

Synthese und Charakterisierung von Nanohydrogelschichten auf Polymeroberflächen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Falko Pippig
Potsdam

-2010-

Die vorliegende Arbeit wurde am Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung (Fraunhofer IAP), in der Arbeitsgruppe Oberflächen von Dr. Andreas Holländer, im Zeitraum vom Januar 2006 bis März 2010 verfasst. Die Betreuung des Promotionsverfahrens erfolgte durch Prof. Dr. Rainer Haag und Prof. Prof. Dr. Andreas Lendlein vom Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin.

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Haag, FU Berlin

2. Gutachter: Prof. Prof. Dr. Andreas Lendlein, FU Berlin/Universität Potsdam

Tag der Disputation: 28.06.2010

Danksagung

Ich möchte mich bei Dr. Andreas Holländer für das Überlassen der Aufgabenstellung bedanken. Ich danke beiden Betreuern für die hilfreichen Diskussionen und Hinweise. Ich danke Herrn Prof. Prof. Dr. Andreas Lendlein für die Übernahme des Koreferats.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Büronachbarn Herrn Dipl.-Ing. Stefan Kröpke für den einen oder anderen technischen Tipp und die anregenden Gespräche bedanken. Bei Frau Katrin Fink bedanke ich mich für die schöne und manchmal lustige Zusammenarbeit im Labor.

Für die Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen danke ich Herrn Dr. Manfred Pinnow vom Fraunhofer IAP. Herrn Dr. Armin Wedel danke ich für die Einführung in das Ellipsometer.

Die Nahkanten-Absorptions-Röntgen-Feinstruktur-Spektren entstanden in einer Kooperation mit Frau Dr. Nora Graf von der Bundesanstalt für Materialforschung (BAM). Bei ihr möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein weiterer Dank gilt Frau Sanaa Sarghini vom Flemish Institute of Technology in Mol (Belgien), die mich während ihres Gastaufenthaltes mit ihrer Hilfe im Labor unterstützt hat.

Sindy Rosenkranz und Stefan Kröpke danke ich für das Korrekturlesen.

Nicht zu vergessen sind die zahlreichen Praktikantinnen und Praktikanten, die mir eine kleine Hilfe waren und mich immer wieder sehr aufgemuntert haben.

Im Besonderen danke ich der Fraunhofer Gesellschaft, in Form des Fraunhofer Instituts für Angewandte Polymerforschung (IAP) in Potsdam, für die finanzielle Unterstützung während meiner Dissertation und die vielen wertvollen Erfahrungen, die ich in dieser Zeit sammeln konnte.

Der Firma thinXXS Mikrotechnologie AG (Zweibrücken, Deutschland) danke ich für die Mustergabe von Substratmaterialien (COC-Platten). Mein weiterer Dank gilt der Firma

Raschig GmbH (Ludwigshafen, Deutschland) für die Mustergabe von GE 100 und GE 500.

Weiterhin danke ich meinen Eltern, meiner Freundin und meinen Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt haben und mir den nötigen Ausgleich verschaffen konnten.

Falko Pippig, Potsdam im März 2010

“Ich habe auf eine geringe Vermutung eine gefährliche Reise gewagt, und erblicke schon die Vorgebürge neuer Länder. Diejenigen, welche die Herzhaftigkeit haben die Untersuchung fortzusetzen, werden sie betreten und das Vergnügen haben, selbige mit ihrem Namen zu bezeichnen.“

Immanuel Kant

aus dem Vorwort des Werkes: „Allgemeinen Naturgeschichte und Theorie des Himmels“

1755

Kurzzusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt einen Weg auf, mit dem auf Basis von Additions- und Kondensationsreaktionen dünne (10 – 100 nm) Polyethylenglykol-Schichten auf Polymeroberflächen hergestellt werden können. Dazu wurden O,O'-Bis-(2-Aminoethyl)oligoethylenglykole mit einem trifunktionellen Epoxid oder Säurechloriden auf der Oberfläche zur Reaktion gebracht. Durch die Reaktionsführung und die eingesetzten Ausgangsstoffe lässt sich die Dicke, die Maschenweite, die Art und die Konzentration der funktionellen Gruppen variieren. So wurden Netzwerke mit COOH, NH₂- und OH-Gruppen hergestellt. Durch Zusatz eines dritten Ausgangsstoffes wurden weitere Gestaltungsmöglichkeiten für die Funktionalisierung eröffnet. Somit konnte die Konzentrationen von COOH-Gruppen erhöht oder Biotin in das Netzwerk integriert werden. Die Netzwerke quellen in Wasser zu einer dünnen Gelschicht, die insbesondere für biologische Anwendungen interessant sein kann.

Die Netzwerke können beispielsweise als Beschichtung eines Mikroarrays nützlich sein, welche für die medizinische Diagnostik von Bedeutung sind. In üblichen Mikroarrays werden die Moleküle in der Fläche gebunden, wobei sich ihre räumliche Struktur und damit ihre ursprüngliche biologische Funktion verändern kann. Damit Proteine in das Netzwerk diffundieren können, muss die Maschenweite auf eine ausreichende Größe eingestellt werden. Es kann gezeigt werden, dass Netzwerke auf der Oberfläche mit einer Maschenweite von mehr als 20 nm hergestellt wurden. Zur Demonstration der hohen Aufnahmekapazität der Netzwerke wird das Protein Streptavidin in sechsmal höherer Konzentration an Biotin gebunden, als es auf einer 2D-Oberfläche möglich ist. Auf Grund der niedrigen Konzentration der funktionellen Gruppen im Bereich von pmol cm⁻² ist eine Mehrfachreaktion mit den Proteinen unwahrscheinlich.

Die Analytik von Netzwerken auf Oberflächen stellt eine besondere Herausforderung dar. Diese konnte unter anderem mit Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) in Kombination mit chemischer Derivatisierung realisiert werden. Es wird gezeigt, wie sich mit diesem Ansatz die Abstände zwischen zwei Verzweigungen in dem Netzwerk bestimmen lassen. Zur Ermittlung der Konzentration der funktionellen Gruppen im Netzwerk wird die Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt.

Es wird versucht eine Einheit zwischen Synthese, Analytik und Technologie herzustellen.

Abstract

This work describes an new approach to the production of nanoscale (thickness: 10 – 100 nm) polyethylene glycol networks on polymer substrates. The polymer networks are synthesized through addition- and condensation reactions of O,O'-Bis(2-aminoethyl)oligoethylene glycol with a trifunctional epoxide or acid chlorides. The thickness, mesh size, concentration and type of functional groups can be controlled with the reagents and the reaction conditions. In that way polymer networks with amine and carboxylic acid groups can be produced.

By adding another reagent to the reaction mixture the opportunities to build up the network are increased. In this way concentration of carboxylic acid groups can be increased or biotin can be added. The networks form thin gel layers in water which can be interesting for biological applications.

The above-mentioned gel layers can be used as a coating for microarrays, which are important for diagnostics. In common arrays the molecules are bonded to a flat surface. In that case many of proteins can lose their biological properties. In the presented gel layers proteins can be immobilized in an environment which is close to their natural one. For that application the mesh size of the networks need to be sufficiently large. Only in that way big molecules are able to enter into the gel layer. The mesh size of the networks is larger than 20 nm. Additionally, it was demonstrated that streptavidin is immobilized at a biotin moiety in a concentration which is 6 times higher than a densely packed monolayer of the protein on a flat (2D) surface. Due to the low concentration of the functional groups in pmol cm⁻² range the probability for multiple reactions with a protein is low.

The characterization of the networks is a complex topic. It was done with X-ray-photoelectron spectroscopy (XPS) combined with chemical derivatization. It is demonstrated that the distance between two branches in the network can be determined with XPS. Fluorescence spectroscopy was used to determine the concentration of the functional groups in the network.

Altogether, this work tries to combine synthesis, analysis and technology.

Inhaltsverzeichnis

1	PROBLEMSTELLUNG	1
2	ALLGEMEINER TEIL	4
2.1	Methoden zur Funktionalisierung von Oberflächen	4
2.1.1	Polymeroberflächen und molekularbiologische Anwendungen	4
2.1.2	„Grafting to“	6
2.1.3	„Grafting from“	12
2.1.4	Dünne Filme durch Polykondensation auf Oberflächen	16
2.2	Analytik von Oberflächen und dünnen Schichten	17
2.2.1	Allgemeiner Überblick	17
2.2.2	XPS – Analyse organischer Oberflächen und Schichten	19
2.2.3	Fluoreszenzmarkierung an Polymeroberflächen	24
2.2.4	Messung der Schichtdicke mittels Ellipsometrie	28
3	GERÄTE, APPARATUREN UND EXPERIMENTELLE DURCHFÜHRUNG	30
3.1	Messmethoden und Messparameter	30
3.1.1	Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie	30
3.1.2	Fluoreszenzspektroskopie	31
3.1.3	Ellipsometrie	32
3.1.4	Rasterelektronenmikroskopie	33
3.1.5	Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie	33
3.2	Aufbauten	34
3.2.1	Reaktor zur Plasmafunktionalisierung	34
3.2.2	Apparaturen zur Tauchbeschichtung	34
3.2.3	Apparatur zum Aufdampfen organischer Substanzen	35
3.2.4	Apparatur zur Gasphasenderivatisierung	36
3.2.5	Aufbau für Diffusionsuntersuchungen in einer Durchflusszelle	37
3.3	Experimentelle Prozeduren	39
3.3.1	Verwendete Chemikalien	39

3.3.2	Beschichtung von Objektträgern mit einem PE-Film	39
3.3.3	Aktivierung im Sauerstoffplasma	40
3.3.4	Anbindung von O,O'-Bis(2-aminopropyl)polypropylenglykol 230	40
3.3.5	Synthese eines PEG-Glycidyl-Glycerolether-Netzwerkes	40
3.3.6	Einführen weiterer Gruppen in das Epoxid-Netzwerk	41
3.3.7	Synthese eines PEG-Säurechlorid-Netzwerkes	41
3.3.8	Einführen weiterer Gruppen in ein PEG-Säurechlorid-Netzwerk	42
3.3.9	Chemischer Gradient an COOH-Gruppen	42
3.3.10	Stabilität in Abhängigkeit des pH-Wertes	43
3.3.11	Fluoreszenzmarkierung von funktionellen Gruppen	43
3.3.12	Derivatisierung mit TFAA für XPS-Messungen	44
3.3.13	Interaktionsstudien zwischen der Gelschicht und Modellproteinen	44
3.3.14	Experimente mit einer Durchflusszelle	45
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Strategie für die Synthese der Netzwerke	47
4.2	Synthese der Hydrogelschichten	52
4.2.1	PEG-Glycidyl-Glycerolether-Netzwerke	52
4.2.1.1	Prinzip	52
4.2.1.2	Maschenweite	57
4.2.1.3	Schichtdicke	62
4.2.1.4	Stabilität	72
4.2.1.5	Homogenität	73
4.2.2	PEG-Säurechlorid-Netzwerk	74
4.2.2.1	Prinzip	74
4.2.2.2	Maschenweite	81
4.2.2.3	Schichtdicke	87
4.2.2.4	Stabilität	89
4.2.2.5	Homogenität	89
4.3	Variation der Dichte und Art der funktionellen Gruppen	90
4.3.1	Veränderung der Konzentration an funktionellen Gruppen	90
4.3.2	PEG-Diamin-Biotin-Netzwerke	93

5	DISKUSSION	105
5.1	Vergleich der Schichten mit dem Stand der Technik	105
5.2	Hypothese zum Mechanismus der Netzwerkbildung und deren Kinetik	111
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	119
7	LITERATURVERZEICHNIS	123
8	ANHANG	132
8.1	Abkürzungen und Formelzeichen	132
8.2	Veröffentlichungen	134
8.3	Lebenslauf	136

1 Problemstellung

In der biologischen Forschung und medizinischen Diagnostik wird versucht Moleküle, von denen eine biologische Aktivität ausgeht, auf Oberflächen zu binden um ihre Handhabung zu vereinfachen. Dazu werden die Oberflächen (z.B. von polymeren Substraten) verändert, um eine kovalente Bindung der Moleküle zu ermöglichen.

So wurden beispielsweise Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Fragmente auf Oberflächen gebunden, um ihre Interaktion mit anderen DNA-Fragmenten zu studieren.^[1] Dieser Ansatz war ein wesentlicher Bestandteil des Human-Genom-Projektes, bei dem die DNA-Sequenz des Menschen entschlüsselt wurde.^[2] Neben DNA-Arrays sind Proteinarrays von großem Interesse, da sich durch Proteinarrays große Fortschritte in der medizinischen Diagnostik und biologischen Forschung erreichen lassen.

Die Bindung von Proteinen auf Oberflächen stellt aber eine große Herausforderung dar. Proteine können durch eine Adsorption oder chemische Bindung auf Oberflächen ihre räumliche Struktur und damit auch ihre biologische Aktivität verändern.^[3]

In vielen Fällen werden für die Bindung von Proteinen Substrate verwendet, welche für DNA-Arrays entwickelt worden sind. Damit werden die Moleküle auf einer Fläche (2-D) gebunden. Diese Oberflächen können zu Mehrfachreaktionen an einem Protein führen, wodurch es sich irreversibel verändert. Deshalb werden überschüssige funktionelle Gruppen nach der Bindung des eigentlich zu untersuchenden Proteins oft mit anderen Proteinen, wie mit Albumin des Rinderserums (BSA)^[4,5] oder Casein^[6], abgesättigt.

Um die Eigenschaften von Proteinarrays zu verbessern wird in dieser Arbeit versucht Netzwerke aufzubauen, welche nach folgenden Gesichtspunkten entworfen werden:

- Das Netzwerk muss aus Ausgangsstoffen aufgebaut sein an die Proteine wenig adsorbieren, d.h. wodurch die Proteine nicht beeinflusst werden.
- Es muss eine große Maschenweite (> 15 nm) besitzen, damit die Proteine eindringen können.
- Die Konzentration an funktionellen Gruppen muss klein sein, um Mehrfachreaktionen zu reduzieren.
- Die Dicke der Schicht sollte im Bereich von Nanometern liegen, um die Diffusion der Proteine in die gesamte Schicht in kurzer Zeit zu ermöglichen.

Bei der Wahl der Ausgangsstoffe erscheint die Verwendung von Poly(ethylenglykolen) (PEG) sinnvoll, da sich PEG als Material herausgestellt hat, welches Wasser gut bindet und keine bzw. geringe Wechselwirkungen mit Proteinen eingeht.^[7,8,9] Dies ist eine wichtige Voraussetzung, da die Proteine gezielt im Netzwerk gebunden werden sollen. Dazu muss verhindert werden, dass es zu einer unkontrollierten Bindung kommt. Im biowissenschaftlichen Sprachgebrauch wird dies als unspezifische Wechselwirkung bezeichnet und ist ein Grund für den analytischen Hintergrund (Rauschen) eines Arrays.

Die große molekulare Vielfalt der Natur, so besteht das menschliche Proteom aus 100000 bis zu mehreren Millionen von unterschiedlichen Molekülen,^[10] erfordert es, auf einem einfachen und kostengünstigen Weg Substrate mit entsprechenden Schichten zu versehen.^[11] Nur so können ausreichend Experimente durchgeführt werden, um Wissen über sich erkennende Moleküle zu generieren. Daneben haben Proteinarrays das Potential einen Massenmarkt zu erschließen, im Besonderen, wenn an die medizinische Diagnostik gedacht wird. Dieser Gesichtspunkt sollte innerhalb der vorzustellenden Lösung Berücksichtigung finden. Neben Glassubstraten sind Polymersubstrate von Interesse, da diese im Fall von Polyethylen (PE), kostengünstiger sind oder das Potential haben kostengünstiger zu sein, wie es beispielsweise bei Cycloolefincopolymer (COC) der Fall ist. Allerdings haben diese Polymere keine funktionellen Gruppen für chemische Umsetzungen. Mit Hilfe von Plasmaprozessen lassen sich diese auf technologisch durchführbare Weise auf den Oberflächen einführen.

Diese große chemische Vielfalt der Natur erfordert einen flexiblen Weg, um eine hohe Variationsbreite der Netzwerke zu erreichen, in denen diese vielfältigen Moleküle studiert werden können. Es soll gezeigt werden wie folgende Parameter solcher Netzwerke variiert und analysiert werden können:

- Maschenweite
- Schichtdicke
- Art der funktionellen Gruppen
- Konzentration der funktionellen Gruppen.

Wird es erreicht diese Parameter zu variieren und ihre Abhängigkeiten zu verstehen können Netzwerke gezielt auf eine Anwendung hin angepasst werden. Neben Verwendung der Netzwerke als Beschichtung für Proteinarrays sind auch Beschichtungen zur Anlagerung von Zellen realisierbar, wie sie in Ref. [12] beschrieben sind. Daneben ist es denkbar, Proteine oder andere Moleküle für

katalytische Aufgaben gezielt zu immobilisieren. Dies macht besonderen Sinn, wenn an sehr wertvolle Enzyme gedacht wird.

Diese Anforderungen stellen eine Herausforderung für die Oberflächenanalytik dar,^[13] welche benötigt wird, um das gebildete Netzwerk zu analysieren. Zur Charakterisierung der Netzwerke findet die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS), zur Analyse der atomaren Zusammensetzung, Anwendung. Mit Fluoreszenzspektroskopie lässt sich die Konzentration von funktionellen Gruppen, nach Markierung mit einem Farbstoff, mit sehr hoher Empfindlichkeit bestimmen. Die Dicke der Schichten wird mit Ellipsometrie ermittelt.

Insgesamt macht es sich diese Arbeit zur Aufgabe zu zeigen, wie solche Netzwerke hergestellt werden können und wie eine Analyse dieser möglich ist. Es wird versucht eine Einheit aus Synthese, Analytik und Technologie herzustellen.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Methoden zur Funktionalisierung von Oberflächen

2.1.1 Polymeroberflächen und molekularbiologische Anwendungen

In dieser Arbeit wird unter einer Oberfläche die äußere Grenzfläche eines makroskopischen Feststoffes, wie zum Beispiel einer Folie oder einer Polymerplatte, verstanden. Die äußere Grenzfläche von Polymer substraten weist, wie auch andere Festkörpergrenzflächen, unter anderem veränderliche Eigenschaften in Abhängigkeit des umgebenden Mediums auf.^[14]

Es können mittels veränderter Oberflächen eine Vielzahl von Anwendungen realisiert werden. Dies können Oberflächen mit antimikrobiellen, proteinabweisenden und sensorischen Eigenschaften sein. Eine Übersicht über verschiedene Anwendungen wurde unter anderem von Goddard et. al. verfasst.^[15]

Ein Ansatz ist die Verwendung von PE als Substratmaterial. Es können auf PE-Substraten, auf Grund der fehlenden Funktionalgruppen, keine Moleküle (wie zum Beispiel Proteine) kovalent gebunden werden, um sie anschließend zu studieren oder ihre biochemischen Eigenschaften zu nutzen. Eine Möglichkeit funktionelle Gruppen auf einer inerten Polymeroberfläche einzuführen ist die Behandlung mit einem Plasma.

Sollen Proteine auf einer Oberfläche im aktiven Zustand gebunden werden, sollten folgende Sachverhalte Berücksichtigung finden. Proteine können auf Grund von elektrostatischen Wechselwirkungen, durch Wasserstoffbrückenbindungen oder durch dispersive Kräfte auf Oberflächen adsorbieren.^[16] Die Adsorption selbst hängt wiederum auch von der Zusammensetzung des Proteins ab, wie zum Beispiel von seinen Ladungen und ist ebenfalls vom Lösemittel (im Besonderen dessen pH-Wert), in dem das Protein gelöst ist, abhängig. Dabei zeigen die Proteine unterschiedliches Verhalten, so dass allgemeine Aussagen schwer abzuleiten sind.^[17,18] In der Literatur werden allerdings ionische und dispersive Kräfte als wesentliche Ursachen für die Adsorption beschrieben.^[16]

Im Wasser werden Proteine dadurch stabilisiert, dass die hydrophoben Seitenketten nach Innen gerichtet sind und die polaren Gruppen nach Außen wirksam werden.^[19,20] Dies zeigt sich, unter anderem an der sehr schnellen Adsorption von Protein A aus einer wässrigen Lösung auf einer Oberfläche einer Siliziumscheibe mit polaren Gruppen (Si-OH/Si-O⁻Gruppen, glasartig), wie sie von Coen et. al. mit Atom-

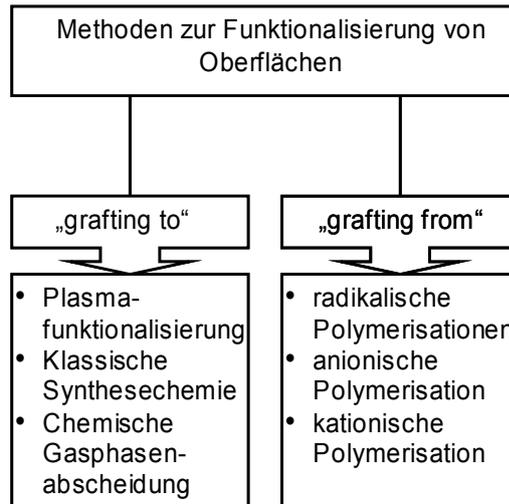
Kraft-Mikroskopie (AFM) und Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) untersucht wurde.^[21] Coen et. al. beschreibt, dass sich nach 15 s – 20 s ein geschlossener Film von Protein A mit einer Dicke von 2 nm – 3 nm bildet. Es wird davon ausgegangen, dass das Protein auf Grund der Adsorption seine geometrische Struktur verändert und daher nicht mehr biologisch aktiv ist. Im Anschluss bilden sich, in einer zweiten und langsameren Adsorption (Faktor 1000), weitere Lagen an Protein A aus, wobei die biologische Aktivität der Proteine dann größer ist. Es stellt sich jedoch die Frage nach der Zugänglichkeit des Protein A, für weitere Interaktionsstudien mit anderen Molekülen, in den gebildeten dichten Multischichten. Die erste Proteinschicht stellt eine Art organisches Material dar, wie es auch als Substrat in dieser Arbeit Verwendung findet.

Es wird in der Literatur diskutiert, dass Proteine auch auf Oberflächen ohne polare Gruppen adsorbieren. Demnach falten sie sich um und nehmen danach einen Zustand höherer Entropie ein.^[16]

Um Proteine (und andere Moleküle) in ihrer natürlichen Form zu studieren schließen sich Veränderungen am Protein, um eine unkontrollierte Adsorption zu verhindern oder zu verringern, aus. Aus diesem Grund muss die Zusammensetzung und die Architektur der Oberflächen oder Schichten zur gezielten Immobilisation biologisch aktiver Moleküle angepasst werden.

