-kontaktärer Wechselwirkungsprozesse [15, 14]. Mittels der in dieser Arbeit entwickelten Überstrukturierungs-Methode sollte es nun zusätzlich möglich sein, unterschiedliche Zelltypen in voneinander abgegrenzten Verbänden zu immobilisieren. Dies wäre ein erster Schritt zur künstlichen Abbildung eines komplexeren Organismus, in dem sich unterschiedliche Zelltypen in Kontakt miteinander befinden und gegenseitig beeinflussen. In einer geeigneten

6 Literaturliste

1. T. Ito, S. Okazaki, *Nature*, 2000, 406, 1027.
2. F. Cerrina, C. Marrian, *Mater. Res. Soc. Bull.*, **1996**, 56.
3. Götzhäuser, A.; Eck, W.; Geyer, W.; Stadler, V.; Weimann, T.; Hinze, P.; Grunze, M.: Chemical Nanolithography with Electron Beams; *Adv. Mater.* 2001, 13, 806-809.
4. G. M. Wallraff, W. D. Hinsberg, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 1801.
5. Spatz, J. P.: Nano- and micropatterning by organic-inorganic templating of hierarchical self-assembled structures; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002, 41, 3359-3362.
6. Xia, Y.; Rogers, J. A.; Paul, K. E.; Whitesides, G. M.: Unconventional Methods for Fabricating and Patterning Nanostructures; *Chem Rev* 1999, 99, 1823-1848.
7. R.D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S.H. Hong, C.A. Merkin, *Science*, **1999**, 283, 661
8. George M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, D. E. Ingber: Soft Lithography in Biology and Biochemistry; *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2001, 3, 335-373
9. R. Glass, M. Arnold, J. Bluemmel, A. Kueller, M. Moeller, J. P. Spatz, *Adv. Fun.Mater.*, **2003**, 13 (7), 569-575.
10. Moeller, M.; Spatz, J. P.; Roescher, A.; Moessmer, S.; Selvan, S. T.; Klok, H. A.: Mineralization of gold in block copolymer micelles; *Macr. Symp.* 1997, 117, 207-218.
11. Spatz, J. P.; Roescher, A.; Sheiko, S.; Krausch, G.; Moeller, M.: Noble metal loaded block ionomers. Micelle organization, adsorption of free chains, and formation of thin films; *Adv. Mater.* 1995, 7, 731-735.
12. R. Glass, M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, J. Blümmel, C. Haferkemper, C. Dodd, J. P. Spatz *New Journal of Physics*, 2004, 6
13. Israelachvili, J. *Intermolecular & Surface Forces* (2nd Ed.). *Academic Press London*. **1992**.

14. Marco Arnold, Molecularly defined nanostructured interfaces as tools for the regulation and measurement of functional length scales in cell adhesion mediating protein clusters, *Dissertation*, **2005**.
15. Arnold, M.; Cavalcanti-Adam, E. A.; Glass, R.; Blümmel, J.; Eck, W.; Kantlehner, M.; Kessler, H.; Spatz, J. P.: Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces; *Chemphyschem* 2004, 5, 383-388.
16. Glass, R.; Moeller, M.; Spatz, J. P.: Block copolymer micelle nanolithography; *Nanotechnology* 2003, 14, 1153-1160.
17. Spatz, J. P.; Roescher, A.; Moeller, M.: Gold nanoparticles in micellar poly(styrene)-b-poly(ethylene oxide) films. Size and interparticle distance control in monoparticulate films; *Polymer Preprints* 1996, 37, 409-410.
18. G.T. Hermanson, „Bioconjugate techniques, Academic Press, San Diego/Cal.1996
19. Kumar. R. Bhusham, *Org. Biomol.Chem.*, 2006, **4**, 1857-1859
20. Daniela Dankbar, *Dissertation*, Universität Tübingen, 2005
21. M.Whitesides et. al., *Langmuir* (2004), 20, 9080-9088
22. H. G. O. Becker, "Einführung in die Photochemie", Deutscher Verlag 1975, Berlin
23. A. Blanc, C. G. Bochert, *J.Org.Chem.* 2002, **67**, 5567-5577
24. J. H. Scofield, *J. Elec. Spec. Rel. Phen.*, **1976**, 8, 129
25. H. Hertz, *Wiedemann´sche Ann. Phys.* 31 (1887) 982
26. G.M. Ertl, J. Küppers, *Low energy electrons and surface chemistry*, Weinheim, Deerfield Beach, VCH-Verlag (1985)
27. T.L. Barr, *Modern ESCA, The Principles and Practice of X-RayPhotoelectron Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton (1995)
28. Gerd Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, VCH Weinheim (1987)
29. P.W. Atkins, *Quanten*, VCH Weinheim (1993)
30. P. Jablonski, *Surf. Interf. Anal.*, 20 (1993) 771

31. K. Siegbahn, Photoelectron Spectroscopy: Retrospects and Prospects, London, R. Soc., (1985)
32. J.H. Scofield, J. Elec. Spec. Rel. Phen., 8 (1976) 129
33. S. Tanuma, C.J. Powell, Surface and Interface Analysis, 17 (1991) 911
34. Thomas Felgenhauer, Diplomarbeit, Universität Heidelberg (1997)
35. P.E. Laibinis, C.D. Bain, G.M. Whitesides, J. Phys. Chem., 95 (1991) 7017
36. Petra Bücken, Dissertation, Universität Heidelberg (2007)
37. Karl Cammann, Instrumentelle Analytische Chemie, Heidelberg, Berlin, Spektrum, 2001
38. <http://www.pci.uni-heidelberg.de/pci/fpraktikum/WS06/Mikroskopie.pdf>
39. <http://www.zeiss.de/> Mikroskopie
40. <http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/conepil.htm>
41. <http://www.pci.uni-heidelberg.de/pci/fpraktikum/WS06/QCM-D.pdf>
42. Fredrik Höök, Development of a novel QCM technique for Protein adsorption studies, Universität, Göteborg, Schweden, 2001
43. M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1995)
44. Jörg Fick, Dissertation, Universität Heidelberg (2005)
45. <http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Kontaktwinkel.png>
46. Zisman, W. A. *Adv. Chem. Ser.* **1964**, 43, 1
47. R. G. Good; L. A. Girifalco; *J. Phys. Chem.* **1960**, 64, 561
48. A. Ulman, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 1533-1554
49. L. H. Dubois, R. G. Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **1992**, 43, 437
50. C. D. Bain, E. B. Troughton, Y.-T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 321-335
51. L. H. Dubois, B. R. Zegarski, R. G. Nuzzo, *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 678
52. P. Fenter, A. Eberhardt, P. Eisenberger, *Science*, **1994**, 266, 1216-1218

53. N. Camillone, C. E. D. Chidsey, G. Y. Liu, G. Scoles, *J. Chem. Phys.*, **1993**, 98, 3503-3511
54. S. M. Stole, M. D. Porter, *Langmuir*, **1990**, 6, 1199-1202
55. Y. T. Kim, A. J. Bard, *Langmuir*, **1992**, 8, 1096
56. C. D. Bain, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1995**, 91, 1281-1296
57. G. Hähner, M. Kinzler, C. Thümmeler, Ch. Wöll, M. Grunze, *J. Vac. Sci. Technol.*, **1992**, 10, 2758-2769
58. Thomas Felgenhauer, Dissertation, Universität Heidelberg (2002)
59. Y. Long, S. Herrwerth, W. Eck, M. Grunze, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 4 (2002) 522
60. K.L. Prime, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 10714
61. L.H. Dubois, R.G. Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 43 (1992) 437
62. C.D. Bain, E.B. Troughton, Y.T. Yao, J. Evall, G.M. Whitesides, R.G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 321
63. R.G. Nuzzo, L.H. Dubois, D.L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 558
64. L.H. Dubois, B.R. Zegarski, R.G. Nuzzo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 (1997) 4739
65. L.H. Dubois, B.R. Zegarski, R.G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 570
66. L.H. Dubois, R.G. Nuzzo, *Ann. Phys. Lett.* 43 (1993) 437
67. Ulman, *An introduction of ultra-thin organic films: Langmuir-Blodgett to Self Assembly*, Academic press, New York (1991)
68. Y. Xia, G.M. Whitesides, *Angewandte Chemie*, 110 (1998) 568
69. 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
70. M. Jaschke, H. Schönherr, H. Wolf, H.J. Butt, E. Bamberg, *J. Phys. Chem.*, 100 (1996), 2290
71. G.Y. Liu, M.B. Salmeron, *Langmuir* 10 (1994) 367
72. C.D.E. Chidsey, D. N. Loiacono, *Langmuir* 6 (1990) 682