Eine Beschichtung mit Polyethylenglykol (PEG) auf verschiedenen Materialien hat sich als hilfreich erwiesen, um eine unkontrollierte Adsorption von Proteinen auf Oberflächen zu reduzieren.^[7] Aus diesem Grund scheint es auch geeignet zu sein, als Ausgangsstoff für ein Netzwerk zu dienen.

Zum Erreichen bestimmter Oberflächenfunktionen sind oftmals chemische Umsetzungen nötig. Dazu wurden zahlreiche Methoden entwickelt, welche im folgenden exemplarisch dargestellt werden sollen (Übersicht 1).



Übersicht 1: Eine mögliche Einteilung von Methoden zur Funktionalisierung von Oberflächen.

Neben anderen Einteilungen ist es üblich das Funktionalisieren von Oberflächen in zwei große Verfahrensklassen einzuteilen. Werden Moleküle an einer Oberfläche angebunden wird dies als „grafting to“ bezeichnet. Der Aufbau von Molekülen aus Monomeren von der Oberfläche weg wird als „grafting from“ benannt. Eine besondere Klasse stellen die Kondensationsreaktionen auf Oberflächen dar.

2.1.2 „Grafting to“

Ein Verfahren, welches in die „grafting to“ Methoden eingeordnet werden kann, ist die Plasmaaktivierung. Dabei werden funktionelle Gruppen auf Oberflächen von inerten Polymer substraten eingeführt, welche für weitere Umsetzungen oder die direkte Anbindung von biologisch aktiven Molekülen Verwendung finden können.

Bei der Plasmaaktivierung wird ein inertes Substrat, wie zum Beispiel PE, durch ein in ein elektrisches Feld eingebrachtes Gas mit funktionellen Gruppen versehen. Das Prinzip eines Plasmas besteht darin, dass unter Einfluss eines elektrischen Feldes freie Elektronen beschleunigt und in der Folge Gasmoleküle lawinenartig durch Stöße in einen geladenen oder radikalischen Zustand überführt werden. Dadurch werden Spezies mit sehr hoher Reaktivität erzeugt, die es ermöglichen die Zusammensetzung und damit die Eigenschaften einer Oberfläche zu verändern. Die Plasmen selbst werden in zahlreichen Büchern, wie zum Beispiel in Ref. [22, 23], umfangreich beschrieben. Die Anwendung von Plasmen zum Einführen von Gruppen an Polymeroberflächen für die Immobilisation von biologisch aktiven Molekülen wird in einem Übersichtsartikel von Griesser et. al. vorgestellt Ref. [24].

Die Plasmaspezies reagieren mit der Oberfläche. Die Art der erzeugten funktionellen Gruppen ist von dem Gas bzw. der Zusammensetzung des Gasgemisches, welches in den Plasmazustand überführt wird, und den Parametern des Plasmas selbst abhängig. Beispielsweise lassen sich stickstoffhaltige funktionelle Gruppen durch die Behandlung mit einem Stickstoff/Wasserstoff- oder Ammoniakplasma auf einem Polypropylensubstrat erzeugen.^[25] Carbonsäure-Gruppen lassen sich durch ein Plasma in einer Kohlendioxid- Atmosphäre generieren. Dabei bilden sich jedoch auch zahlreiche Aldehyde und Ketone, sowie Hydroxy- und Epoxygruppen.^[26] Wird das Substrat, beispielsweise PE, in einem Sauerstoffplasma behandelt, können ebenfalls sauerstoffhaltige Funktionalgruppen erzeugt werden. Diese sind nicht einheitlich, sondern stellen ein Gemisch aus verschiedenen Spezies, wie Hydroxy-, Keto-, und Carbonsäuregruppen, dar.^[27] Eine schematische Darstellung der chemischen Struktur eines mit einem Sauerstoffplasma behandelten Polymersubstrates ist in Abbildung 1 dargestellt.

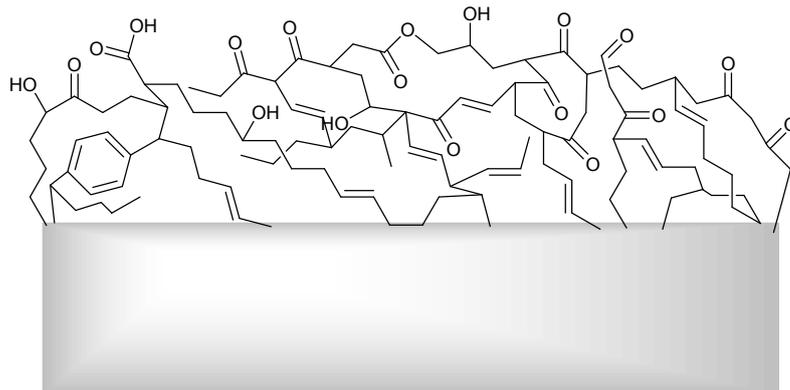


Abbildung 1: Modell einer mit einem Sauerstoffplasma behandelten Oberfläche

Friedrich et al. hat umfangreiche Arbeiten durchgeführt, um durch weitere Umsetzungen eine homofunktionelle Oberfläche zu erreichen. Dies kann zum Beispiel durch eine Reduktion der Funktionalgruppen, mittels Diboran (B_2H_6) und Lithiumaluminiumhydrid ($LiAlH_4$), erfolgen.^[28] Daneben gibt es Arbeiten, die den Einfluss verschiedener Plasmen auf funktionelle Gruppen an anderen Substratoberflächen beschreiben. So wurde eine Poly(ethylenterephthalat)-Oberfläche (PET-Oberfläche) mit einem Sauerstoffplasma behandelt und mittels XPS der Einfluss auf die chemische Zusammensetzung der Oberfläche bestimmt.^[29] Um eine chemisch einheitlichere Oberflächenfunktionalisierung zu erreichen, wird versucht auf Oberflächen acrylische, methacrylische, vinylische, allylische, propargylische Monomere als stark vernetzte Schicht aus einem Plasma auf einem

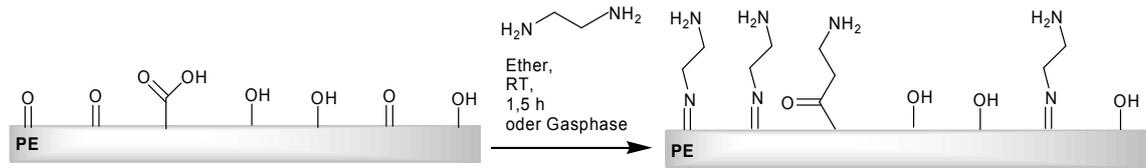
Substrat abzuscheiden. Dazu wurden unter anderem Arbeiten mit Allylkohol^[30] und Allylamin^[31] durchgeführt. Mittels eines Plasmas lassen sich nicht nur mit Doppelbindungen versehene Monomere polymerisieren. Beispielsweise wurde die Polymerisation von Ethylenglykoldimethylether auf einer Polyethylenoberfläche untersucht.^[32] Dazu wurde die Polyethylenoberfläche zuerst mit Argon-Ionen (Ar⁺) aus einem Argon-Plasma in einen reaktiveren Zustand überführt. Danach wurde Ethylenglykoldimethylether als Dampf in die Kammer eingeleitet. Die Eigenschaften des Films werden als PEG-ähnlich beschrieben.

Ein weiterer Aspekt ist die Veränderung von Oberflächen organischer Polymere mit der Zeit und in Abhängigkeit der Umgebung.^[33] Der Alterungsprozess lässt sich in chemische Veränderungen oder in Veränderungen durch Konversion der Gruppen unterscheiden. Die Prozesse sind dabei von der Art des Polymers, der Lagerungstemperatur und der Atmosphäre, von der das Substrat umgeben ist, abhängig.^[24,26,34,35] Die Literatur zeigt, dass das Umorientieren von funktionellen Gruppen an polymeren Substraten ein komplexer Vorgang ist, der stark von den untersuchten Materialien abhängig ist. Im Fall von oxidierten PE-Oberflächen scheint diese Erscheinung weniger ausgeprägt zu sein.^[36] Zudem scheint der Prozess reversibel zu sein, wenn das Substrat in Wasser gegeben wird. Er tritt nicht auf, wenn sich an den Ketten des Substratmaterials voluminöse Reste befinden.

Durch Plasmaprozesse werden auf Oberflächen verschiedene funktionelle Gruppen erzeugt, welche nur eine geringe Einheitlichkeit aufweisen. Eine Alternative, eine kontrolliertere Funktionalisierung vorzunehmen, ist die nachträgliche Umsetzung in einem flüssigem Reaktionsmedium oder mit einem Gas.^[24]

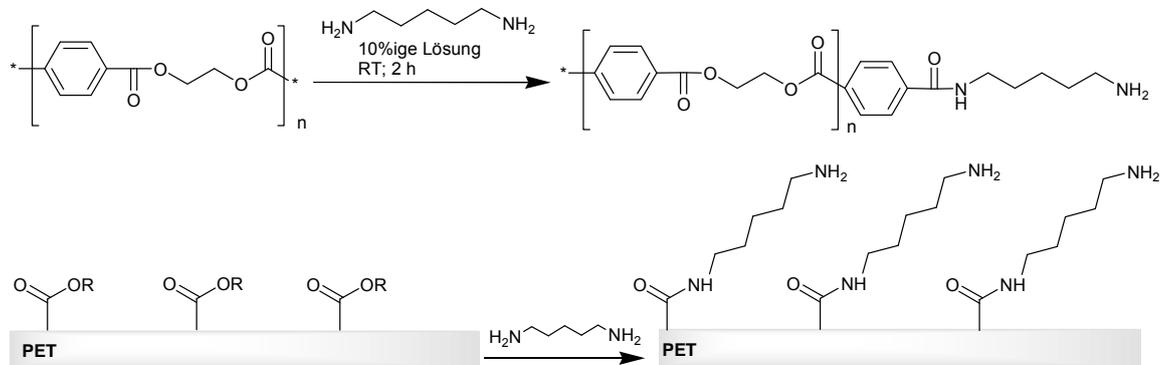
Von besonderem Interesse für biochemische Anwendungen sind mit Aminogruppen versehene Schichten. Aminogruppen können genutzt werden um biologisch aktive Moleküle anzubinden. Die entsprechend funktionalisierten Substrate sind zum Teil kommerziell erhältlich. Eine Möglichkeit stickstoffhaltige Gruppen einzuführen sind, die schon beschriebenen, Plasmaprozesse mit stickstoffhaltigen Gasen oder Monomeren. Ein weiterer Weg ist die Silanisierung einer Polymeroberfläche mittels 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES).^[37] Dabei kondensiert das Silan zu einem engmaschigen Netzwerk mit primären Aminogruppen. Diese Möglichkeit der Funktionalisierung von Polymeroberflächen mit primären Aminogruppen wurde aus der Oberflächenchemie von Glas adaptiert.^[38]

Eine alternative Methode zur Funktionalisierung von plasmaaktiviertem PE oder COC mit primären Aminen stellt die Anbindung eines Diamins dar. Die Anbindung des Amins kann aus Lösung und aus der Gasphase erfolgen (Schema 1).^[39]



Schema 1: Aminofunktionalisierung einer plasmabehandelten Polymeroberfläche mit einem Diamin (Ref.[39])

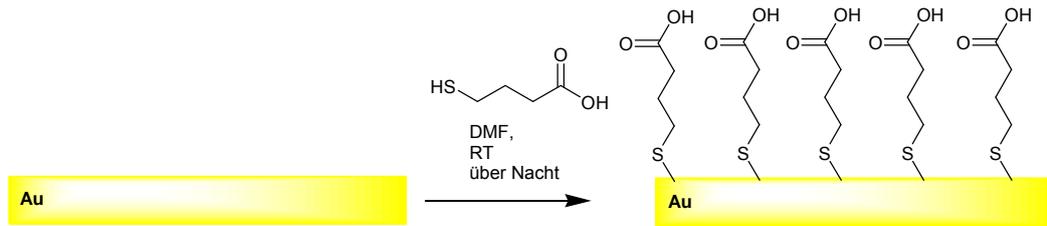
Eine Möglichkeit Polyester mit primären Aminogruppen zu versehen ist die Aminolyse, wie am Beispiel von PET^[6] und Poly(methylmethacrylat) PMMA^[40] gezeigt wurde (Schema 2). Die Bildung von Neben- und Spaltprodukten ist bei diesem Verfahren sehr ausgeprägt.



Schema 2: Aminolyse von Estern eines Polymers an dessen Oberfläche durch Diamine

Die Anbindung größerer Moleküle, wie ein Polyamidoamin-Dendrimer (PAMAM), an Polymeroberflächen, wurde von Fail et. al. an einer Oberfläche eines Plasmapolymers aus Maleinsäureanhydrid demonstriert.^[41] In Abhängigkeit der Stufe des Dendrimers lässt sich somit die Dichte an funktionellen Gruppen variieren. Neben Dendrimern werden auch PEG-basierte Stern-Polymere auf Oberflächen von organischen Polymeren angebunden.^[42]

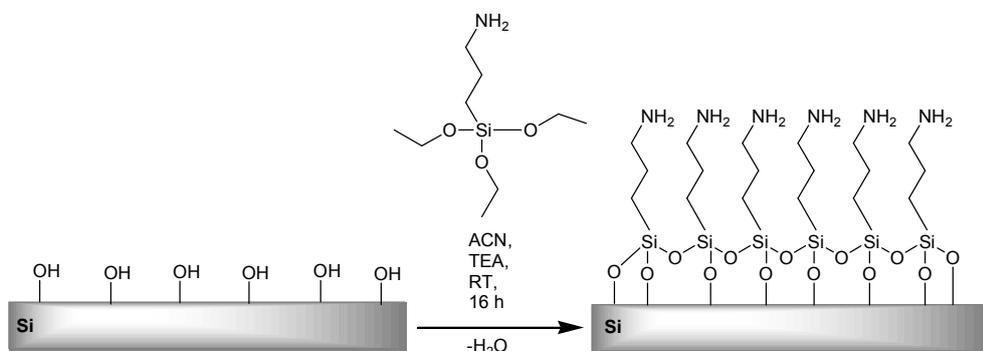
Nicht nur Polymeroberflächen werden im „grafting-to“-Verfahren funktionalisiert. Ein häufig angewandtes Verfahren, welches im Ursprung auf Nuzzo et. al. zurück geht,^[43] ist die Bindung von Thiolen auf Goldoberflächen (Schema 3).^[44,45] Dabei werden ebenfalls PEG-Derivate verwendet, um die Adsorption von Proteinen zu reduzieren. Untersuchungen zum Einflusses der Kopplungsdichte der Ketten auf einer Oberfläche wurden beispielsweise von Unsworth et. al. durchgeführt.^[46] Selbst mit Thiol-Gruppen funktionalisierte Peptide lassen sich mit diesem Verfahren binden.^[47] Auf Goldoberflächen über die Au-S-Bindung gekoppelte kurzkettige PEG-Thiocarbonsäuren können unter anderem zur kovalenten Immobilisation von Proteinen genutzt werden.^[48]



Schema 3: Bindung von Thiole durch Ausbildung einer Au-S-Bindung auf goldbeschichteten Substraten

Es wurde versucht auch Poly- und Oligomere auf Goldoberflächen zu binden. So koppelt Xia et. al. PEG-funktionalisierte Polysiloxane auf Goldoberflächen.^[49] An den Polysiloxanen befinden sich N-Hydroxysuccinimid-Gruppen (NHS-Gruppen), welche für die Bindung von Proteinen genutzt werden können. Gleichzeitig wird durch die PEG-Ketten ohne NHS-Endgruppen die Adsorption von Proteinen reduziert. Verzweigte Polyglycerole (PG) werden auf Goldoberflächen über Thiol-Gruppen gebunden und verhindern ebenfalls die Adsorption von Proteinen.^[50] Auf Poly(acrylamid) mit NHS-Gruppen basierende Polymere finden ebenfalls für die Immobilisierung von Proteinen Verwendung.^[51] Um das in Lösung synthetisierte Polymer auf Gold zu binden, wird es mit Thioalkylaminen modifiziert. Zur Reduzierung der Dichte an NHS-Gruppen werden diese mit PEG-Aminen abgesättigt. Gebunden auf Gold wurde die Wechselwirkung mit verschiedenen Proteinen untersucht.

Die Synthese von Silanschichten auf Siliziumscheiben und Glas geht auf das Jahr 1980 zurück. Sagiv et. al. zeigt, wie sich mit Trichlorsilanen, nach Hydrolyse durch eine auf dem Substrat adsorbierte Wasserschicht, eine Silanschicht bilden lässt.^[52] Eine der gängigsten Wege Glas- oder Siliziumwaferoberflächen mit primären Aminen zu versehen, ist wie auch auf den Oberflächen organischer Polymere, die Kondensation einer Schicht oder Monolage aus APTES (Schema 4; vgl. Ref. [38]).

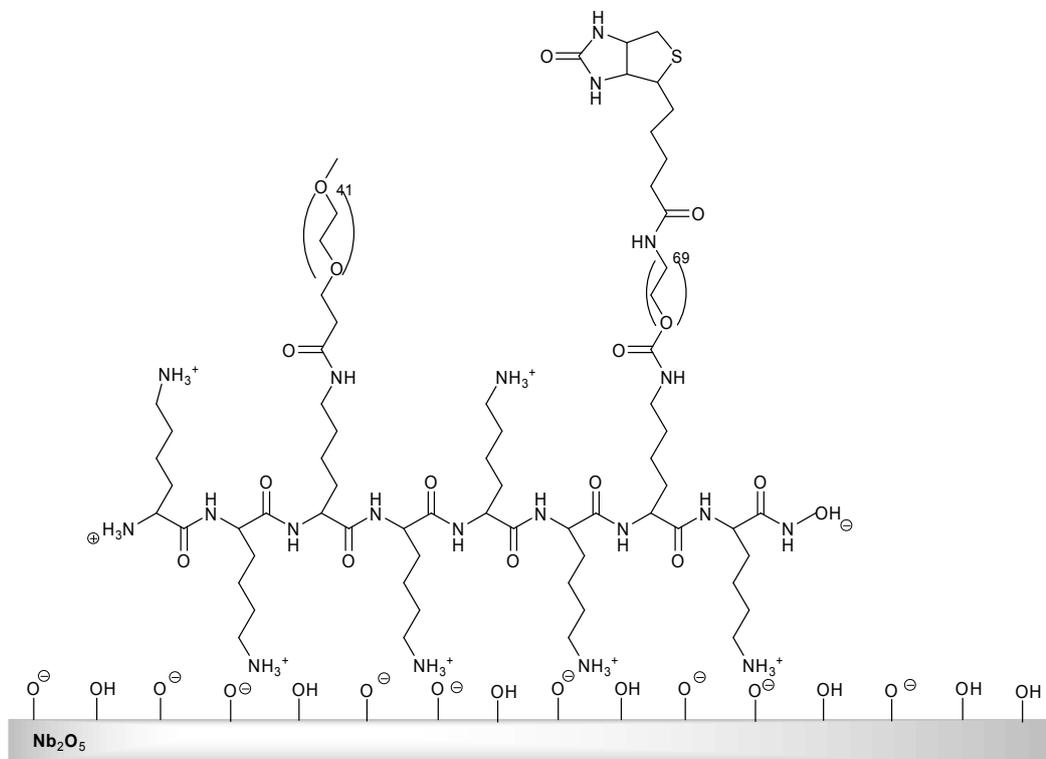


Schema 4: Kondensation einer Silanschicht auf einem Glas oder Siliziumsubstrat – Funktionalisierung mit primären Aminen durch APTES (Ref. [38])

Ein auf Acrylamid basierender und auf einem Glassubstrat adsorbierter Film wird in der Literatur ebenfalls vorgestellt.^[53] Die Besonderheit in diesem Beispiel ist, dass die Proteine über photoaktive Gruppen angebunden werden können. In einem ähnlichem Verfahren werden Proteine in einer PEG-Matrix (basierend auf PEG-dimethacrylat (PEG-MA)) auf einem Glassubstrat über Acrylgruppen immobilisiert.^[54] Die funktionalisierten Substrate werden für die Anlagerung von Zellen verwendet. Die Synthese eines Siloxanfilmes und die nachträgliche Anbindung von PEG wurde von Mao et. al. demonstriert.^[55]

Für die optische Wellenleiterspektroskopie (OWLS), einer Methode bei der die Veränderung des Brechungsindex an einem mit Nb_2O_5 beschichteten Glassubstrat mit der Adsorption einer Masse korreliert wird, wurde Poly(L-Lysin)-g-poly(ethylenoxid) (PLL-g-PEG), ein kationischer Polyelektrolyt, auf der Oberfläche adsorbiert.^[56] Das Polymer wurden in Lösung mit Biotin-Gruppen versehen (Schema 5). An diese Gruppen können über das Protein Streptavidin weitere Proteine angebunden werden. Es wird gezeigt, dass sich das Streptavidin in einer Konzentration an die Oberfläche anlagert, die einer Monolage entspricht.

Die kovalente Anbindung von Polymeren auf Oberflächen führt oftmals zu einer niedrigen Bindungsdichte,^[57,58] da sich große Moleküle während der Reaktion mit den funktionellen Gruppen auf einer Oberfläche sterisch hindern.

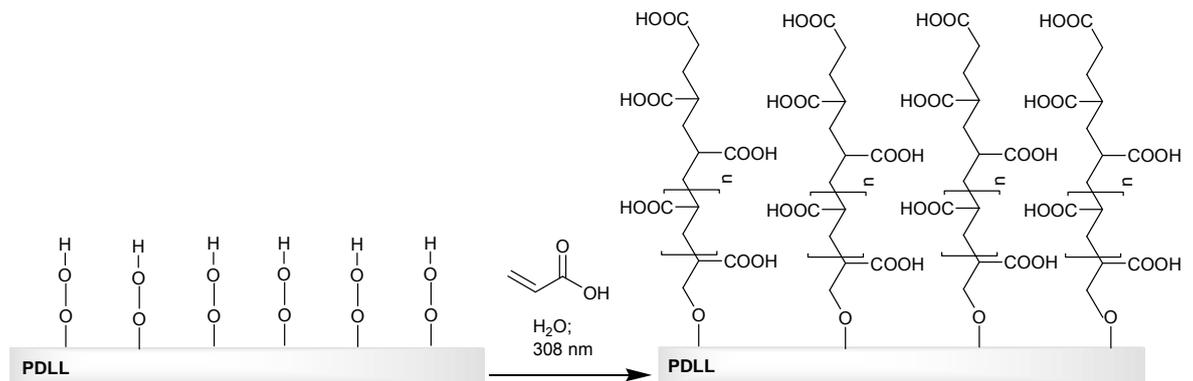


Schema 5: Adsorption eines in Lösung polymerisierten Polyelektrolyten auf einem Substrat mit OH-Gruppen (Ref. [56])

2.1.3 „Grafting from“

Bei den „grafting-from“-Verfahren wird eine Polymerisation durch einen Initiator auf der Oberfläche des Substrates gestartet. Dieser Initiator kann eine radikalbildende Spezies für eine radikalische oder eine ionische Spezies für eine ionische Polymerisation sein. Eine Möglichkeit mittels der klassischen radikalischen Polymerisation ein Netzwerk auf einer Glasoberfläche herzustellen wird von Charles et. al. vorgestellt.^[59] Dafür wird die Oberfläche mit einer Schicht aus einem Silan mit Methacrylat-Gruppen versehen. Auf dieser Funktionalisierung wird eine 2 und 4 µm dicke Hydrogelschicht, auf Basis von Acrylamid und Bisacrylamid, polymerisiert. Diese Schicht wird als stark vernetzt beschrieben. Nach einer (weiteren) Vernetzung der Schicht mit einem bifunktionellen NHS-Ester können Proteine kovalent, über die nicht reagierten NHS-Gruppen, angebunden werden. Bei der Anbindung eines Antikörpers konnte eine Erhöhung der Oberflächenkonzentration, im Vergleich zu einem 2-D-Array, um einen Faktor von 2-3 festgestellt werden. Dies wird darauf zurück geführt, dass das Protein auf dem Acrylamidgel besser zugänglich ist. Allerdings wird auch von einem starken Hintergrund berichtet.

Auf Polymeroberflächen werden radikalische Polymerisationen genutzt, die von instabilen Funktionalgruppen ausgehen. Das Prinzip besteht darin, durch die Einwirkung eines Plasmas, reaktive Gruppen auf einer Oberfläche zu erzeugen. Diese können beispielsweise Peroxide sein, die dann unter Lichteinwirkung zerfallen und ein Initiator-Radikal bilden an dem die Polymerisation gestartet werden kann. Damit lassen sich beispielsweise Polymere auf Basis von Acrylsäure auf einem Polylactid-Substrat herstellen (Schema 6).^[60]

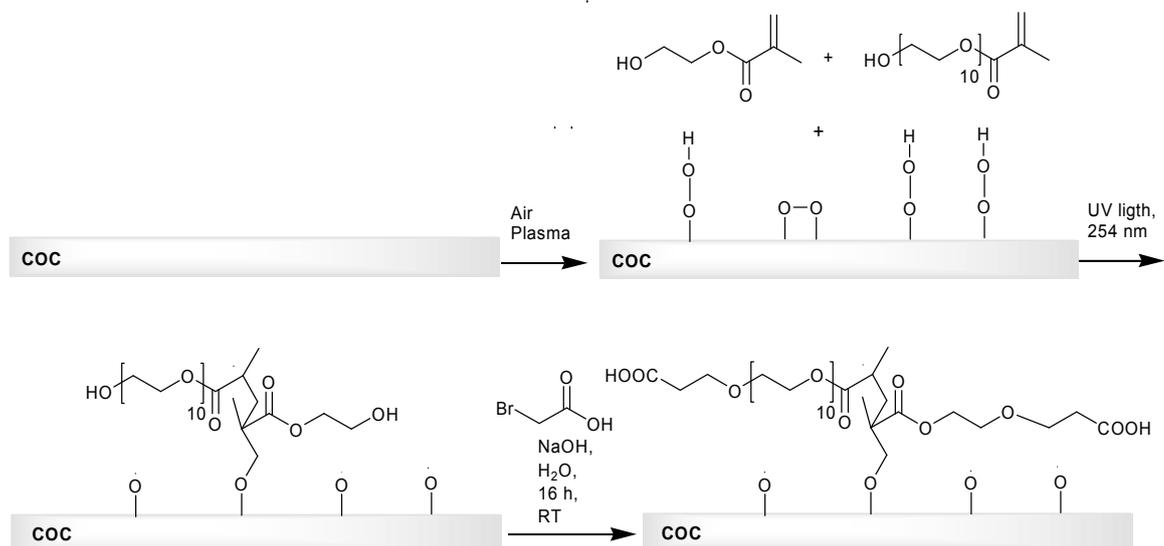


Schema 6: Polymerisation von Acrylsäure an einem durch ein Plasma aktiviertes Poly(D,L-lactid)-Substrat

Durch die Verwendung einer Polymerschicht auf Basis von Acrylsäure wird eine hohe Oberflächenkonzentration der Carbonsäuren erreicht. Aus diesem Grund kann die

Schicht für eine Immobilisation von Molekülen, bei denen eine hohe Bindungskapazität benötigt wird, verwendet werden. In weiteren Versuchen werden verschiedene Proteine nach Aktivierung der COOH-Gruppen durch die EDC/NHS-Methode an die Oberfläche angebunden. Die EDC/NHS-Methode ist ein, im Besonderen in der Biochemie, üblicher Weg, eine COOH-Gruppe in einen reaktiveren NHS-Ester zu überführen. Dazu wird die Carbonsäure zuerst in ein Carbodiimid-Derivat überführt.^[61] Da dieses hydrolyseempfindlich ist, kann durch die Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimid ein stabileres Produkt gebildet werden, welches sich anschließend mit einem Amin (z.B. aus einem Protein) zu einem Amid umsetzen lässt.^[62] In dem vorgestellten Beispiel wird festgestellt, dass auf Grund der hohen Konzentration an COOH-Gruppen, die Proteine auch adsorptiv binden.

Ein Verfahren, ein Netzwerk auf einer Polymeroberfläche herzustellen, wurde von Larsson et al vorgestellt.^[63] Dazu wird eine nicht funktionalisierte Polymerfolie aus zyklischem Olefin-Copolymer (cyclic olefin copolymer (COC)) in einem Luft-Plasma mit funktionellen Gruppen versehen. Nach dieser Aktivierung wird das Substrat mit Wasserstoffperoxid behandelt, dadurch werden weitere Peroxide gebildet. Diese Peroxide werden unter Bestrahlung mit elektromagnetischen Wellen dazu genutzt, ein Netzwerk aus 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und kurzkettigen (10 PEG Einheiten) PEG-MA mit einer Schichtdicke von 100 nm bis 1100 nm zu bilden (Schema 7).



Schema 7: Polymerisation eines Kammpolymers aus HEMA und PEG-MA auf einer plasmaaktivierten Polymeroberfläche

Es werden die beiden Moleküle auf das funktionalisierte Substrat aufgetragen und bestrahlt. Im Ergebnis wird ein engmaschiges Netzwerk auf Ethylenglykol-Basis mit OH-Gruppen erhalten, welches nur eine geringe Adsorption von Proteinen zeigt. In

weiteren Schritten wird beschrieben, dass die OH-Gruppen carboxyliert werden. An die Carbonsäuren wird dann Human-Serum-Albumin (HSA), nach Überführen in einen NHS-Ester, angebunden. An das immobilisierte HSA kann der Antikörper (anti-HSA) anbinden.

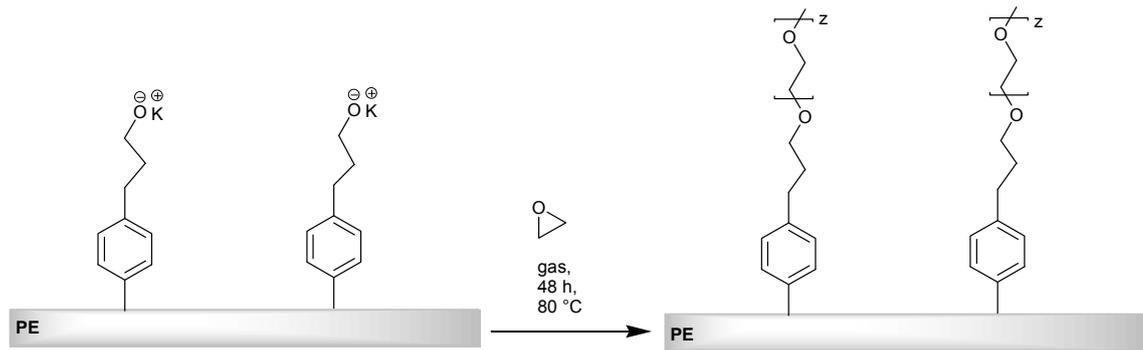
Bei den bisher vorgestellten Verfahren zur Polymerisation ist die Kontrolle der molekularen Struktur des gebildeten Polymers sehr schwierig. Um dies zu verbessern wurden Techniken entwickelt, mit denen eine bessere Kontrolle der molekularen Masse erreicht werden soll. Besondere Bekanntheit haben dabei die „atom transfer radical polymerisation“ (ATRP), die „reversible addition fragmentation chain transfer polymerisation“ (RAFT), die „nitroxid mediated polymerisation“ (NMP), die „ring opening polymerization“ (ROP) und die „ring opening metathesis polymerization“ (ROMP) erlangt. Eine Übersicht über die Methoden wurde von Edmondson et. al. verfasst.^[64] Im Vergleich zu den „grafting to“-Methoden stellen diese Verfahren höhere Ansprüche an die gewählten Reaktionsbedingungen. Besonders bei der anionischen Polymerisation stellt der Ausschluss von Wasser eine hohe Anforderung an die Reaktionsführung.^[65]

Mittels ATRP, einer kontrollierten radikalischen Polymerisation, werden acryl- und methacrylische Monomere über einen bromhaltigen Initiator, meist an einem tertiären Kohlenstoffatom, polymerisiert. Neben dem Initiator werden Kupferbromid und ein Ligandensystem benötigt. In der Regel werden für Oberflächen-ATRP Silizium- und Glassubstrate verwendet. Für ATRP müssen die Lösungen, in denen das Verfahren durchgeführt wird, frei von Sauerstoff sein. Eines der ersten Beispiele (aus dem Jahr 1998) stellt die Polymerisation von Methylmethacrylat auf einem Siliziumsubstrat dar.^[66] Von größerem Interesse für biomedizinische Anwendungen ist die Polymerisation von PEG-dimethacrylaten (PEG-DMA) bzw. PEG-MA, wie sie unter anderem von Baker et. al. auf Goldoberflächen durchgeführt wurde.^[67] Durch die Verwendung von Diacrylaten kommt es zur Vernetzung. Es wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Schichtdickenwachstum und der Zeit festgestellt. Eine schaltbare Oberflächenfunktionalisierung wurde unter anderem von Wischerhoff et. al. auf Goldsubstraten synthetisiert.^[68] Eine definierte Architektur der auf PEG-MA basierenden Kammpolymere erlaubt einen temperaturabhängigen Phasenübergang. Damit ist es möglich auf einer Oberfläche gebundene Zellen bei einer bestimmten Temperatur wieder frei zu geben. Auch Co-Polymere lassen sich auf Goldoberflächen herstellen. Dafür wird die Oberfläche eines Siliziumwafers mit einem bromhaltigen Silan funktionalisiert. An diesem Silan wird im Anschluss ein Kammpolymer aufgebaut.^[69]

Die Verwendung von ATRP, um auf Polymeroberflächen zu polymerisieren, ist in der Literatur im Verhältnis deutlich seltener beschrieben. In einem Beispiel wird Acrylamid auf einen Film eines Polyethylen-Acrylsäure-Copolymers mittels ATRP polymerisiert.^[70] Die Polymerisation von Methylmethacrylat und Styrol auf verschiedenen Cellulosesubstraten wurde von Lindqvist et. al. untersucht.^[71] Die Funktionalisierung einer PP-Oberfläche mittels ATRP ist ebenfalls beschrieben.^[72] Die Bindung des Initiators auf die Oberfläche des chemisch inerten Polymers erfolgte dabei über ein Bromisobutyrat-Derivat des Benzophenons. Benzophenon bildet bei der Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 365 nm ein Biradikal, welches mit den aliphatischen Ketten des Substrates reagiert. Im Ergebnis ist der Initiator gebunden und ein Monomer, wie im Beispiel 2-Dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA), kann über ATRP polymerisiert werden. Zur Bestimmung der molaren Masse des Polymers wird die Polymerisation parallel in Lösung durchgeführt. Dazu wurde die Annahme getroffen, dass die Reaktion auf der Oberfläche mit der gleichen Geschwindigkeit wie in der Lösung erfolgt. Die durch das Polymer funktionalisierte Polymeroberfläche zeigt eine bakterizide Wirkung. Die Polymerisation von Acrylaten auf eine durch Ozon aktivierte Membran aus Polypropylen konnte ebenfalls schon durchgeführt werden.^[73] Die Polymerisation von Styrensulfat mittels ATRP auf der Oberfläche eines Poly(fluortetraethylen)-Films (PTFE-Films) wurde von Liu et. al. demonstriert.^[74] Durch die Behandlung des PTFE-Films mit einem Wasserstoffplasma wurden OH-Gruppen eingeführt. An diesen konnte der Initiator 2-Bromisobutyrylbromid gebunden werden, von dem aus die Polymerisation erfolgte.

Eine weitere Möglichkeit Monomere zu Polymeren auf Oberflächen aufzubauen ist die Verwendung von RAFT. RAFT ist, wie ATRP, eine kontrollierte radikalische Polymerisation.^[75] Eine Übersicht über die RAFT-Technik ist in Ref. [76] zu finden. Mittels oberflächeninduzierter RAFT sind Polymere auf Basis von Styrol, Methylmethacrylat und N,N-Dimethylacrylamid auf Siliziumoberflächen beschrieben.^[75] Zur Analyse der molekularen Masse wurden die Polymere durch Flusssäure von der Oberfläche abgelöst und mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) analysiert.

Von großem Interesse, auch für die Funktionalisierung von Polymeroberflächen für biologische Anwendungen, ist die Ring-Öffnungs-Polymerisation (ROP). Diese beruht darauf, dass durch einen ionischen Initiator, welcher auf einer Oberfläche gebunden ist, das Kettenwachstum gestartet wird. Ein Beispiel, welches speziell für biomedizinische Anwendungen bedeutsam ist, ist die Polymerisation von Ethylenoxid auf einer Goldoberfläche. Dazu wurde als thiofunktionalisierter Initiator als Monolage gebunden.^[58]



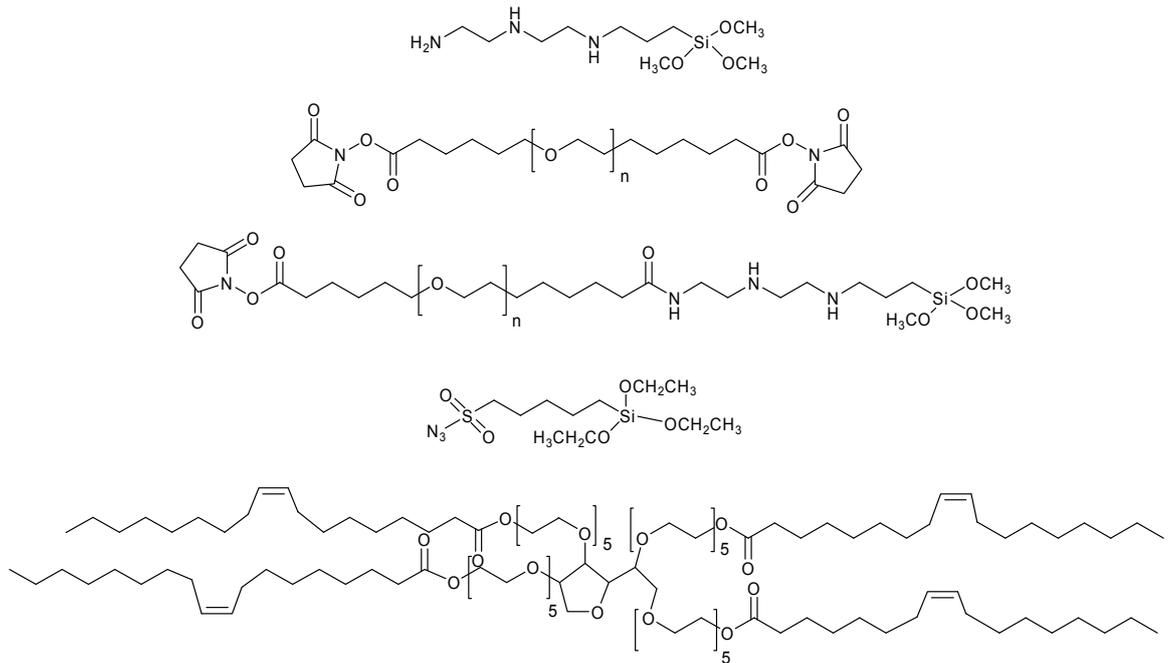
Schema 8: Anionische Polymerisation von Oxiran an einer Oberfläche aus der Gasphase

Von diesem Initiator aus kann, unter basischen Bedingungen (durch Zugabe von Phosphazan-Base), die Polymerisation von Ethylenoxid zu einer PEG-Kette durchgeführt werden. Ethylenoxid wird dazu gasförmig in die Apparatur eingeleitet. Es wird beschrieben, dass bei der Durchführung der Reaktion in einer Lösung die Nebenreaktion in der flüssigen Phase schneller ablaufen würde als die Reaktion an der Oberfläche. Die Reaktionszeit für die Synthese einer 6 nm dicken PEG-Schicht liegt bei einer Temperatur 40°C bei 8 Tagen. Die Polymerisation von Ethylenoxid wurde auch auf Polyethylenpartikeln durchgeführt.^[77] Die Reaktionszeiten liegen hierbei ebenfalls im Bereich von Tagen (Schema 8). Die im oberen Teil beschriebenen Verfahren führen theoretisch zu definierteren Strukturen. Diese Verfahren stellen jedoch hohe Anforderungen an die Reaktionsführung und sind eine Herausforderung für eine technische Realisierung zur Funktionalisierung von Oberflächen.

2.1.4 Dünne Filme durch Polykondensation auf Oberflächen

Eine weitere Klasse können die Kondensationsreaktionen auf Oberflächen, die auch den „grafting to“-Verfahren zugeordnet werden, bilden. Den Übergang in diese Klasse stellen Beschichtungen mit Silan-Monolagen dar. Durch Kondensationsreaktionen können auch Netzwerke gebildet werden, die über eine Kopplung einer Monolage zur Funktionalisierung hinaus gehen.

Ein auf Polykondensation bestehendes Verfahren, Netzwerke auf Oberflächen für biologische Anwendungen herzustellen wurde von Harbers et. al. präsentiert.^[78]



Schema 9: Bildung eines Netzwerkes basierend auf Silanen nach Harbers et. al. (Ref. [78])

Dazu wird eine Mischung der in Schema 9 dargestellten Komponenten in DMSO gelöst und mittels Schleuderbeschichtung auf die Oberfläche aufgetragen. Die Netzwerkbildung erfolgt über einen Zeitraum von 75 min und bei Temperaturen zwischen 75 – 100 °C. Die Dicke der damit hergestellten Schichten wurde mit 20 nm angegeben. Die Rauigkeit beträgt, ermittelt mit AFM, weniger als 1 nm. Die Dicke der Schichten im gequollenen Zustand (in Wasser) wurde mit 50 nm – 100 nm angegeben.

2.2 Analytik von Oberflächen und dünnen Schichten

2.2.1 Allgemeiner Überblick

Die Methoden, welche auf ein oberflächenanalytisches Problem angewendet werden können, sind von der Art des Substrates und von der Dicke der zu untersuchenden Schicht abhängig. In der folgenden Tabelle sollen für ausgewählte Methoden der Oberflächenanalytik die Anforderungen an die Substrate, die Messgröße und die daraus ableitbaren Informationen dargestellt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Überblick über zu gewinnende analytische Informationen mit gängigen Methoden der Oberflächenanalytik*

Methoden	Substrate	Analysentiefe	Messgröße	Interpretation
XPS	unabhängig	1 nm - 10 nm	kinetische Energie der emittierten Elektronen	Verhältnisse der Elemente und Bindungszustände
SIMS	unabhängig	1 nm	Masse von Molekül-fragmenten	Strukturelemente
Ellipsometrie	reflektierend, transparent (Glas, Au, Si/SiO ₂)	durchstrahlt	Veränderung der optischen Parameter in einer Schicht	Schichtdicke und/oder Brechungsindex einer Schicht
REM	elektrisch leitende Substrate	0,5 nm (abhängig von Energie der Primärelektronen)	emittierte Sekundärelektronen	Morphologie
AFM	unabhängig		Wechselwirkungen mit Oberfläche	Morphologie, Moduli, Wechselwirkung mit der Spitze oder Platte

Ein Überblick über Methoden zur Analytik von Oberflächen und dünnen Schichten, im Zusammenhang mit biomedizinischen Anwendungen, ist in einem Übersichtsartikel von Merrett et. al. dargestellt.^[79]

Einige Methoden erlauben die chemische Charakterisierung, d.h. sie dienen zum Nachweis von Elementen und/oder verschiedenen Verbindungen. Zu dieser Klasse zählen unter anderem die Röntgenphotoelektronenspektroskopie^[80], Methoden der IR-Spektroskopie (IR)^[81,82,83] oder der Sekundär-Ionen-Massenspektrometrie (SIMS).^[84] Die Charakterisierung der optischen Eigenschaften lässt sich beispielsweise mittels Ellipsometrie erreichen.^[85] Die Rasterelektronenmikroskopie (REM), eine Methode, bei der durch Bestrahlung des Materials mit einem Elektronenstrahl sekundäre Elektronen emittiert und genutzt werden, um ein Abbild der Oberfläche zu erzeugen, ist geeignet, um die Morphologie einer Oberfläche bzw. einer Schicht zu untersuchen. Dies ist ebenfalls mit Atom-Kraft-Mikroskopie möglich. Das Prinzip besteht darin, dass Kräfte zwischen einer Oberfläche und einer Spitze, Platte oder Kugel, welche auf einem Cantilever fixiert ist, gemessen werden. Dieses Kraftprofil wird in ein Abbild der Oberfläche übersetzt oder kann ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung mit einem

* in Anlehnung an B. D. Ratner, B. J. Tyler, A. Chilkoti, *Clinical Materials*, 13, 1993, 71-84

Objekt sein. Die geometrische Präzision des auf dem Cantilever befestigten Objektes entscheidet unter anderem über die Auflösung der Aufnahme.

Die meisten Verfahren zur chemischen Analyse basieren darauf, dass entweder eine Emission von Teilchen angeregt wird, die dann analysiert werden, oder dass die Schwächung der Intensität einer elektromagnetischen Welle gemessen wird .

Speziell in der Analytik von funktionalisierten Polymersubstraten gibt es Besonderheiten, die beachtet werden sollten (Abbildung 2).