73. Haitao Rong, Dissertation, Universität Heidelberg (2001)
74. H. Hertz, *Wiedemann'sche Ann. Phys.* 31 (1887) 982
75. P. W. Atkins, *Quanten*, S. 243, Weinheim, VCH, **1993**
76. P. Jablonski, *Surf. Interf. Anal.*, **1993**, 20, 771
77. K. Siegbahn, *Photoelectron Spectroscopy: Retrospects and Prospects*, London, R. Soc., **1985**
78. Vallant, T.; Brunner, H.; Mayer, U.; Hoffmann, H.; Leitner, T.; Resch, R.; Friedbacher, G. *J Phys. Chem. B* **1998**, 102, 7190
79. Kang, J. F.; Ulman, A.; Liao, S.; Jordan, R.; Yab'ng, G.; Liu, G. *Langmuir* **2001**, 17, 95
80. Svetlana Stoycheva, Dissertation, Universität Heidelberg (2006)
81. Declan Ryan, Babak Amir Parviz, Vincent Linder, Vincent Semetey, Samuel K. sia, Jing Su, Milan Mrkisch, George M. Whitesides, *Langmuir*, 2004, 20, 9080-9088
82. G. H. McGall et. al., *J. Am. Chem. Soc.*, (1997), Vol.119, No. 22, 5083-5090
83. C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Phys. Chem.* (1989), 93, 1670-1673
84. P.E. Laibinis, C. D. Bain, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* (1989), 111, 7155
85. Colin D.Bain, George M. Whitesides, *J.Am.Chem.Soc.* (1989), 111, 7155-7164
86. Colin D.Bain, George M. Whitesides, *J.Am.Chem.Soc.* (1989), 111, 7164-7175
87. Dora M.Schnur, Young H. Yuh, David R. Dalton, *J.Org.Chem.*(1989), 54, 3779-3785
88. Spinke et. al.: *J.Chem.Phys.*(1993), 99, 7012-7019
89. L. Häußling, B. Michel, H. Ringsdorf, H. Rohre.: *Angew. Chem.* (1991), 103, 568-572
90. R. Blankenburg, P. Meller, H. Ringsdorf, C. Salesse, *Biochemistry* (1989), 28, 8214-8221

91. G.Beamson, D.Briggs; High Resolution XPS of Organic Polymers, The Scienta ESCA 300 Database, John Wiley & Sons, New York (1992)
92. C.M. Pradier, C. Rubio, C. Poleunis, P. Bertrand, P. Marcus, C. Compere, J. Phys. Chem B. (2005), 9540
93. Colthup, Daly, Wiberley; Introduction to infrared and raman Spectroscopy, Academic Press, NC (1990)
94. Aránzazu del Campo, Diana Boos, Hans Wolfgang Spiess, Ulrich Jonas; Angew.Chem.Int.Ed., (2005), 44, 4707-4712
95. Aurélien Blanc, Christian Bochet; J. Org. Chem., (2002), 67, 5567-5577
96. D. Berroy, M. L. Viriot, M. C. Carré, Sensors and Actuators B 74, (2001), 186-189
97. C.G.Bochet; Tetrahedron Letters, (2000), 41, 6341-6346
98. R.G.Nuzzo, D.L. Allara, J. Am. Chem.Soc., (1983), 105, 4481-4483
99. L. Reimer, G. Pfefferkorn, Rasterelektronemikroskopie, Springer, Berlin, **1977**.
100. Pierce, Handbook and Catalog (1994)
101. Pierce, Introductions: ImmunoPure-Streptavidin Fluorescein Conjugated
102. Alexander Küller, Dissertation, Universität Heidelberg, 2006