Dünne organische Schichten auf organischen Polymermaterialien unterscheiden sich auf atomarer Ebene nur wenig vom Grundmaterial, da sowohl die Schicht und das Substrat aus Kohlenstoffverbindungen besteht. Zudem ist die äußere Zone eines Materials aus nur 10^{14} Atomen pro cm^2 aufgebaut.^[82] Die Analyse von funktionellen Gruppen bzw. dünnen Schichten auf Polymersubstraten findet demzufolge mit einem „Hintergrund“ statt, der um ein Vielfaches größer als die zu analysierende Schicht ist.

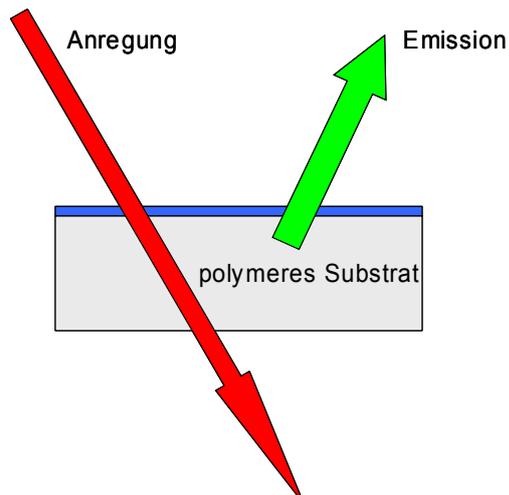


Abbildung 2: Schema der Analytik einer dünnen Schicht auf einem polymeren Substratmaterial (nicht maßstabsgerecht)

Aus diesem Grund finden oberflächensensitive Methoden, wie zum Beispiel SIMS und XPS, Anwendung.

2.2.2 XPS – Analyse organischer Oberflächen und Schichten

Eine erste Arbeit, welche XPS als analytisches Werkzeug in Aussicht stellt, ist eine Publikation von Steinhardt et. al. mit dem Titel: „X-ray photoelectron spectrometer for chemical analysis“ aus dem Jahr 1951.^[86] Die weitere Entwicklung wurde unter

anderem von Siegbahn et. al. voran getrieben, welcher als der Vater der kommerziellen XPS gilt.^[87] XPS selbst wurde in den Anfängen bevorzugt zur Analyse der Zusammensetzung von anorganischer Materie genutzt. In einer der ersten Veröffentlichungen wurde in der Zeitschrift Physical Review ein Photoelektronenspektrum von Kupfer präsentiert.^[88] Die Entwicklung vom photoelektrischen Effekt (Hertz 1887) bis zu den Anfängen der Anwendung von XPS wurde von Jenkin et. al. zusammengestellt.^[89] Ursprünglich war XPS nicht für die Analyse von Oberflächen gedacht. Das Prinzip, und die damit verbundene geringe Informationstiefe, hat XPS gerade für eine Anwendung in der Oberflächenanalytik interessant gemacht.

Der Beginn der systematischen Untersuchung der elektronischen Struktur von organischen Molekülen und Polymeroberflächen mittels XPS geht auf die Jahre 1971/1972 zurück. Clark et. al. beschreibt unter anderem die Elektronenspektren von verschiedenen Benzenderivaten^[90], stickstoffhaltigen Heterozyklen^[91] und beschäftigt sich mit der Analyse von Copolymeren^[92]. Ebenfalls von Clark wurden weitere vertiefte, auch theoretische, Untersuchungen zu Verwendung von XPS zur Analyse organischer Materie durchgeführt.^[93] Die Aufladung nicht leitender Proben war dabei ein Problem, welches gelöst werden musste. Weitere Verbesserungen der Technologie, speziell der Verhinderung der Aufladung der Proben und die Erhöhung der energetischen Auflösung, erlaubten das Studium komplexerer Materialien. Eine erste zusammenfassende Arbeit zur Analyse von Materialien für biomedizinische Anwendungen erschienen 1986.^[94]

Das Prinzip von XPS besteht darin, dass eine Probe mit Röntgenstrahlung bestrahlt wird und dabei Elektronen emittiert werden. Die kinetische Energie der Elektronen wird gemessen.

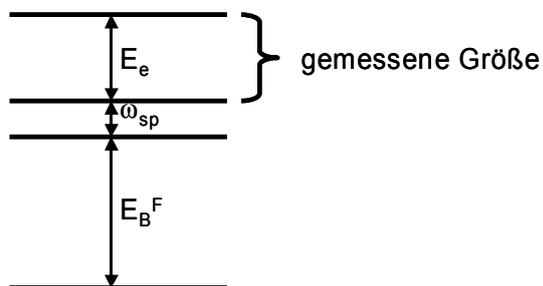


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips von XPS

Aus der Berechnung der Bindungsenergie (Gleichung 1) lässt sich das jeweilige Element zu ordnen.^[94]

$$E_b^F = h \cdot \nu - E_e + \omega_{sp} \quad (1)$$

E_b^F ist die Energie, die benötigt wird um Elektronen aus dem Material austreten zu lassen, welche der Bindungsenergie entspricht. Die Energie der Röntgenstrahlung wird durch den Term $h \cdot \nu$ repräsentiert und ist durch die Art der Röntgenanode, meist Magnesium oder Aluminium, vorgegeben. E_e ist die durch einen Analysator gemessene kinetische Energie der Elektronen. Die Arbeitsfunktion des Spektrometers ω_{sp} berücksichtigt Messunterschiede, die sich durch verschiedene Gerätetypen ergeben.

In XPS-Spektren lassen sich in Abhängigkeit des Elements s-, p-, d- und f-Elektronen den Messsignalen zuordnen. Die unterschiedlichen Hauptniveaus der Elektronen sind, in Abhängigkeit des jeweiligen Elementes, ebenfalls zu erkennen. Die für die kovalente Bindung verantwortlichen Valenzelektronen zeigen in den Spektren ein Signal. Dieses enthält keine Detailinformation über den Aufbau, jedoch kann über die Valenzelektronen zwischen verschiedenen Materialien unterschieden werden. Befindet sich an einem betrachteten Element ein Bindungspartner mit einer anderen Elektronegativität, kommt es zu einer Polarisierung der Bindung. Die Polarisierung hat auch einen Einfluss auf die Bindungsenergie der Elektronen in kernnahen Orbitalen.^[95] Dieser zeigt sich in einer anderen Bindungsenergie der Elektronen im Vergleich zu einem Element mit gleichem Bindungspartner. Der Einfluss eines elektronegativeren Bindungspartners lässt sich auch über mehrere Atome hinweg feststellen. Dann wird von Sekundär- und Tertiäreffekten gesprochen. Aber nicht nur der Bindungspartner selbst, sondern auch die Anzahl an Bindungen die zu ihm ausgebildet werden, beeinflusst die Bindungsenergie der Elektronen. Zur Untersuchung des Einflusses der Bindungspartner auf die Bindungsenergie der Elektronen in betrachteten Atomen werden hochaufgelöste Spektren aufgenommen. In der Nomenklatur wird dazu das Element und das betrachtete Orbital genannt, z.B. C 1s oder S 2p.

Während der Messung von nicht leitenden Substraten kommt es durch die Emission der Elektronen zur Aufladung der Probe. Diese wird zum Beispiel durch thermische Elektronen überkompensiert. Die real gemessene kinetische Energie, ist von verschiedenen Faktoren beeinflusst (u.a. durch die Neutralisation) und unterscheidet sich leicht von Messung zu Messung. Aus diesem Grund müssen die Spektren auf einen Referenzwert verschoben werden. In organischen Materialien wird die Bindungsenergie der 1s Elektronen aus den Kohlenstoffatomen, welche nur Bindungen zu anderen Kohlenstoffatomen oder Wasserstoff ausbilden auf 285 eV festgelegt.^[95] Bei organischen Materialien, welche keine von Bindungspartnern unbeeinflusste Kohlenstoffatome enthalten, werden dann entsprechend andere

Bindungsenergien als Referenzwert verwendet. Ist anstelle des Kohlenstoffes ein anderes Atom gebunden, wie zum Beispiel Stickstoff, liegt die Bindungsenergie der Elektronen um 0,56 eV bis 1,41 eV über der Bindungsenergie der Elektronen in Kohlenstoff-Kohlenstoff oder Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen.^[95] Die Differenz der Bindungsenergie wird als chemische Verschiebung bezeichnet (Tabelle 2).

In anderen Elementen lässt sich der Einfluss des Bindungspartners auf die Bindungsenergie der Elektronen in einem betrachteten Orbital eines Atoms ebenfalls beobachten. In beispielsweise hochaufgelösten N1s Spektren liegt die Bindungsenergie der Elektronen von Stickstoff in Aminen und Amiden bei 399,0 eV bis 400,0 eV und im protonierten Ammonium-Stickstoff bei ca. 401,5 eV.^[95]

Die Auswertung erfolgt durch Integration der Flächen unter den aufgenommenen Bindungsenergie–Intensitätsverläufen. In der Elementaranalyse können die Daten, unter Berücksichtigung der Transmissionsfunktion und der unterschiedlichen Empfindlichkeit für die Elemente, entnommen werden. Die Auswertung der hochaufgelösten Spektren ist aufwendiger. Durch das Spektrum wird das Verhältnis von Elektronen aus den betrachteten Orbitalen verschiedener Atome mit unterschiedlichen Bindungspartnern oder einer unterschiedlichen Anzahl an Bindungen zu einem anderen Bindungspartner repräsentiert.

Tabelle 2: Chemische Verschiebung von Komponenten im C1s-Spektrum (angelehnt an Lit. [95])

Komponente	Bindungsenergie [eV]	Chemische Verschiebung [eV]	Δ Elektronegativität
C-C	285	0	0
C-N	285,56 - 286,41	1,41	0,5
C-O-C	286,13 - 286,75	1,13 - 1,75	1
C-OH	286,47 - 1,73	1,47 - 1,73	1
Epoxide	287,02	2,02	1
C=O	287,81 - 287,97	2,81 - 2,97	
CONH	287,97 - 288,59	2,97 - 3,59	
COOR	288,64 - 289,23	3,64 - 4,23	
COOH	289,18 - 289,33	4,18 - 4,33	
CF ₃	292,65 - 292,72	7,65 - 7,69	1,5

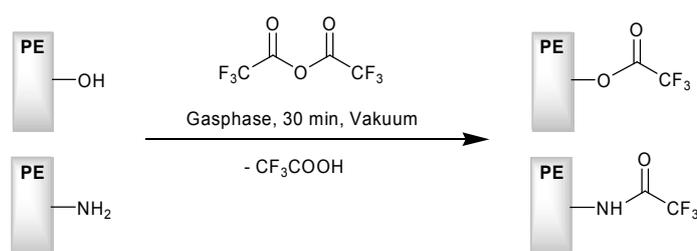
Zur Auswertung wird ein Modell aufgebaut, welches auf einer angenommenen Stöchiometrie basiert. In der Auswertung wird die angenommene Zusammensetzung den experimentellen Werten angepasst. Dabei wird das Spektrum eines betrachteten Elements durch ein Modell, basierend auf Verteilungsfunktionen (z.B. Gaußfunktionen), beschrieben. Im weiteren werden die Kurven als Komponenten bezeichnet. Ist die Stöchiometrie durch die chemische Struktur vorgegeben, können in dem Modell

weitere Information fest definiert werden. So ist beispielsweise in einem Ester immer eine Komponente vertreten, welche die Elektronen aus dem Kohlenstoff des Esters selbst repräsentiert. Jeder Ester hat einen „Alkohol-Teil“, welcher mit dem Kohlenstoff des Esters im Verhältnis 1:1 vorliegt. In gleicher Weise kann dies auch mit anderen Strukturelementen geschehen, wenn die Verhältnisse zwischen den Komponenten durch die chemische Verbindung selbst vorgegeben sind.

Die Informationstiefe ist von der freien Weglänge der emittierten Elektronen im Material abhängig.^[96,97] Genauere Untersuchungen der freien Weglänge von Elektronen in organischen Materialien wurden von Tanuma et. al. durchgeführt.^[98] Für Polyethylen hoher Dichte (PE-HD) liegt sie zwischen 7 nm bis 10 nm.^[99]

Mittels XPS wird ein Volumenelement, dessen Größe durch die freie Weglänge der Elektronen im Material und die Fokussierung der austretenden Elektronen bestimmt wird, analysiert.

Ist die Konzentration einer funktionellen Gruppe sehr niedrig oder die entsprechende Komponente wenig isoliert können chemische Derivatisierungen vorgenommen werden. Mit ihnen wird über selektive, möglichst schnell und vollständig ablaufende Reaktionen eine funktionelle Gruppe durch ein bisher nicht vorhandenes Element markiert oder Substanzen angebunden, welche sich durch eine gut separierte Komponente in den hochauflösenden Spektren beschreiben lassen. Eine Übersicht über verschiedene Derivatisierungsreaktionen ist in Ref. [100] zu finden. Ein Beispiel der Derivatisierung von OH-Gruppen ist die Reaktion mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA).^[101]



Schema 10: Markierung von funktionellen Gruppen mit Trifluoressigsäureanhydrid

Durch die Bildung eines Esters und einer Komponente, welche die CF₃-Gruppe repräsentiert, kann zwischen Ether, welche ebenfalls eine Bindung zwischen Kohlenstoff und Sauerstoff aufweisen, und OH-Gruppen unterschieden werden. Neben der Reaktion mit OH-Gruppen werden auch Amine markiert. Bei allen Derivatisierungsreaktionen müssen Nebenreaktionen und der Umsatzgrad beachtet werden.

2.2.3 Fluoreszenzmarkierung an Polymeroberflächen

Ein weiteres Verfahren, welches auch auf Derivatisierungsreaktionen beruht, ist die Fluoreszenzmarkierung. Mit ihr lässt sich die Empfindlichkeit des Nachweises von funktionellen Gruppen an Oberflächen oder in dünnen Schichten erhöhen. Im Gegensatz zu XPS wird durch Fluoreszenzmarkierung eine Flächenkonzentration, anstelle einer Volumenkonzentration bestimmt. Das Material wird durchstrahlt und die Messinformation stammt aus dem gesamten durchstrahlten Bereich.

Das Prinzip der Fluoreszenzmarkierung besteht darin, an eine funktionelle Gruppe einen fluoreszierenden Farbstoff zu binden und dessen Fluoreszenzintensität und Emissionsmaximum zu bestimmen. Die Verwendung von Techniken der Fluoreszenzmarkierung bedarf allerdings weiterer vertiefter Überlegungen. Nach Ivanov et. al. ergeben sich folgende Fragen^[27]:

- Wie dick ist die analysierte Schicht?
- Wie tief dringen die Farbstoffmoleküle in die Schicht ein?
- Wie groß ist der Unterschied des Fluoreszenzverhaltens zwischen einem Farbstoff in Lösung und an einer Oberfläche?
- Gibt es Wechselwirkungen zwischen den Farbstoffmolekülen?
- Welche Nebenreaktionen müssen in Betracht gezogen werden?
- Wie hoch sind die Ausbeuten und Umsätze der Kopplungsreaktionen?

Einige dieser Fragen wurden von Ivanov et. al. beantwortet. Dazu wurde ein Plasmapolymer aus Acrylsäure hergestellt. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität linear mit der Schichtdicke ansteigt. Daraus wurde geschlossen, dass der Farbstoff (Dansylcadaverin) in 20 Stunden mindestens 150 nm tief in das stark vernetzte Plasmapolymer eindringt.

In ersten Versuchen zur Fluoreszenzmarkierung an Polymeroberflächen wurde die Konzentration von Carbonsäuren auf einem mit Chromsäure behandelten Polyethylensubstrat bestimmt. Dazu fanden Cumarin-Farbstoffe Verwendung.^[14] Die Konzentration der Carbonsäuren wurde mit maximal $2 \cdot 10^{15}$ Gruppen cm^{-2} ($3321 \text{ pmol cm}^{-2}$) bestimmt. Damit stellen 60 % aller detektierten funktionellen Gruppen COOH-Gruppen dar. Die Markierung von verschiedenen Derivaten von Carbonsäuren an einem oxidierten PE-Substrat mit Dansyl-Farbstoffen wurde von Rasmussen et. al. vorgestellt.^[102] Die Fluoreszenzeigenschaften von Dansylfarbstoffen, unter anderem von Derivaten des Farbstoffes Dansylcadaverin, an Oberflächen wurden vertieft in Lit. [103] untersucht. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenzeigenschaften in Wasser und gebunden an einer Oberfläche vom pH-Wert abhängig sind. Dies betrifft die Intensität und die Position des Emissionsmaximums. Unterhalb von pH 2 tritt Quenching auf.

Dies wird auf die Protonierung des sekundären Amines im Dansylmolekül zurückgeführt. Die Veränderung der Intensität oberhalb eines pH-Wertes von 5 ist sehr gering. Die Konzentration der Dansylderivate auf einer mit Chromsäure oxidierten PE-Oberfläche wurde mit $6 \cdot 10^{14}$ Gruppen cm^{-2} (996 pmol cm^{-2}) bestimmt. Es ergibt sich laut Randall et. al. eine Konzentration von Dansylderivaten von 1,7 Gruppen pro nm^2 . Daraus lässt sich der mittlere Abstand der Gruppen auf der Oberfläche mit 1,3 nm angeben. Diese hohe Dichte an Farbstoffmolekülen kann demnach zu Energieübertragungsprozessen führen.

Auch Ivanov et. al. beschäftigte sich mit der Analyse von verschiedenen funktionellen Gruppen auf Chromsäure- bzw. plasmaoxidierten PE-Substraten.^[27] Für mit Chromsäure oxidierte PE-Oberflächen wurde die Konzentration der COOH-Gruppen mit $4100 \text{ pmol cm}^{-2}$ und für eine mit einem Sauerstoffplasma oxidierte Oberfläche mit $1,5 \text{ pmol cm}^{-2}$ angegeben (Tabelle 3). Die hohen Werte für die Konzentration der funktionellen Gruppen nach der Oxidation mit Chromsäure können darauf hindeuten, dass es durch die Chromsäurebehandlung zu einer stärkeren Zerstörung der Materialoberfläche kommt. Dadurch wird nicht nur die obere Schicht markiert. Es werden auch funktionelle Gruppen markiert die sich tiefer im Material befinden. Diese Beobachtung stützt sich ebenfalls auf die von Randall beschriebene visuell wahrnehmbare grüne Färbung der mit Chromsäure oxidierten Filme nach Markierung mit dem Farbstoff.^[103] Das verwendete Verfahren der Aktivierung der Oberflächen in einem Sauerstoffplasma scheint die Morphologie der Oberfläche, unter geeigneten Bedingungen, wesentlich weniger zu verändern. Dies lässt sich auch daran erkennen, dass der Anteil der Carbonsäuren an den funktionellen Gruppen wesentlich kleiner ist. Durch die Bildung von Carbonsäuren werden die Makromoleküle gespalten.

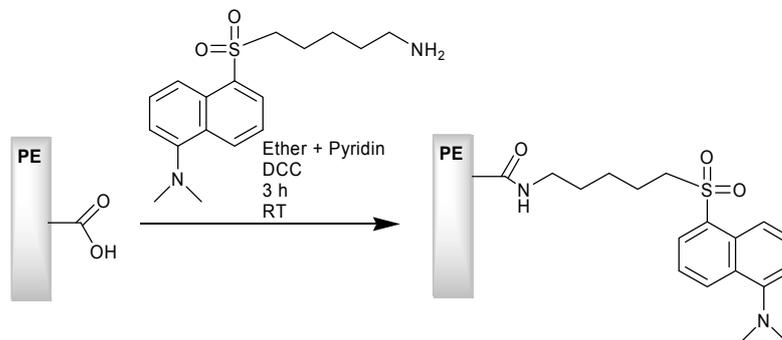


Abbildung 4: Markierung von Carbonsäuren auf PE mittels Dansylcadaverin

Die Carbonsäuren wurden mit Dansylcadaverin, unter Bildung eines Amids, umgesetzt. Dazu wurde die COOH-Gruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in einen aktivierten Ester überführt. Es zeigt sich, dass ein quantitativer Umsatz erreicht wird. Es wurde

ebenfalls die Konzentration von Keto- und Hydroxy-Gruppen, nach Markierung mit Dansylchlorid bzw. Dansylhydrazin, bestimmt. Eine weitere Möglichkeit COOH-Gruppen fluoreszenzspektroskopisch zu detektieren ist die Markierung mit o-Toluidine.^[60]

Tabelle 3: Bestimmung der Konzentration verschiedener Spezies mittels Fluoreszenzmarkierung (Ref. [27])

Behandlung	c_{OH} [$\mu\text{mol cm}^{-2}$]	$c_{\text{C=O}}$ [$\mu\text{mol cm}^{-2}$]	c_{COOH} [$\mu\text{mol cm}^{-2}$]	c_{Summe} [$\mu\text{mol cm}^{-2}$]
O ₂ -Plasma (5 s)	4.6	66	<1.5	71
O ₂ -Plasma (10 s)	7.9	51	<1.5	59
O ₂ -Plasma (60 s)	11	44	1.7	57
K ₂ Cr ₂ O ₇ /H ₂ SO ₄ (5 min; 60°C)	33	40	4100	4200

(weitere Plasmaparameter: Leistung: 50 W; Druck = 0.1 mbar)

Die Größenordnung der Werte für die Konzentration von COOH-Gruppen aus vorhergehenden Messungen (Ref.[14]), an mit Chromsäure behandelten Substraten, konnten durch Ivanov et. al. bestätigt werden.

Besonders für biomedizinische Applikationen ist die Bestimmung der Konzentration von Aminogruppen auf Oberflächen von Interesse. Der Nachweis von primären Aminogruppen durch Fluoreszenzmarkierung mit Fluorescamin in einer APTES-Schicht auf Glasoberflächen wurde von Wilson et. al. beschrieben.^[104] Die Markierung von primären Aminen auf Polymeroberflächen mittels Fluorescamin ist in Ref. [27] dargestellt. Fluorescamin^[105], ein Acetal, reagiert mit sekundären Aminen und anderen nucleophilen Gruppen, bildet aber nur mit primären Aminen ein stark fluoreszierendes Pyrrolinon-Derivat.^[106,107,108,109] Fluorescamin hydrolysiert in Wasser zu nicht fluoreszierenden Verbindungen.^[110]

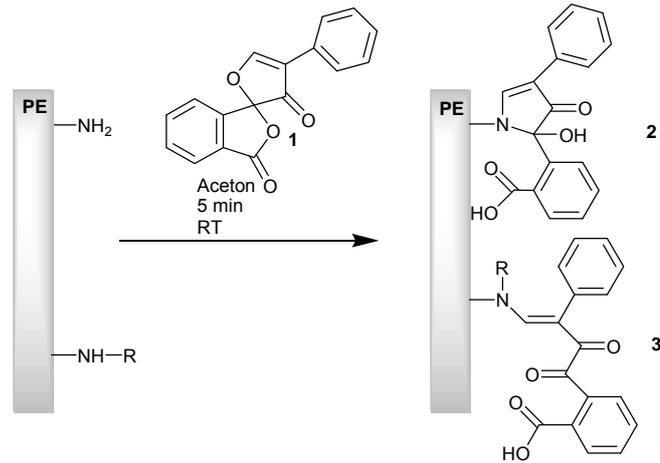


Abbildung 5: Reaktion von Fluorescamin (Fluram) (1) zur einem Pyrrolidon-Derivat (2) und einem Diketon (3) – nur Produkt 2 ist fluoreszent (Ref. [109])

Das macht den Farbstoff besonders für die Markierung von primären Aminen an Oberflächen interessant. Die Dichte der primären Amine beeinflusst das Fluoreszenzverhalten der Reaktionsprodukte auf der Oberfläche ebenfalls. Sanford et. al. stellt mit steigender Konzentration der Aminogruppen und nach Markierung mit Fluorescamin eine Verschiebung der Emission (in einem Fluoreszenzmikroskop) von grün nach gelb fest.^[53] In unabhängigen Untersuchungen wird ebenfalls eine Rotverschiebung der Emissionsbande mit der Zunahme der Oberflächenkonzentration und der lokalen Dichte an primären Aminen festgestellt.^[37]

Neben einzelnen funktionellen Gruppen können ganze Atomgruppen bzw. Molekülabschnitte markiert werden. Dabei handelt es sich um keine kovalente Bindung, sondern um eine physikalische Wechselwirkung. So ist die Erkennung von Glykanresten auf Oberflächen über fluoreszenzmarkierte Lektine möglich.^[111] Die Interaktion von Biotin und dem Protein (Strept)avidin findet ebenfalls zur Markierung Verwendung.^[112] Das Streptavidin kann vier Biotin-Moleküle über Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen binden.^[113]

Wie anfangs erwähnt wird mittels Fluoreszenzspektroskopie eine Flächenkonzentration bestimmt. Ist es möglich, die Dicke der Schicht zu messen, in der funktionelle Gruppen markiert wurden, kann mit der folgenden Formel (Gleichung 2) die Flächenkonzentration in eine Volumenkonzentration umgerechnet werden.

$$c_V = \frac{c_A}{d} \quad (2)$$

Zur Umrechnung der Flächenkonzentration c_A in eine Volumenkonzentration c_V wird die Flächenkonzentration durch die Schichtdicke dividiert. Zur Messung der Schichtdicke

eines Polymers auf einer Oberfläche kann beispielsweise die Ellipsometrie eingesetzt werden.

2.2.4 Messung der Schichtdicke mittels Ellipsometrie

Die Bestimmung der Dicke einer Schicht aus organischem Material auf einem organischen Substrat stellt eine Herausforderung dar. Beispielsweise wird für die Verwendung von AFM zur Dickenmessung eine scharfe Kante benötigt, welche sehr oft bei organischen Schichten nicht vorhanden ist. Eine weitere Möglichkeit sind REM-Aufnahmen an einer Bruchkante. Diese setzen voraus, dass die zu untersuchende Schicht glatt durchbricht.

Ein lichtbasiertes Verfahren zur Messung der Schichtdicke ist die Ellipsometrie. Ausführlich wird die spektroskopische Ellipsometrie in Ref. [85] behandelt. Das Prinzip (Gleichung 3) der Ellipsometrie besteht darin, dass sich die Amplitude der s- und p-Komponente einer elektromagnetischen Welle beim Durchgang durch eine Schicht auf einem reflektierenden Substrat verändert.

$$\rho \equiv \tan \psi \exp(i\Delta) \equiv \frac{r_p}{r_s} \equiv \left(\frac{E_{rp}}{E_{ip}} \right) \Bigg/ \left(\frac{E_{rs}}{E_{is}} \right) \quad (3)$$

Die Größen Ψ und Δ repräsentieren das Verhältnis der Intensitäten (r_x/r_x) der s und p Komponente einer elektromagnetischen Welle nach der Reflexion auf einer Substratoberfläche. Für organische Schichten werden als Substrate häufig Siliziumwafer^[114] oder mit Gold bedampfte Objektträger^[115] verwendet. Delta (Δ) ist ein Ausdruck für die Phasenverschiebung (Gleichung 4) der beiden Komponenten der elektromagnetischen Welle nach dem Durchgang durch eine Schicht.

$$\tan \psi = \frac{|r_p|}{|r_s|}; \quad \Delta = \delta_{rp} - \delta_{rs} \quad (4)$$

Die Veränderung der ellipsometrischen Parameter kann in ein Koordinatensystem übertragen werden. Dies führt zur Einführung von Jones- bzw. Stokes-Vektoren, mit denen sich verschiedene Polarisationszustände beschreiben lassen. Jeder Polarisationszustand der elektromagnetischen Welle an einem der Bauteile eines Ellipsometers wird durch eine Matrix dargestellt. Die Einführung von Matrizen (Müller bzw. Jones) wird benötigt, um den rechnerischen Aufwand für die Auswertung und Durchführung der Messung zu verringern. Aus den Matrizen werden anschließend wieder die ellipsometrischen Parameter in Abhängigkeit von der Wellenlänge erhalten. Die ellipsometrischen Parameter Ψ und Δ sind von der Wellenlänge des Lichtes

abhängig, welche bei der spektroskopischen Ellipsometrie variiert wird. Diese Abhängigkeit wird anschließend mit einem optischen Schichtmodell beschrieben. Das Modell wird an die Experimentaldaten angenähert, wie es unter anderem in Lit. [116] beschrieben ist. Somit lässt sich mit Ellipsometrie die Dicke von organischen Filmen bestimmen.

Hinrichs et. al. untersuchte ein Zweischichtsystem eines Filmes von Polyvinylchlorid (PVC) und Poly(n-butylmethacrylat) (PnBMA) auf einer Goldoberfläche. Es können Aussagen über die Dicke jeder Schicht aus einem Zweischichtmodell abgeleitet werden.^[115] Zur Bestimmung der Schichtdicke wird der Brechungsindex vorgegeben. Die optische Dispersion, die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Wellenlänge, wird über die Cauchy-Parameterisierung^[117] modelliert.

$$\eta = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad (5)$$

Die Verwendung der Cauchy-Parameterisierung setzt die Verwendung eines optisch transparenten, nicht absorbierenden Filmes voraus. Die Dicke von PEG-Filmen auf verschiedenen Substratoberflächen wurde mittels Ellipsometrie bestimmt. Für diese Schichten wird für die Cauchy-Faktoren häufig ein Wert von 1,45 für A und 0,01 für B angenommen.^[48,118] Wird nur bei einer Wellenlänge gemessen, z.B. 632,8 nm, wird dem Modell ein Brechungsindex von 1,46 vorgegeben.^[119] Bilen et. al. hat den Brechungsindex von PEG-Schichten auf einem goldbeschichteten Substrat in Abhängigkeit der Luftfeuchtigkeit untersucht.^[120] Dafür wurden die Schichten mit Luft unterschiedlicher Feuchtigkeit in Kontakt gebracht und der Brechungsindex bei einer Wellenlänge von 632,8 nm gemessen. Es zeigt sich, dass sich der Brechungsindex bis zu einer Luftfeuchtigkeit von 16 % nur wenig verändert. In einem Bereich von 16 % bis 79 % relative Luftfeuchtigkeit sinkt der Wert von 1,4549 auf 1,4298 ab. Oberhalb von 80 % relativer Luftfeuchtigkeit kommt es zu einer weiteren Verringerung auf 1,4125. Es wird darauf geschlossen, dass im Bereich um 80% Luftfeuchtigkeit ein Phasenübergang von kristallin zu amorph stattfindet.

In anderen Untersuchungen wurde gezeigt, dass der Brechungsindex von organischem Material nur wenig die modellierte Schichtdicke einer Probe beeinflusst. Tillmann et. al. hat mit einer Erhöhung des Brechungsindex im Modell um einen Wert von 0,05 eine Abnahme der Schichtdicke von 0,1 nm berechnet.^[121] Porter et. al. hat eine Veränderung der Dicke von 0,14 nm festgestellt.^[122] Für organisches Material wird in der Regel ein Wert für den Brechungsindex um 1,5 angenommen.^[79]

3 Geräte, Apparaturen und experimentelle Durchführung

3.1 Messmethoden und Messparameter

3.1.1 Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie

Die XPS-Messungen wurden mit einem Spektrometer der Firma Kratos vom Typ AXIS 165 (Kratos Ltd., Manchester, UK) durchgeführt. Es wurde im Hybrid-Mode gemessen, d.h. mit elektrostatischen und magnetischen Linsen. Die Kompensation der Aufladung der Proben erfolgt durch thermische Elektronen. Mit einem Monochromator wurde die $K\alpha$ -Linie, die eine Energie von 1486,6 eV ^[80] aufweist, aus dem Röntgenspektrum des Aluminiumtargets herausgefiltert.

Die Messdaten wurden in VAMAS-Dateien umgewandelt und in das Auswertungsprogramm CasaXPS Version 2.3.12 übertragen. Es wurde eine lineare Basislinienkorrektur durchgeführt. In der Elementaranalyse wurden die Verhältnisse der Flächen, unter Berücksichtigung der Sensitivität der unterschiedlichen Elemente, zur Ermittlung der Konzentration herangezogen. Hierzu wurde die Sensitivität von Fluor auf 1 festgelegt. Die Auswertung der hochaufgelösten Messungen erfolgte durch das Annähern eines Modells bestehend aus Gaußfunktionen. In speziellen Fällen wurde die elementare Zusammensetzung aus den Flächen der hochaufgelösten Messungen ermittelt. Dazu wurde ebenfalls die Sensitivität der unterschiedlichen Elemente berücksichtigt. Die Darstellung der Spektren erfolgte mit Origin 7.5 G.

Die Messparameter sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Beschleunigungsspannung der Röntgenanode wurde auf 15 kV und die Stromstärke auf 20 mA eingestellt.

Tabelle 4: Einstellungen für die Aufnahme von XPS Spektren

Messung	Messbereich [eV]	Pass energy [eV]	Step wide [eV]	Dwell time [ms]
Elementaranalyse	1200 - -10	80	0,25	50
C 1s	295 - 278	} 20	} 0,025	} 500
N 1s	405 - 393			
O 1s	537 - 525			
S 2p	170 - 160			
F 1s	690 - 680			

3.1.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten mit einem Fluoreszenzspektrometer der Firma SPEX von Typ Fluorolog-2. Dazu wurde, nach Markierung der funktionellen Gruppen mit einem Farbstoff, die entsprechende Wellenlänge zur Anregung, der Messbereich, und die Spaltenbreite eingestellt (Tabelle 5). Für die Messung von flüssigen Proben wurde die Intensität der emittierten Strahlung in einem Winkel von 90° bezüglich der Anregung gemessen (RA = right angle). Von Folien bzw. festen Substraten wurden die Fluoreszenzspektren in einem Winkel von 22.5° (FF = front face) aufgenommen. Für Messungen in Luft wurde ein Folienhalter verwendet. Die Messungen von Folien in Flüssigkeiten wurden in einer Küvette durchgeführt (Abbildung 6). Die zu untersuchende Folie wurde dabei gegen eine Metallplatte und eine schwarze Folie gedrückt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Folie dicht anliegt.

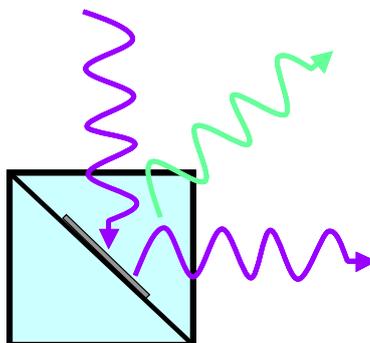


Abbildung 6: Fluoreszenzspektroskopie von funktionalisierten Substraten in einer Flüssigkeit – violette Welle = Anregung; grüne Welle = Emission

Tabelle 5: Messeinstellungen des Fluoreszenzspektrometers

Farbstoff	Anregung [nm]	Emission [nm]	Spaltenbreite	
			Anregung [mm]	Emission [nm]
Fluorescamin	390	400 - 650	1,0	1,0
Dansylderivate	350	400 - 650	0,5	2,0
Protein-FITC	488	500 - 700	1,0	2,0

Die Einstellungen für zeitaufgelöste Messungen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Messeinstellungen für zeitaufgelöste Messungen

Gesamtzeit [s]:	15	Puffer:	PBS
Inkrement [ms]:	15	Integrationszeit [ms]	1
Anregung [nm]:	488	Emission [nm]:	588
Slits (Anregung) [mm]	1,0	Slits (Emission) [mm]	4,0

Die Daten aus den Fluoreszenzmessungen wurden in ASCII Dateien umgewandelt und in das Darstellungsprogramm Origin 7.5 importiert.

3.1.3 Ellipsometrie

Die ellipsometrischen Messungen zur Bestimmung der Dicke der Schichten wurden mit einem spektroskopischen Ellipsometer der Firma Jobin Yvon vom Typ UVISEL durchgeführt. Dazu wurde ein mit Gold (~ 120 nm) bedampftes Glassubstrat verwendet. Es wird beschrieben, dass ab dieser Dicke die Durchlässigkeit für Licht sehr gering ist.^[123, 124] Die Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes wurde zwischen 350 – 790 nm variiert. Es wurde in zwei Konfigurationen der Lichtmodulation gemessen (A: $0^\circ/45^\circ$ und B: $45^\circ/45^\circ$). Die Messwerte aus beiden Konfigurationen wurden zu einem Datensatz zusammengeführt. Die Messungen der Probe an der Atmosphäre erfolgten in einem Winkel von 70° für den Modulator Φ_1 und Analysator Φ_2 . Einige Experimente, zur Untersuchung des Verhaltens der Schicht in erhöhter Luftfeuchtigkeit, erfolgten in einer selbstgebauten Zelle. Für diese Messungen wurde Φ_1 und Φ_2 auf 60° eingestellt, so dass der einfallende und austretende Strahl im 90° Winkel auf die Glasscheibe trifft.

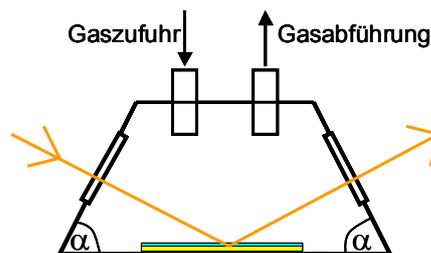


Abbildung 7: Seitenansicht der Messzelle zur Messung unter veränderten Umgebungsbedingungen ($\alpha = 60^\circ$)

Mittels dieser Zelle ist es möglich, die Quellung von Netzwerken unter definierter Luftfeuchtigkeit zu untersuchen (Abbildung 7). Dazu wurde ein Stickstoffstrom durch ein auf 35°C temperiertes Wasserbad geleitet und im Anschluss durch die Zelle geführt. Die Messung der relativen Luftfeuchtigkeit ergab Werte zwischen 95 % bis 99 %. Zum Gelingen des Experimentes ist es wichtig, dass die Küvette keinen Beschlag zeigt.

Zur Interpretation der Verläufe von Ψ und Δ wurden verschiedene Schichtmodelle konstruiert. Der Brechungsindex wurde durch CAUCHY-Parameterisierung beschrieben. Die Auswertung erfolgte mit der zum Spektrometer gelieferten Software Version 3.0 für DOS. Die Darstellung der Spektren erfolgte wiederum mit Origin 7.5 G.

Bestimmung der Schichtdicke unter Atmosphärenbedingungen

Die Schichtdicke eines Polyethylenfilmes auf einem goldbeschichteten Glassubstrat (hergestellt in einer Tauchbeschichtung nach Ref. [125] und [126]) wurde mittels eines Einschichtmodells beschrieben. Für den Brechungsindex wurde ein Wert von 1,51 angenommen.^[79] Für weitere Untersuchungen wurde jedes Substrat mit einer Nummer versehen. Jeder weitere Funktionalisierungsschritt wurde mit ellipsometrischen Messungen begleitet. Nach der Synthese einer zweiten Schicht wurde ein Zweischichtmodell aufgebaut. In dieses Modell wurden die Daten aus der ersten Schicht als feste Parameter vorgegeben. Für die zweite Schicht wurde ein Brechungsindex von 1,46 (PEG) angenommen.

Bestimmung der Schichtdicke unter veränderten Umgebungsbedingungen

Das Modell wurde dahin gehend variiert, dass die zweite Schicht als eine Mischung von Wasser und organischem Material beschrieben wurde. Der für das Modell verwendete Brechungsindex für Wasser wurde auf 1,33 festgesetzt.

3.1.4 Rasterelektronenmikroskopie

Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurde ein Elektronenmikroskop der Firma Joel mit der Bezeichnung JSM 6330 F verwendet. Die nicht leitenden Proben wurden mit einem 5 nm dünnen Platinfilm bedampft.

3.1.5 Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie

Es wurde Röntgen-Nahkanten-Absorptions-Spektroskopie (NEXAFS) am Synchrotron BESSY II (Berlin) durchgeführt. Dabei wurden Spektren an der K-Kante der Elemente Kohlenstoff und Stickstoff im totalen Energieelektronen-Mode aufgenommen.^[127] Die Energieauflösung $E/\Delta E$ des Gitters 1 an der π^* -Resonanz von CO (287,4 eV) wurde mit 2500 bestimmt. Als Schlitzbreite wurde 150 μm eingestellt. Die gemessenen Spektren wurden mit der Transmissionsfunktion korrigiert, welche von einem frisch gesputterten Au-Substrat aufgenommen wurde. Winkelunabhängige Messungen wurden im 55° -Winkel zwischen der Substratoberfläche und dem Richtungsvektor des eingestrahlten linear polarisierten Lichtes durchgeführt. Die Kalibrierung der Energieachse wurde auf Basis der $\text{C1s} \rightarrow \pi^*$ -Resonanz bei 285,4 eV auf einer Graphitoberfläche erreicht (Highly Ordered Pyrolytic Graphite (HOPG); Advanced Ceramic Corp., Cleveland, USA).^[128] Die winkelabhängigen Messungen wurden bei 90° , 55° und 30° prozessiert.

3.2 Aufbauten

3.2.1 Reaktor zur Plasmafunktionalisierung

Der nicht kommerzielle Reaktor (Fraunhofer IAP) zur Plasmafunktionalisierung (Abbildung 8) besteht aus einem Glasrohr (1; $d = 150 \text{ mm}$, $l = 500 \text{ mm}$). Dieses Rohr wird von 20 mm breiten Ringelektroden (2) umgeben, welche mit einem Hochfrequenzgenerator (3; 13,56 MHz; Advanced Energy) über ein Netzwerk zur Impedanzanpassung verbunden sind. Der untere Flansch des Glasrohres ist mit einem Druckmesser ((4); Baratron 622; 10 mbar; MKS) und einer Gaszuführung (5) ausgestattet. Der Druck und der Gasfluss wird über einen Massenflusskontroller gesteuert (5b; 1259; MKS). Die Proben werden auf einer Aluminiumscheibe (6) befestigt, welche sich 3 cm über der oberen geerdeten Elektrode befindet. Der obere Flansch ist mit einer Drehschieberpumpe (8; Alcatel 2020) über einen 0,5 m langen Wellschlauch (7; Metall) verbunden.

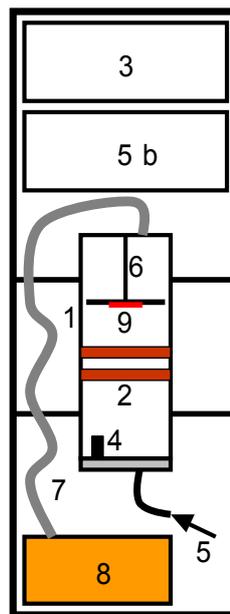


Abbildung 8: Schema des verwendeten Reaktors zur Plasmafunktionalisierung: 1 = Glasrohr, 2 = Ringelektroden, 3 = RF-Generator, 4 = Druckmesser, 5 = Gaszufuhr, 6 = Probenhalter, 7 = Wellschlauch, 8 = Drehschieberpumpe, 9 = Probe

3.2.2 Apparaturen zur Tauchbeschichtung

A Temperierbare Tauchbeschichtung

Die nicht kommerzielle Beschichtungsapparatur (Ref. [126]) besteht aus einem Zylinder, welcher aus einer mit einer Glaswand abgetrennten zweiten Kammer besteht, durch die ein Silikonöl gepumpt wird. Das Silikonöl wird durch einen Thermostaten auf

die gewünschte Temperatur erhitzt. Das Innere des Zylinders ist in zwei Teile aufgeteilt. Im unteren Teil befindet sich die Beschichtungslösung (ca. 200 ml), im oberen Teil wird die Probe in senkrechter Position gelagert. Die Beschichtungslösung wird vom unteren Teil der Apparatur in den oberen gedrückt. Zum Absenken des Flüssigkeitsspiegels wird das Ventil zu einer Vakuumpumpe geöffnet. Dadurch wird ein langsames und gleichmäßiges Absinken des Flüssigkeitsspiegels erreicht. Als Ergebnis bleibt ein dünner Polymerfilm auf der Oberfläche zurück.

B Tauchbeschichtung in kleinen Flüssigkeitsvolumen

Zur Tauchbeschichtung in kleinen Flüssigkeitsvolumen wurde eine Apparatur, bestehend aus einer Spannungsversorgung (Statron 3211), einem Stativ und einem Elektromotor zusammengestellt. Die Probe wird an einer Klammer gefestigt, welche sich an einem Faden befindet. Zur Beschichtung werden die Proben in die Lösung getaucht und im Anschluss gleichmäßig mittels des Elektromotors aus der Lösung gezogen und in vertikaler Position getrocknet. Die Beschichtungslösung wird in einem Vorratsgefäß (z.B. 20 ml Becherglas) bereit gestellt.

C Graduelle Erhöhung eines Flüssigkeitsspiegels

Um eine kontinuierliche Erhöhung eines Flüssigkeitsspiegel zu erreichen, der sich über eine Substratoberfläche bewegt, wurde die folgende Apparatur aufgebaut: Ein Substrat wird mit Hilfe einer Befestigung in einem definierten Gefäß senkrecht positioniert. Dieses Gefäß wird über einen Schlauch mit einer Spritzenpumpe (Kd-Scientific) verbunden. Während des Einleitens einer Reaktionslösung steigt der Flüssigkeitsspiegel langsam und gleichmäßig an. Somit nimmt die Verweilzeit vom unteren Teil der Probe zum oberen hin ab.