6 Danksagung

Zuallerst möchte ich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Joachim P. Spatz für die freundliche Unterstützung, die interessante Aufgabenstellung sowie die damit verbundene Möglichkeit am Max-Planck-Institut für Matellforschung (Stuttgart) und am Biophysikalischen Institute der Universität Heidelberg arbeiten zu dürfen ganz herzlich danken. Ebenso bedanke ich mich bei ihm für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Er hat mir bei der Bearbeitung stets freie Hand gelassen, wodurch ein selbstständiges Arbeiten unter Verwirklichung vieler eigener Ideen ermöglicht wurde. Durch lehrreiche Diskussionen und seine Anregungen ergaben sich entscheidende Impulse für meine Arbeit.

Weiterhin möchte ich Herrn PD. Dr. rer. nat. Rainer Dahint für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens zu meiner Arbeit bedanken.

Ebenso danke ich Dr. Tamas Haraszti für die freundliche Betreuung meiner Arbeit und für seine Hilfsbereitschaft.

An diese Stelle möchte ich mich auch ganz herzlich bei den Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für eine angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders danke ich an dieser Stelle auch dem Arbeitskreis von Prof. Aldinger, Herrn Dr. Kaiser, Herrn Dr. Gerstel, Herrn Dr. Schweizer und Herrn Dr. Solak für die freundliche Überlassung einiger Laborgeräte und hilfreiche Diskussionen. Ebenso möchte ich dem Arbeitskreis Jansen für die Mitbenutzung und Einweisung in die NMR-Geräte danken.

Besonderem Dank gebührt auch Frau Dr. Petra Bücken für einige lange Diskussionsabende und für die Korrekturlesung meiner Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Roberto Fiammengo für die Korrekturlesung.

Für unendliche viele XPS-Messungen, hauptsächlich am Wochenenden, danke ich Herrn Dr. Xinyu Cao und Frau Dr. Petra Bücken vom Arbeitskreis Grunze.

Des Weitern möchte ich auch den folgenden Leuten danken

- Patricia Wolney für die QCM-D-Messung

- Dr. Ralf Richter für die Diskussion der QCM-D-Auswertungen
- Dr. Jaques Blümmel und Nicole Plath für die XPS-Messung
- Nadine Perschmann die REM-Aufnahmen
- Johannes Stiegler für Auflösung einiger Computer Probleme
- Sören Schilp für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Chemielabor des AK Grunze
- und Andrea Seehuber für die Einweisung in die IR-Geräte

Für die zuvorkommende und freundliche Bearbeitung der bürokratischen Hindernisse bedanke ich mich auch ganz herzlich bei Frau Bozcek (Universität Heidelberg) und bei Frau Pfeilmeier und Frau Hess vom MPI in Stuttgart.

Besonderem Dank gebührt natürlich auch meinen lieben Kollegen und Kolleginnen vom AK Spatz für die schöne Zeit in Stuttgart und in Heidelberg. Es war mir eine Freude, in einer so tollen und großen Arbeitsgruppe arbeiten zu können.

Hervorheben möchte ich an dieser Stelle besonders die Mädels in meinem Arbeitsbüros in Heidelberg und Stuttgart

- Nadine Perschmann, Nicole Plath und Theresa Pohl danke ich für eine stets lustige und unterhaltsame Bürozeit.
- ebenso auch Dr. Furong Tian, Dr. Beri Mbenkum und meiner Laborkollegin Frau Dr. Francesca Corbellini

Für schöne Zeiten und ihre Freundschaft bedanke ich mich auch bei Georgiana Baldea und Petra Bücken.

Ein großes Dankeschön gilt auch meinen lieben Eltern und Geschwistern. Im Laufe meines Studium haben Sie mir stets den Rücken frei gehalten und mich in jeder Hinsicht unterstützt.

7 Eidesstattliche Erklärung

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

Heidelberg, im März 2008

Hatice Acunman