3.2.3 Apparatur zum Aufdampfen organischer Substanzen

Zur Funktionalisierung von festen Substraten wurde eine Apparatur entwickelt (Abbildung 9), welche an die Anlagen für die organische Gasphasenabscheidung (OVPD) angelehnt ist.^[129,130,131,132,133]

Diese Apparatur besteht aus einem Edelstahlgefäß (1), das auf einer Heizplatte positioniert ist und dient als Reservoir für die zu verdampfende Substanz. An dem Edelstahlgefäß befindet sich ein Anschluss zum Einleiten eines Trägergases (2), z.B. Argon. Der Gasfluss wird über einen Massenflussregler (3, MKS PR-3000) gesteuert. Weiterhin ist das Edelstahlgefäß über ein Rohrsystem mit einer Kammer (4) verbunden und kann von dieser über ein Ventil (5) abgetrennt werden. Ein zusätzlich installierter

Bypass (6) dient dazu eine unerwünschte Druckerhöhung zu verhindern. Die Probe selbst wird vor Beginn des Versuches in die Kammer gelegt. Die Kammer ist über einen Wellenschlauch (7, aus Metall), mit einer Drehschieberpumpe (Alcatel 2110) verbunden. Der Druck in der Kammer wird über einen Druckmesser (8, Panasonic Sunx DP2-4OE) kontrolliert. Das Rohrsystem wird über eine Heizschlange temperiert, um eine Kondensation des organischen Gases am Rohrsystem zu verhindern.

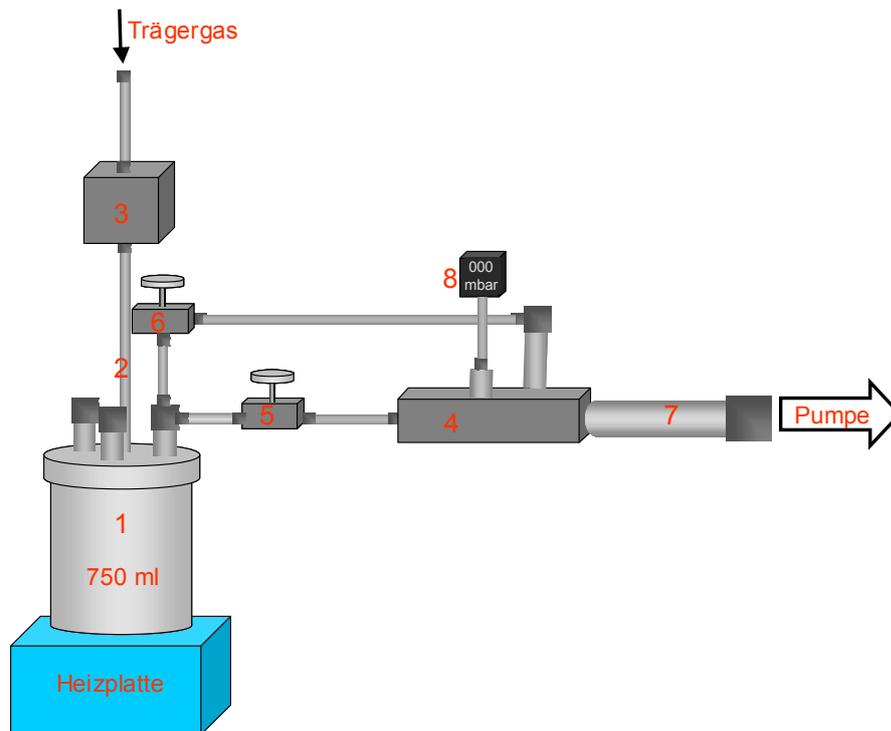


Abbildung 9: Apparatur zum gasförmigen Auftragen organischer Substanzen (mit kleinem Dampfdruck) auf ein festes Substrat (1 = Topf; 2 = Trärgaszufuhr; 3 = Massenflusskontroller, 4 = Kammer, 5 = Ventil zur Probenkammer, 6 = Ventil zum Druckausgleichssystem), 7 = Wellenschlauch zur Pumpe 1 8 = Druckmesser)

Die Pumpe wird mittels Kühlfalle vor aggressiven Dämpfen geschützt.

3.2.4 Apparatur zur Gasphasenderivatisierung

Zur Derivatisierung von funktionalisierten Substraten für die Analyse mit XPS wurde eine Apparatur verwendet, welche aus einem Edelstahlgefäß (1), aus einem Kolben (2) mit einer Verbindung zum Edelstahlgefäß, einer Zuleitung von Argon (3) und einer Verbindung zu einer Drehschieberpumpe (4, Alcatel 2110) besteht (Abbildung 10). Alle Verbindungen zum Edelstahlgefäß lassen sich über Ventile (6) abtrennen. Der Druck wird über einen Druckmesser (5, Panasonic Nais Sunx DP2-4OE) gemessen.

Das Edelstahlgefäß dient zur Aufnahme der Probe. Der Kolben wird als Reservoir für die Derivatisierungsreagenz verwendet. Die Gasversorgung dient zur Belüftung der Apparatur.

Durch zwei Ventile kann die Verbindung zur Pumpe gesteuert werden. Zwischen der Apparatur und der Pumpe wurde eine Kühlfalle installiert.

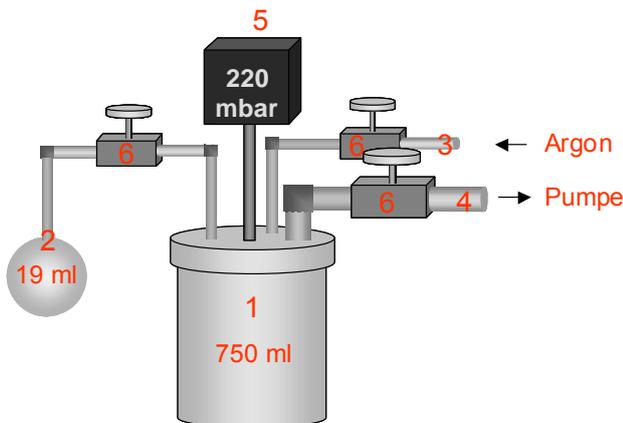


Abbildung 10: Apparatur zur Gasphasenderivatisierung von funktionalisierten Substraten

3.2.5 Aufbau für Diffusionsuntersuchungen in einer Durchflusszelle

Für Diffusionsuntersuchungen in Gelschichten und an festen Substraten wurde eine neue Zelle entwickelt (Abbildung 11).

Dazu wird eine PMMA-Platte mit zwei Bohrungen versehen. Durch die beiden Bohrungen werden zwei Schläuche geschoben und die Kontaktflächen abgedichtet. Zwischen die Probe und die PMMA-Platte wird eine PVC-Folie mit einer Dicke von 150 μm gelegt. Diese Folie hat im Zentrum einen Ausschnitt. Auf die PMMA-Platte wird die PVC-Folie so aufgelegt, dass sich ein Kanal bildet. Durch vier weitere Bohrungen an der PMMA-Platte und einem geschwärzten Blech, mit einer Aussparung, wird die Durchflusszelle an einem kommerziellen Probenhalter befestigt und in das Fluoreszenzspektrometer eingesetzt. Durch die vier Schrauben wird der Aufbau fest zusammen gepresst. Durch das Benetzen der Folie mit einem Ölfilm lässt sich eine verbesserte Abdichtung der Zelle erreichen.* Die Schläuche werden zu einer Pumpe und zu einem Vorratsgefäß geführt.

* Durch den dünnen Ölfilm wird verhindert, dass der Puffers zwischen die Abstandsfolie und die PMMA bzw. COC-Platte fließt.

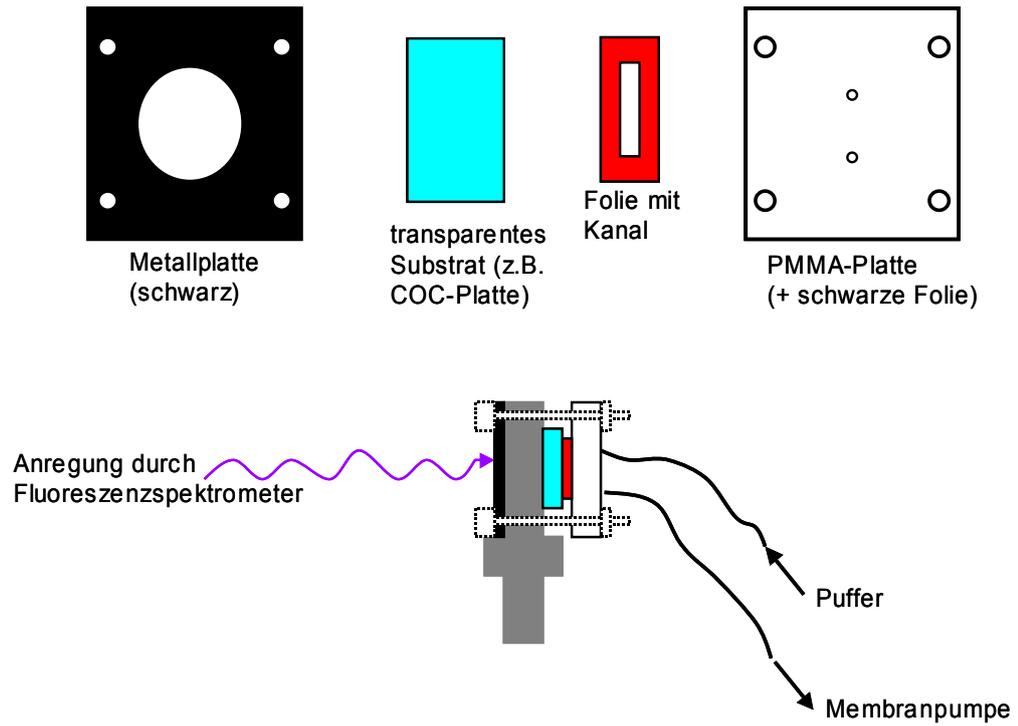


Abbildung 11: Durchflusszelle zur Untersuchung der Diffusion an festen Substraten bzw. in dünnen Schichten (Größe: PMMA-Platte: 5 x 5 cm, Dicke = 2 mm)

3.3 Experimentelle Prozeduren

3.3.1 Verwendete Chemikalien

Stoff	Reinheit	Hersteller
Aceton	SeccoSolv, getrocknet	Merck
Aceton	puriss., verschiedene Wassergehalte	Fluka
Alanin	ultra, $\geq 99\%$	Fluka
O,O'-Bis(2-aminopropyl)-propylenglykol	technisch	Fluka
Benzen-1,3,5-tricarbonsäurechlorid	zur Synthese	Merck
Biotin-Protein A	für die Biochemie	Fluka
Cyclic Olefin Copolymer (COC)		thinXXS
Dansylcadaverin	für die Fluoreszenz	Fluka
Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	puriss., $\sim 99\%$	Fluka
Diethylether	puriss., extra trocken	Fluka
1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid hydrochlorid (EDC)	puriss., $\geq 99\%$	Fluka
Ethanol	absolut reinst	Baker
Biotinyl-3,6-dioxaoctandiamin	für die Biochemie	Thermo Scientific
Fluorescamin	für die Fluoreszenz	Fluka
Glycerol Glycidylether	technisch	Raschig Polymere
HCl		Fluka
IgG-FITC	Biochemie	Fluka
2-(N-morpholino)ethansulfonsäure	technisch, $\geq 90\%$	Fluka
NaOH		Fluka
N-Hydroxysuccinimid	purum, 97%	Fluka
PBS-Puffer	Tabletten	Fluka
O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethylenglycol	zur Synthese	Rapp Polymere
PE-LD Lupolen 2024 H		BASF
Propan-1,2,3-tricarbonsäure	zur Synthese	Merck
Pyridin	puriss	Fluka
Streptavidin-FITC	für die Biochemie	AbD Serotec
THF	puriss., extra trocken	Fluka
Thionylchlorid	puriss., 99%	Fluka
Trifluoressigsäure-anydrid	puriss., $\geq 99\%$	Fluka
Zitronensäure	puriss., $\geq 99,5\%$	Fluka

3.3.2 Beschichtung von Objektträgern mit einem PE-Film

Für ellipsometrische Messungen wurden goldbeschichtete Objektträger mit einem PE-Film versehen. Dazu wurden 200 ml einer 2%igen Lösung von PE in Toluol hergestellt (4 g PE mit Toluol auf 200 g aufgefüllt).^[126] Diese Lösung wurde auf 80°C erhitzt, um das Polymer vollständig aufzulösen. Die heiße Lösung wurde in die Apparatur zur

Tauchbeschichtung (nach 3.2.2 A) gegeben. Im Anschluss wurde auf 80°C temperiert. Das Substrat wurde senkrecht in den oberen Teil der Apparatur platziert. Danach wurde die Lösung mit einem Peleusballer in die obere Kammer gedrückt. Nun wurde 2 Minuten gewartet, damit sich ein thermisches Gleichgewicht einstellt. Danach wurde der Flüssigkeitsspiegel, durch das Öffnen des Ventils zur Vakuumversorgung, abgesenkt ($\sim 2,5 \text{ cm min}^{-1}$). Nach Entnahme der Proben und einer Trocknung von mind. 30 min wurde mit reinem Ethanol abgespült. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels erfolgte die Messung der Schichtdicke. Für die NEXAFS-Messungen wurde das Verfahren auf einem Stück einer Siliziumscheibe analog durchgeführt.

3.3.3 Aktivierung im Sauerstoffplasma

Die Substrate wurden vor der Aktivierung 5 min in Ethanol in einem Ultraschallbad gereinigt. Nach dem Abdampfen des Lösemittels wurden die Proben am oberen Teller des Plasmareaktors befestigt (siehe 3.2.1). Anschließend wurde 15 min evakuiert, ein bestimmter Sauerstoffstrom eingestellt und 15 min gespült. Die Plasmaaktivierung erfolgte nach den Parametern aus Tabelle 7.^[37] Schließlich wurde die Anlage belüftet und die Substrate zügig ($< 5 \text{ min}$) weiteren Funktionalisierungsstufen zugeführt.

Tabelle 7: Parameter für die Aktivierung der Polymersubstrate

Substrat	Gasfluss [sccm]	Leistung [W]	Zeit [s]
PE	10	10	10
COC	10	20	4

3.3.4 Anbindung von O,O'-Bis(2-aminopropyl)polypropylenglykol 230

In 20 ml Ether wurden 2 ml (8,3 mmol) O'O-Bis(2-aminopropyl)-polypropylenglykol 230 (APPG 230) gegeben und unter Schütteln vermischt. Im Anschluss wurde eine plasmaaktivierte PE-Folie 1,5 h in der Lösung geschüttelt. Zur Reinigung wurde sofort nach der Entnahme mit Ethanol und Wasser abgespült und 3 x 20 min in Wasser geschüttelt.^[37] Zur Anbindung an ein COC Substrat wurde anstelle von Ether Aceton verwendet.

3.3.5 Synthese eines PEG-Glycidyl-Glycerolether-Netzwerkes

In einem optimierten Verfahren wurde zuerst eine Lösung (10 mmol l^{-1}) eines O,O'-Bis-(2-aminoethyl)oligoethylenglykols (PEG-Diamines; z.B. 0,3 g PEG-3000-Diamin in 10 ml EtOH oder THF) und eine Lösung (10 mmol l^{-1}) des trifunktionellen Glycidyl-Glycerolethers (GE; z.B. 2,6 mg in 10 ml EtOH oder THF) hergestellt. Im Anschluss wurden beide Lösungen zügig und unter Rühren mit einem Magnetrührer in einem Becherglas vermischt. Sofort wurde das Substrat mit der in Abschnitt 3.2.2 B beschriebenen Apparatur in die Lösung getaucht und nach einer Zeit von 1 min mit

einer Geschwindigkeit von $1,4 \text{ cm s}^{-1}$ herausgezogen. Im Anschluss wurde das Substrat bei Raumtemperatur oder im Trockenschrank, bei erhöhter Temperatur (z.B.: 50°C), zur Reaktion gebracht. Die Probe wurde im Anschluss dreimal je 20 min in Wasser (großer Überschuss) geschüttelt, um nicht gebundene Moleküle zu entfernen.

3.3.6 Einführen weiterer Gruppen in das Epoxid-Netzwerk

Um weitere funktionelle Gruppen in das Netzwerk einzuführen wurde eine zusätzliche Substanz in die Netzwerkbildung einbezogen. Am Beispiel des Biotin-Derivates Biotinyl-3,6-dioxaoctanediamin (EZ-linkTM-Amin-PEG₂-Biotin (Biotin-Amin); $M = 374,5 \text{ g mol}^{-1}$) mit einer Aminogruppe wurden dazu $0,8 \text{ mg}$ ($2 \text{ } \mu\text{mol}$) der Substanz in 10 ml einer PEG-Diamin-Lösung (10 mmol l^{-1}) gelöst (um eine Beschleunigung des Lösevorganges zu erreichen kann kurzzeitig erwärmt werden). Zu dieser Lösung wurde im Anschluss das selbe Volumen einer GE-Lösung (10 mmol l^{-1}) gegeben und gut durchmischt. Im Anschluss wurde das Substrat in die Lösung getaucht und im Weiteren wie in Punkt 3.3.5 verfahren.

3.3.7 Synthese eines PEG-Säurechlorid-Netzwerkes

In einem optimierten Verfahren wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 10 mmol l^{-1} des PEG-Diamines (z.B. $0,2 \text{ g}$ PEG-2000-Diamin in 10 ml EtOH) hergestellt. In diese Lösung wurde ein mit Aminogruppen funktionalisiertes Substrat (z.B. eine COC-Platte oder eine PE-Folie) getaucht und mit einer Geschwindigkeit von $1,4 \text{ cm s}^{-1}$ herausgezogen. Nach dem Abdampfen des Lösemittels wird die Folie auf einem Glasträger fixiert oder die COC-Platte in die Kammer der Apparatur aus Punkt 3.2.4 gelegt.

Als erstes wurde die Apparatur für die Reaktion nach folgender Prozedur vorbereitet. Dazu wurde das Edelstahlgefäß mit 150 mg Benzen-1,3,5-tricarbonsäurechlorid (BTC) bestückt. Im Anschluss wurde die gesamte Anlage evakuiert. Dabei waren alle Ventile geöffnet. Die Rohre wurden mit einem Heizband auf 120°C erhitzt. Die Heizplatte, welche zur Erwärmung des Edelstahlgefäßes verwendet wird, wird so eingestellt, dass das Edelstahlgefäß eine konstante Temperatur von 55°C erreicht. Durch vorhergehendes Erhitzen der Anlage unter Vakuum über einen Zeitraum von 1 h können eventuelle leichtflüchtige Verunreinigungen aus dem Edukt entfernt werden. Nach dem Belüften mit einem Gas (z.B. Argon), wurde das Substrat in die Apparatur gelegt. Das Ventil zwischen der Substratkammer und dem Edelstahlgefäß wurde geschlossen und die Kammer 2 min evakuiert.

Danach wurde das Ventil zwischen der Kammer und dem Edelstahlgefäß mit dem Säurechlorid geöffnet. Das Ventil zwischen dem Topf und dem Druckausgleich wurde währenddessen geschlossen und Argon mit einem Fluss von 40 sccm in die Anlage eingeleitet. Nach 30 s wurde der Gasfluss abgestellt und das Ventil zur Kammer geschlossen. Zum Abpumpen des Restgases wurde 2 min gewartet und im Anschluss die Apparatur mit Argon belüftet. Sofort nach dem Belüften wurde das Substrat entnommen und 30 s in Aceton geschüttelt. Zum Entfernen von Anhaftungen wurde zweimal gründlich mit Aceton gespült und zum Abschluss dreimal je 20 min in Wasser geschüttelt.

Die Reaktion wurde ebenfalls mit Propan-1,2,3-tricarbonsäure durchgeführt. Dazu wurde die Carbonsäure durch Erhitzen (bis zum Siedepunkt) in Thionylchlorid in Propan-1,2,3-tricarbonsäurechlorid überführt.^[134] Das Aufdampfen des Säurechlorides auf das Substrat wurde über einen Zeitraum von 10 min durchgeführt. Die Temperatur des Edelstahlgefäßes wurde auf 70°C erhöht. Im Anschluss wurde analog der Vorschrift für die Reaktion mit BTC verfahren.

3.3.8 Einführen weiterer Gruppen in ein PEG-Säurechlorid-Netzwerk

Analog zum PEG-Glycidyl-Glycerolether-Netzwerk wurden andere Gruppen eingeführt bzw. die Konzentration von vorhanden erhöht. Zum Einführen von Biotin-Resten wurden 0,8 mg Biotinyl-3,6-dioxaoctanediamin in 20 ml der PEG-Lösung in Ethanol (2 $\mu\text{mol l}^{-1}$) gelöst. Im Anschluss wurde analog zu Punkt 3.3.7 verfahren.

Durch Alanin wurden weitere Carbonsäuregruppen eingeführt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von Alanin in Wasser hergestellt (Stammlösung: 2 mmol l^{-1}). Im Anschluss wurde diese Lösung mit PEG-2000-Diamin in Ethanol versetzt, so dass sich eine PEG Konzentration von 10 mmol l^{-1} ergibt. Als Lösemittel wurde ein Wasser-Ethanol-Gemisch im Verhältnis 1:1 verwendet. Die Konzentration von Alanin in der Lösung wurde von 0,05 bis 0,3 mmol l^{-1} variiert. Vor dem Aufdampfen des Säurechlorides wurde die Folie getrocknet.

3.3.9 Chemischer Gradient an COOH-Gruppen

Aufbauend auf die Apparatur aus Punkt 3.2.2 C wurde ein mit einem PEG-Diamin-Säurechlorid-Netzwerk funktionalisiertes Substrat, senkrecht in einen Objektträgerbehälter (8 x 2,5 x 1,5 cm, 30 ml) gehängt und mittels EDC/NHS-Methode^[135] aktiviert. In einem optimierten Verfahren wurde eine Spritze (9 x 2 cm) mit einer Lösung von 0,2 g (1 mmol) WSC, 0,12 g (1 mmol) NHS, 100 μl 2-Methoxyethylamin (1,2 mmol) in 30 ml 0,1 M MES-Puffer befüllt. Die Spritze wurde in eine Spritzenpumpe eingelegt. Im Anschluss wurde die Lösung mit einer Flussrate von

49,5 ml h⁻¹ innerhalb von 30 min in den Objektträgerbehälter gedrückt. Dabei steigt der Flüssigkeitsspiegel der Reaktionslösung an, wodurch es zur Benetzung des Objektträgers kommt. Nach dem Ende der Reaktion wurde das Substrat sofort mit Wasser abgespült und dreimal je 20 min in Wasser geschüttelt. Im Anschluss wurde die Konzentration an funktionellen Gruppen mittels Fluoreszenzmarkierung bestimmt.

3.3.10 Stabilität in Abhängigkeit des pH-Wertes

Die Stabilität der Beschichtung wurde durch Schütteln in Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Dazu wurden verschiedene Citrat- und Phosphatpufferlösungen in einem pH-Bereich von 3 – 10 hergestellt und die mit einem Netzwerk versehenen Substrate 5 min bis 1 h geschüttelt. Sofort nach dem Ende der Zeitspanne wurde mit deionisiertem Wasser gewaschen und mit XPS die Sauerstoffkonzentration bestimmt.

3.3.11 Fluoreszenzmarkierung von funktionellen Gruppen

Zur Markierung von COOH- und NH₂-Gruppen wurde auf der Vorschrift von Ivanov et. al. aufgebaut.^[27] Alle Schritte wurden von XPS-Messungen begleitet, um die Stabilität der Gelschicht zu testen.

Dansylcadaverin zur Markierung von COOH-Gruppen

Das funktionalisierte Substrat wurde in einer Lösung aus 10 mg (29,8 µmol) Dansylcadaverin und 10 mg (48,5 µmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in einem Gemisch von 6 ml Ether und 4 ml Pyridin 2,5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Um den Einfall von Licht zu verhindern wurde der Erlenmeyerkolben mit einer Aluminiumfolie abgedunkelt. Nach dem Ende der Reaktion wurden die Substrate zweimal mit Aceton gewaschen und im Anschluss zweimal 2 h in Aceton und 10 h in EtOH geschüttelt. Nach einstündigem Trocknen an Luft wurde die Fluoreszenzintensität der Folien bestimmt (nach 3.1.2).

Zur Kalibrierung^[27] wurden verschieden konzentrierte Lösungen (0 – 1 mg ml⁻¹) von Dansylcadaverin in Aceton hergestellt. Die gereinigten PE-Folien (1 x 2 cm) wurden in die Lösungen, über einen Zeitraum von 16 h, eingelegt. Im Anschluss wurden die Folien entnommen und eine Stunde an Luft getrocknet. Danach erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenzintensität (Spalteeinstellungen: 2 x 0,5 (Anregung); 2 x 2,0 (Emission)). Im Anschluss wurden die Folien 6 h in je 10 ml Ethanol geschüttelt. Danach wurde die Fluoreszenzintensität der Lösung und der Folien gemessen. Die Differenz zwischen den Messungen der Fluoreszenzintensität der Folien wurde mit den

Messungen der Fluoreszenzintensität der Lösungen korreliert. Aus der Kalibrierung der Fluoreszenzintensität in Lösung ($0 - 10 \mu\text{mol l}^{-1}$) kann auf die korrespondierende Fluoreszenzintensität (Differenz) und damit auf die Flächenkonzentration von Dansylcadaverin geschlossen werden. Dazu wird die bestimmte Stoffmenge an Farbstoffmolekülen (das Volumen der Waschlösung ist bekannt) durch die Fläche der Folien dividiert.

Fluorescamin (Floram) zur Markierung von primären Aminien

Die Substrate wurden 5 min in einer Lösung von 5 mg ($18 \mu\text{mol l}^{-1}$) Fluorescamin in 20 ml trockenem Aceton geschüttelt. Im Anschluss wurden die Folien zweimal in Wasser und einmal in Ethanol gewaschen. Die Messung erfolgte in einem Natriumboratpuffer ($0,2 \text{ mol l}^{-1}$, pH = 9).

3.3.12 Derivatisierung mit TFAA für XPS-Messungen

Die funktionalisierten Substrate wurden in einer Apparatur für die Gasphasenderivatisierung (siehe Punkt 3.2.4) mit TFAA nach folgender Vorschrift umgesetzt. Die Apparatur wurde mit dem Substrat bestückt und 5 min evakuiert. Danach wurde sofort belüftet, so dass das Rohr zum leeren Reagenziengefäß mit Argon befüllt ist. Im Anschluss wurde das Ventil geschlossen und 30 min evakuiert. Danach wurde der Reagenzienkolben durch einen mit 1 ml TFAA gefüllten ersetzt. Im Anschluss wurde das Ventil zur Pumpe geschlossen und sofort danach das Ventil zum TFAA-Kolben geöffnet, so dass das TFAA in das Edelstahlgefäß hinein verdampft. Die Probe wurde 30 min in der TFAA-Atmosphäre belassen. Nach dieser Zeit wurde wiederum 30 min abgepumpt und im Anschluss mit Argon belüftet. Kurz danach wurden die XPS-Messungen durchgeführt.

3.3.13 Interaktionsstudien zwischen der Gelschicht und Modellproteinen

Die Markierung von Biotin-Einheiten wurde mit FITC-markierten (Fluoresceinisothiocyanat) Streptavidin durchgeführt. Dazu wurde die Streptavidin-FITC-Lösung (1 mg ml^{-1}) in PBS-Puffer auf eine Konzentration von $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ verdünnt. Im Anschluss wurde ein mit Biotin funktionalisiertes Substrat 30 min in die Protein-Lösung gelegt. Zum Entfernen von nicht gebundenen Streptavidin-FITC wurde dreimal in PBS-Puffer abgespült. Nach der Reinigung wurde das Substrat in eine Küvette mit PBS-Puffer transferiert und die Fluoreszenzintensität bestimmt. Als Referenz wurde eine Gelschicht ohne Biotin nach analogem Vorgehen behandelt und die Fluoreszenzintensität gemessen.

In einer weiteren Stufe wurde ein Protein A mit Biotin-Gruppen an Streptavidin in einer mit Biotin-Gruppen funktionalisierten Gelschicht immobilisiert und von einem mit FITC markierten IgG erkannt. Dazu wurde ein Substrat mit einer biotin-funktionalisierten Hydrogelschicht in eine Streptavidin-Lösung ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) in PBS-Puffer 30 min eingelegt. Nach einem dreistufigen Waschprozess in PBS-Puffer wurde das funktionalisierte Substrat in eine Lösung ($1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) von Biotin-Protein A 30 min eingelegt. Im Anschluss wurde das funktionalisierte Substrat dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, 30 min in eine Lösung (1 mg ml^{-1}) von IgG-FITC gelegt und analog mit PBS-Puffer gewaschen. Als Referenz wurde die Prozedur mit einer Gelschicht ohne Biotin-Protein A durchgeführt. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgte in PBS-Puffer ($0,2 \text{ mol l}^{-1}$, pH 7,2).

Zur Kalibrierung wurden Lösungen mit einer Konzentration für Streptavidin-FITC von 0 bis $11 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ in PBS-Puffer hergestellt. In gleicher Weise erfolgte dies in einem Konzentrationsbereich von 0 bis $20 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ für IgG-FITC. Danach wurde die Fluoreszenzintensität der Lösungen bestimmt und graphisch aufgetragen. Zur eigentlichen Messung der Konzentration der Proteine in der Hydrogelschicht wurde die Folie in die Küvette platziert und die Fluoreszenzintensität in PBS-Puffer gemessen. Aus der Kalibrierung lässt sich die Konzentration der korrespondierenden Fluoreszenzintensität bestimmen. Dazu wird das tatsächlich durchstrahlte Volumen abgeschätzt.* Daraus wurde die Teilchenanzahl berechnet. Um diese auf die bestrahlte Fläche zu beziehen, wird durch die Fläche des Messfleckes dividiert.

3.3.14 Experimente mit einer Durchflusszelle

Für Interaktionsstudien zwischen Molekülen wurde eine Streptavidin-Lösung ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) in eine Durchflusszelle gegeben und mit PBS-Puffer ausgewaschen. Dazu wurde das funktionalisierte Substrat in eine Durchflusszelle (Absatz 3.2.5) integriert. Zuerst wurde die PVC-Folie mit einem Ausschnitt auf eine Grundplatte mit der Zu- und Abführung für den Puffer aufgelegt. Auf diese PVC-Folie wurde das Substrat gepresst, so dass sich ein Flusskanal ausbildet. Dieser Aufbau wurde mit dem Probenhalter für feste Proben des Fluoreszenzspektrometers verbunden. Durch eine Klemmvorrichtung und mit Schrauben konnte eine ausreichend feste Verbindung erreicht werden.

Die Küvette wird von unten, d.h. über den Anschluss zur Pumpe, mit einer Proteinlösung (Streptavidin-FITC $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) befüllt. Dabei wurde darauf geachtet,

dass die Lösung nicht in den Schlauch für die Pufferzufuhr läuft. Im Anschluss wurde die Küvette in das Spektrometer eingebaut und mit einem Becherglas mit PBS-Puffer und der Pumpe verbunden. Es wurde ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen (FITC, Anregung: 488 nm), um die Wellenlänge der maximalen Emission zu messen. Diese Wellenlänge wurde in die Parametereinstellung für zeitaufgelöste Messungen vorgegeben (siehe 3.1.2). Nach dem Verbinden aller Systembestandteile wurde zuerst die zeitaufgelöste Messung und dann die Pumpe gestartet. Nach dem Ende des Versuches wurden die Intensitäts-Zeit-Verläufe in Origin importiert und auf den gleichen Ausgangspunkt verschoben. Die Untersuchungen wurden von XPS-Messungen begleitet, um die Stabilität der Gelschicht zu überprüfen.

* Dazu wird der Weg des Strahls der Emission über eine geometrische Konstruktion gewonnen.

4 Ergebnisse

4.1 Strategie für die Synthese der Netzwerke

Aus der Literatur (Abschnitt 2) lässt sich entnehmen, dass sich die meisten Funktionalisierungen entweder auf die Fläche beziehen, zu einer hohen Konzentration der funktionellen Gruppen oder zu stark vernetzten Polymerschichten führen. Sehr oft werden radikalische Polymerisationen verwendet, wodurch sich chemisch nicht von einander zu unterscheidende Bindungen ausbilden.

Wird ein Netzwerk aus bifunktionellen Oligomeren und mindestens trifunktionellen Molekülen auf einer Oberfläche auf Basis von Additions- bzw. Kondensationsreaktionen aufgebaut, bilden sich neue Bindungstypen aus, welche mit Methoden der chemischen Analyse nachgewiesen werden können. Funktionelle Gruppen, welche keine Bindung aufgebaut haben bleiben erhalten und können Verwendung finden, um über eine Endgruppenanalyse weitere Informationen über die Struktur des Netzwerkes abzuleiten. Weist mindestens ein der verwendeten Oligomere eine ausreichende Länge (> 10 nm) auf können für die Immobilisierung von Proteinen geeignete Netzwerke hergestellt werden.

In einem ersten Schritt wird das verwendete Substrat, eine PE-Folie oder eine COC-Platte, mit reaktiven Gruppen versehen. Dies geschieht durch die Oxidation der Oberfläche in einem Sauerstoffplasma und die anschließende Anbindung eines auf Propylenglykol basierenden Diamins (APPG-230). Jeder Funktionalisierungsschritt wird mit XPS verfolgt.

Nach der Plasmaaktivierung lässt sich im C1s-Spektrum (Abbildung 12) ein Intensitätsanstieg zwischen einer Bindungsenergie (BE) von 286,0 eV bis 290,5 eV erkennen. Dieser Bereich kann durch sauerstoffhaltige Kohlenstoffkomponenten (BE > 285 eV: C-O, C=O, COOR, COOH) beschrieben werden (rote Kurve).

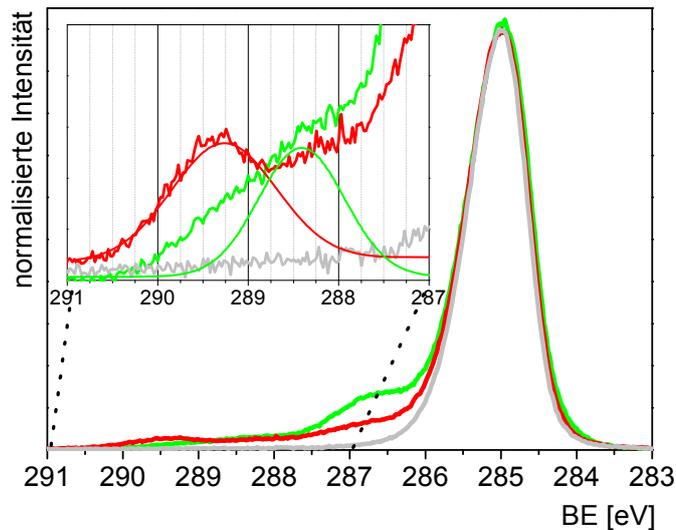


Abbildung 12: C1s-Spektren der Kopplung von APPG-230 an eine plasmaaktivierte PE Oberfläche – grau: PE; rot: PE nach Oxidation in einem O₂-Plasma; grün: PE nach Oxidation und Anbindung von APPG-230; oben rechts: Vergrößerung des Ausschnittes von 291,0 – 287,0 eV mit einer COOH-Komponente (rot: 289,3 eV) und einer CONH-Komponente (grün: 288,4 eV)

Im Bereich einer BE von 289,0 eV bis 290,0 eV ist das Spektrum nach der Plasmaoxidation mit einer Komponente bei 289,3 eV zu beschreiben, die auf COOH-Gruppen hindeutet (rote Gaußfunktion). Nach der Anbindung von APPG-230 ist diese Komponente wesentlich kleiner. Dafür ist eine neue Komponente bei 288,4 eV im Spektrum zu finden, welche ein Amid repräsentiert (grüne Gaußfunktion). Daraus lässt sich ableiten, dass das APPG-230 unter den gewählten Reaktionsbedingungen, als Amid gebunden wird. Der aus der Veränderung des Anteils der COOH-Komponente berechnete Umsatz liegt bei über 82 %. Der hohe Umsatz, auch ohne chemische Aktivierung der COOH-Gruppen, lässt sich damit erklären, dass der Überschuss an Edukten aus der Lösung sehr groß ist (ca. ein Faktor von 10⁶). Im Gegensatz dazu werden die Reaktionsprodukte (das Amid + Wasser) auf der Substratoberfläche in entsprechend geringerer Konzentration gebildet. Bei Verwendung von trockenen organischen Lösemitteln wird die Reaktion deshalb stark auf die Seite der Produkte verschoben.

Dass der Stöchiometrie zu Grunde liegende Modell zur Auswertung des C1s-Spektrums nach Anbindung von APPG-230 an die plasmaaktivierte PE-Folie (Abbildung 12) lässt sich so aufbauen, dass die C-N- und die C-O-Komponenten den Verhältnissen im APPG-230 mit 3 PPG-Einheiten entsprechen.

Tabelle 8: Vergleich zwischen der Stöchiometrie (APPG-230_{Theorie}) und den Werten aus der Elementaranalyse und dem C1s-Spektrum nach Plasmaaktivierung von PE (PE_{akt}) und Anbindung von APPG-230

Stufe	C [at%]	O [at%]	N [at%]	C-C [C%]	C-N [C%]	C-O [C%]	C=O [C%]	CONH [C%]	COOH [C%]
PE _{akt}	92,3	7,7		88,8		5,9	2,5		2,8
PE _{APPG 230}	87,6	9,8	2,6	77,0	4,8	14,4	0,8	2,3	0,8
APPG _{Theorie}	70,6	17,6	11,8	33,3	16,7	50,0			

Nur die Konzentration des Stickstoffes (2,6 at%) auf der Oberfläche entspricht dabei nicht dem theoretischen Wert, von 1,4 at%, welcher sich aus der Stöchiometrie im APPG-230, orientiert an der C-O-Komponente, ableiten würde. Dies lässt sich zum Beispiel damit erklären, dass die eingesetzte APPG-Lösung eine Mischung von Molekülen mit unterschiedlichen Molekulargewichten darstellt oder Verunreinigungen bzw. Reste von Edukten enthält. Ist der Anteil der PPG-Einheiten etwas kleiner, lässt sich ein relativ höherer Stickstoffanteil erklären.

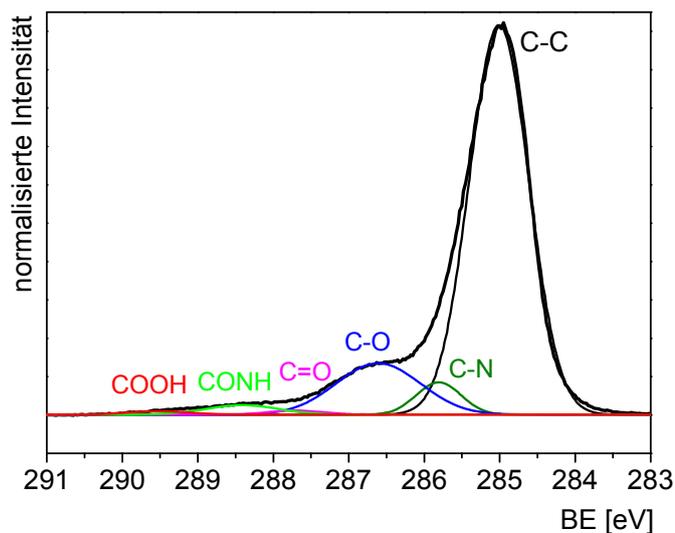


Abbildung 13: C1s-Spektrum von APPG-230 gebunden auf einer plasmaaktivierten PE-Folie mit den entsprechenden Komponenten – PE: C-C, C=O, COOH; APPG 230: C-N, C-O; grün: Bindung als Amid (Anteil nach erfolgter Bindung = 0,5 [C-N])

Der Anteil der C-C-Komponente entspricht nicht der Stöchiometrie des APPG-Moleküls (Abbildung 13). Daneben ist der absolute Stickstoffgehalt deutlich geringer als die Stöchiometrie erwarten lässt und die Konzentration des Kohlenstoffes ist deutlich erhöht. Daraus lässt sich ableiten, dass das PE-Substratmaterial einen hohen Anteil an dem analysierten Volumenelement besitzt. Es bildet sich demzufolge eine mit APPG-230 funktionalisierte Schicht die dünner als 5 – 10 nm ist aus.

Neben hochaufgelösten C1s-Spektren wurden auch N1s- und O1s- Spektren aufgenommen. In den N1s-Spektren lässt sich kein Anstieg der Intensität im Bereich

von 401,5 eV bis 402,0 eV feststellen. Dies deutet darauf hin, dass der Stickstoff nicht als Ammonium Kation vorliegt. Im O1s-Spektrum lassen sich die stöchiometrischen Verhältnisse des APPG 230 darstellen (Abbildung 14).

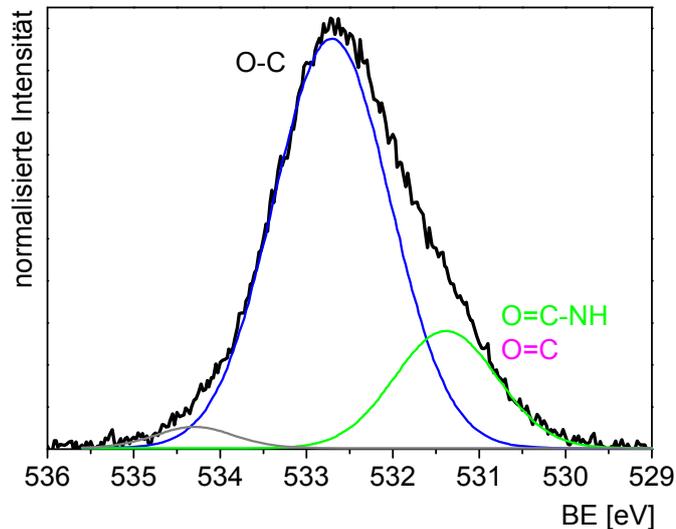
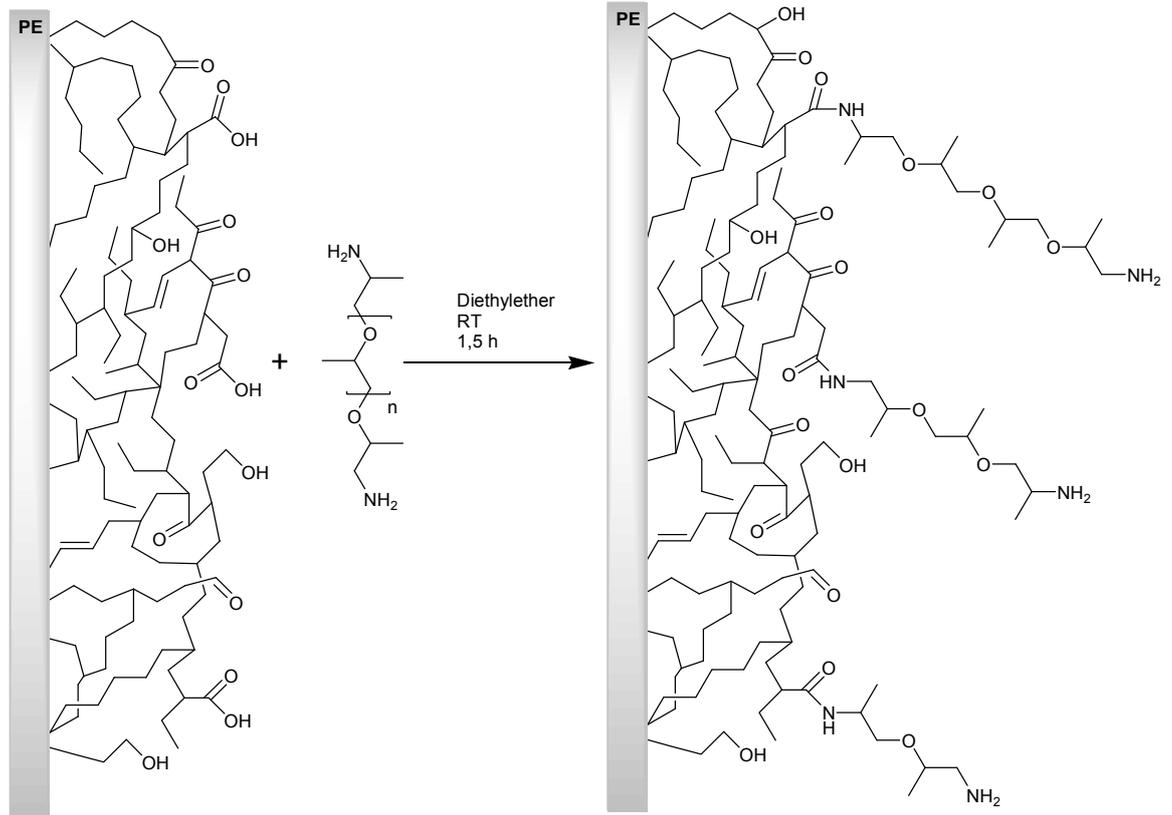


Abbildung 14: O1s-Spektrum von einer plasmaaktivierten Polymeroberfläche nach Anbindung von APPG-230 – grün: Sauerstoff in Amidbindungen bei 531,4 eV (Bindung zur Oberfläche); blau: Sauerstoff in C-O-Bindungen (APPG) bei 532,7 eV, grau: weitere Komponente aus Plasmaaktivierung

Es muss beachtet werden, dass einige der sauerstoffhaltigen Funktionalgruppen durch die Plasmaaktivierung erzeugt werden und daher die isolierte Interpretation des O1s Spektrums zusätzlich erschwert wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Diamin als Amid gebunden ist. Aus den Abweichungen in der Elementaranalyse und dem C1s Spektrum lässt sich ableiten, dass neben den APPG-230-Molekülen auch andere Amine an der Oberfläche angebunden sind. Diese können von Nebenprodukten aus dem APPG-230 stammen. Es liegt keine ionische Bindung des Diamins vor. Die funktionalisierte Schicht ist deutlich dünner als die Analysentiefe von XPS (5-10 nm). Neben dem APPG-230 liegen noch sauerstoffhaltige Gruppen aus der Plasmaaktivierung vor. Aus diesen Daten lässt sich das folgende Schema ableiten (Schema 11). Dabei muss angemerkt werden, dass die exakte molekulare Beschreibung nicht möglich ist. Es handelt sich um eine idealisierte Annäherung, basierend auf den XPS-Daten.



Schema 11: Anbindung von APPG-230 an eine plasmaaktivierte PE-Folie unter Berücksichtigung funktioneller Gruppen der Plasmaoxidation und Anbindung von Diaminen mit unterschiedlicher Molmassen

Neben APPG-230 lassen sich andere Amine, auch aus der Gasphase, an plasmaaktivierte Polymeroberflächen anbinden (vgl. 2.1.2). Durch die Verwendung eines größeren Moleküls als 1,2-Diaminoethan (wie in Ref. [37,39]) wird die Zugänglichkeit der primären Aminogruppe für weitere Reaktionen verbessert. Dieser Weg stellt somit eine Möglichkeit dar Funktionalisierungen von Polymeroberflächen mit Aminogruppen zu erreichen. Die Funktionalisierung des Substrates mit primären Aminen stellt den Ausgangspunkt für weitere Reaktionen dar.

4.2 Synthese der Hydrogelschichten

4.2.1 PEG-Glycidyl-Glycerolether-Netzwerke

4.2.1.1 Prinzip

Eine Möglichkeit, Oberflächen mit Netzwerken zu versehen, basiert auf der Ringöffnungsreaktion von Epoxiden durch Amine. Durch die hohe Nucleophilie des Stickstoffes in einem primären Amin verläuft die Reaktion schnell und mit hohen Ausbeuten. Wird ein bifunktionelles Diamin und ein trifunktioneller Glycidyl-Glycerolether (GE) verwendet, erfolgt die Bildung eines Netzwerkes. Im Schema 12 ist die Reaktion dargestellt. Gruppen, die in der Netzwerkbildungsreaktion nicht reagieren (dies können primäre Aminogruppen des Diamins oder Epoxidringe des GE sein), können für weitere Reaktionen oder für die Immobilisation von Proteinen genutzt werden. Nicht reagierte Epoxide können hydrolysieren und dabei zwei Hydroxy-Gruppen ausbilden. Die Reaktion wird so durchgeführt, dass die Reagenzien in einem Lösemittel, z.B. durch eine Tauchbeschichtung, auf die Substratoberfläche aufgetragen werden. In den folgenden Untersuchungen wird dazu Ethanol oder THF verwendet.

Als Indikator für die Anbindung der PEG-Diamine dient die C-O-Komponente, welche den sauerstoffgebundenen Kohlenstoff aus den Ethylenglykol-Einheiten (EG) im C1s-Spektrum repräsentiert (Abbildung 15).

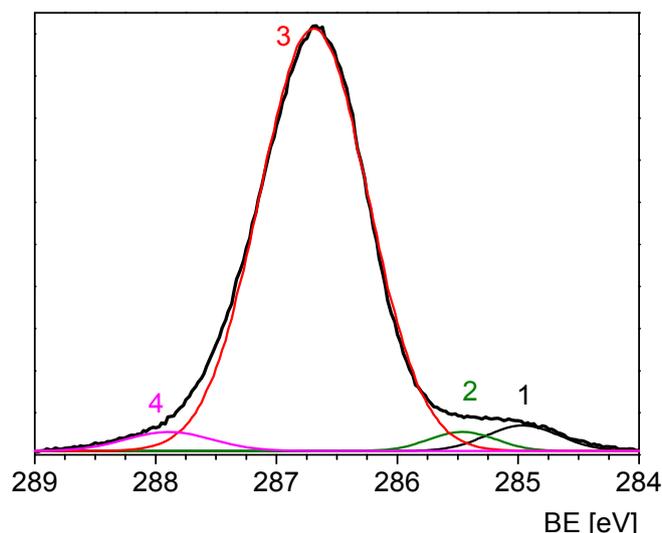
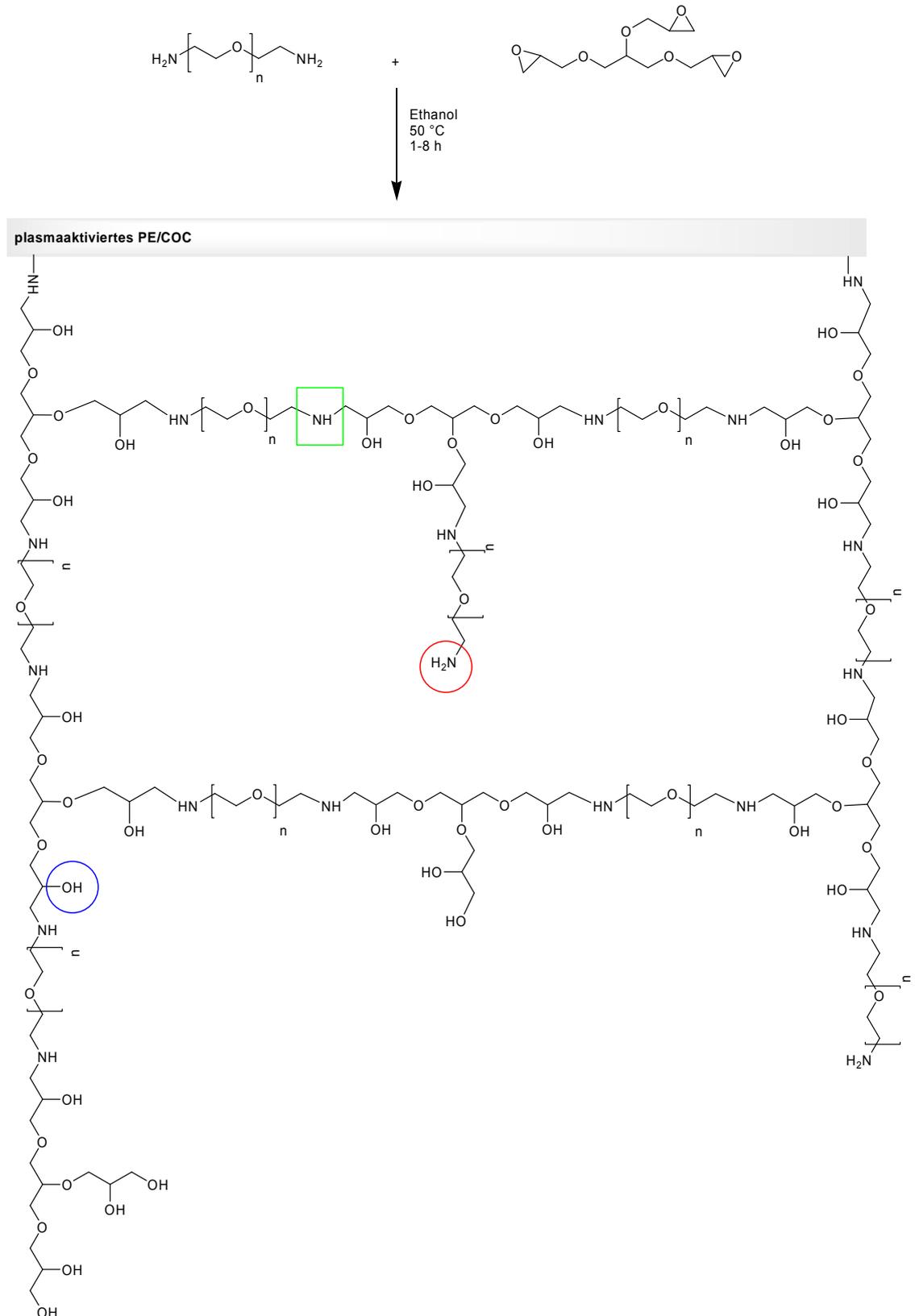


Abbildung 15: C1s-Spektrum eines PEG-2000-Diamin-GE-Netzwerkes auf PE – 1: C-C vom Substrat; 2: C-N nach Reaktion mit den Epoxid-Ringen; 3: C-O aus den EG-Einheiten; 4: C=O-Komponente (Abbauprodukt der PEG-Oligomere)

Die C-C-Komponente bei einer BE von 285 eV lässt sich dem olefinischen Substratmaterial zuordnen.

4 Ergebnisse

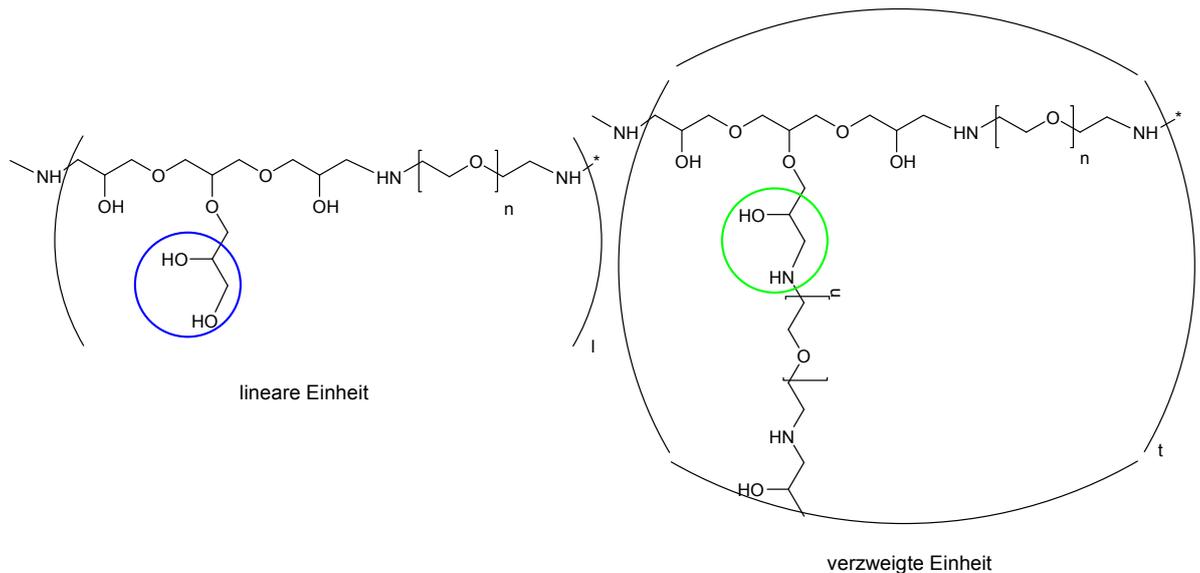


Schema 12: Bildung eines Netzwerkes aus PEG-Diaminen und einem trifunktionellen glycerolbasiertem Epoxid (GE) auf einer mit Aminogruppen funktionalisierten Polymeroberfläche unter Ausbildung von sekundären Aminen (grüner Kasten), daneben weist das Netzwerk Hydroxygruppen (blauer Kreis) und primäre Amine (roter Kreis) auf.

Mit einer BE von 285,5 eV ist die C-N-Komponente aus den PEG-Diaminen im Spektrum zu erkennen. Die Hauptkomponente bei 286,7 eV repräsentiert die C-O-Bindung aus den EG-Einheiten. Das C1s-Spektrum lässt sich bei einer BE von 287,8 eV mit einer weiteren Komponente beschreiben, diese deutet auf C=O-Bindungen hin. Die daraus ableitbaren Ketone bzw. Aldehyde können ihre Ursache in einem (thermisch) oxidativen Abbau der PEG-Oligomere haben.^[136,137]

Neben hochaufgelösten C1s-Spektren wurden N1s- und O1s-Spektren von dem oberflächengebundenen Netzwerk aufgenommen. Das N1s-Spektrum lässt sich mit einer Komponente bei einer BE von 400,1 eV beschreiben, welche Stickstoffatome in primären oder sekundären Aminen darstellt. In den Spektren lassen sich deutlich weniger als 10% aller Stickstoffatome im protonierten Zustand (als Ammonium) durch eine Komponente bei einer BE von 401,5 eV fitten. Das O1s-Spektrum weist eine Komponente bei 533,1 eV auf, diese Bindungsenergie lässt sich dem Sauerstoff in den EG-Einheiten zuordnen.

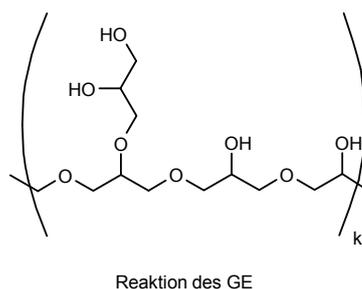
Werden die gemessenen Werte der Verhältnisse der Elemente und die Verhältnisse der chemisch unterschiedlichen Kohlenstoffatome mit der Stöchiometrie verglichen lassen sich tiefergehende Aussagen zur Struktur des Netzwerkes ableiten. Dazu wird ein Modell aufgebaut, welches das Netzwerk als eine Mischung von linearen und verzweigten Einheiten beschreibt. Die Bildung einer linearen Einheit erfolgt durch die Reaktion eines trifunktionellen Epoxides mit zwei PEG-Diaminen. Eine verzweigte Einheit bildet sich durch eine Reaktion aller drei Epoxid-Ringe mit PEG-Diaminen. Reagiert nur ein Epoxid-Ring des GE mit den PEG-Diaminen wird das Netzwerk terminiert. Im Falle einer Reaktion an nur einem der beiden primären Aminogruppen in einem PEG-Oligomer findet ebenfalls eine Terminierung statt oder das Reaktionsprodukt bindet nicht an der Oberfläche an. Die Hydrolyse der Epoxid-Endgruppen führt zu einem Diol.



Schema 13: Ausbildung von linearen und verzweigten Einheiten in einem PEG-Diamin-GE-Netzwerk – blauer Kreis: Reaktionsprodukt der Hydrolyse eines Epoxides; grüner Kreis: Reaktionsprodukt (sekundäres Amin) einer Reaktion zwischen einem Diamin und einem Epoxid-Ring

Unter Annahme dieser Einheiten lässt sich, aus der Stöchiometrie, die theoretische Zusammensetzung der Schicht ermitteln.

Eine dritte Reaktionsmöglichkeit, die in Betracht gezogen werden kann, ist die Reaktion des GE mit sich selbst (Schema 14). Im Zusammenhang mit dem aufgestellten Modell stellt die Reaktion eine Nebenreaktion dar. Die Bildung des Nebenproduktes würde zu einer deutlich höheren Konzentration an OH-Gruppen führen. Im Verhältnis würde sich die Konzentration des Stickstoffes, im Vergleich zu den im oberen Teil angenommen Einheiten, stark reduzieren.



Schema 14: Reaktion des GE mit sich selbst

Die Daten aus der Elementaranalyse unterscheiden sich kaum von der aus der Stöchiometrie theoretisch ermittelten Zusammensetzung. Die Messwerte aus den hochauflösten Spektren zeigen einen deutlicheren Unterschied.

Tabelle 9: Vergleich zwischen aus der Stöchiometrie berechneten Zusammensetzung einer linearen und verzweigten Netzwerkeinheit und einer analysierten PEG-2000-Diamin-GE Hydrogelschicht (5 mmol l⁻¹ PEG 2000-diamin und 5 mmol l⁻¹ GE 100; RT) – links: Elementaranalyse; rechts: hochaufgelöstes C1s-Spektrum

PEG 2000 GE	C [at%]	O [at%]	N [at%]	C-C [C%]	C-N [C%]	C-O [C%]	C=O [C%]
linear	65,8	32,9	1,3		3,8	96,2	
verzweigt	66,1	32,5	1,4		3,6	96,4	
Experiment	67,8	30,8	1,4	3,7	2,5	90,5	3,3

So lässt sich im C1s-Spektrum eine C-C-Komponente finden, welche sich auf Kohlenstoffatome aus dem Substratmaterial zurückzuführen lässt. Durch die wenig isolierte Position der C-N-Komponente lässt sich die Konzentration nicht sehr genau bestimmen. Mit einem Anteil von 3,3 % an allen Kohlenstoffatomen ist die schon beschriebene C=O-Komponente mit einer BE von 287,8 eV zu erkennen. Um mehr Strukturinformation zu gewinnen bietet sich die Verwendung von Markierungs- bzw. Derivatisierungsreaktionen an, wie im folgenden gezeigt wird.

Die primären Amine, welche als Koppelgruppen für Proteine fungieren können, wurden durch Fluoreszenzmarkierung mit Fluorescamin nachgewiesen (vgl. 2.2.3).

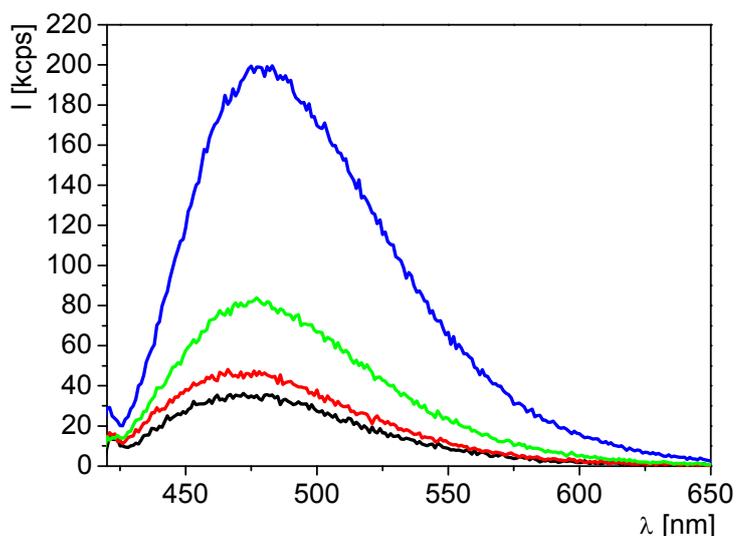


Abbildung 16: Fluoreszenzspektren verschiedener PEG-2000-Diamin-GE-Hydrogelschichten nach Markierung mit Fluorescamin – schwarz: PE + 1,2-Diaminoethan („2-D“); rot: PE + APPG 230 („2-D“); grün: PEG 2000-Diamin-GE (5 mmol l⁻¹; 35°C); blau: PEG-2000-Diamin-GE (5 mmol l⁻¹; RT)

Die Fluoreszenzspektren zeigen (Abbildung 16), dass die Fluoreszenzintensität der markierten Amine in einem Netzwerk im Vergleich zu Aminen auf einer 2-D funktionalisierten Oberfläche, um einen Faktor von 2,2 bzw. 5,1 größer ist. Wird eine 2-D funktionalisierte Oberfläche zu Grunde gelegt, welche in einem Plasma (unter ähnlichen Bedingungen wie die in der Arbeit verwendeten) mit COOH-Gruppen

funktionalisiert wurde, liegt die Konzentration der Gruppen bei $1,5 \text{ pmol cm}^{-2}$.^[27] Unter der Annahme, dass die Diamine vorwiegend mit den COOH-Gruppen reagieren liegt die Konzentration der primären Amine, nach Anbindung eines Diamins, ebenfalls in diesem Bereich. Daraus kann für ein Netzwerk aus PEG-2000-Diaminen und dem GE die Konzentration der primären Amine mit $2 - 5 \text{ pmol cm}^{-2}$ bestimmt werden. Die Spektren zeigen keine zusätzliche rotverschobene Bande bei einer Wellenlänge von 520 nm. Dies deutet darauf hin, dass der mittlere Abstand der funktionellen Gruppen größer als 1,9 nm ist (vgl. Ref. [37]). Wird eine 50 nm dicke Schicht angenommen, kann der mittlere Abstand der primären Amine mit 12 nm angegeben werden.

4.2.1.2 Maschenweite

Eine Möglichkeit, die Maschenweite zu verändern, ist die Verwendung von unterschiedlich langen PEG-Oligomeren. In den vorangegangenen Versuchen wurde PEG-2000-Diamin verwendet. Durch die Verwendung von PEG-3000-Diamin wird die Anzahl an EG-Einheiten von 46 pro PEG-Oligomer auf 69 erhöht. Unter Annahme einer Länge pro PEG-Einheit von $0,342 \text{ nm}^{[9]}$ bedeutet dies eine formale Erhöhung der Kettenlänge von 15,4 nm auf 23,6 nm. Dies führt zu einer Veränderung der chemischen Zusammensetzung der Schicht (Tabelle 10).

Tabelle 10: Vergleich zwischen aus der Stöchiometrie berechneten Zusammensetzung einer linearen und verzweigten Netzwerkeinheit und einer analysierten PEG-3000-Diamin-GE-Hydrogelschicht (5 mmol l^{-1} PEG 3000-Diamin und 5 mmol l^{-1} GE 100) – links: Elementaranalyse; rechts: hochaufgelöstes C1s-Spektrum.

PEG 3000 GE	C [at%]	O [at%]	N [at%]	C-C [C%]	C-N [C%]	C-O [C%]	C=O [C%]
linear	66,1	33,0	0,9		2,7	97,3	
verzweigt	66,3	32,8	0,9		2,4	97,5	
Experiment	68,7	30,3	1,0	3,0	1,2	91,0	4,8

Die Elementaranalyse zeigt, durch die Verringerung der Stickstoffkonzentration von 1,4 at % (PEG-2000-Diamin-GE-Schicht) auf 1,0 at %, dass eine PEG-Schicht entsprechend der Stöchiometrie eines PEG-3000-Diamin-GE-Netzwerkes gebildet wird. Im C1s-Spektrum sind die Abweichungen wiederum größer. Dies kann die selben Ursachen, wie bei dem schon vorgestellten Netzwerk aus PEG-2000-Oligomeren haben.

Die aus der Stöchiometrie berechneten Differenzen in der Elementaranalyse und den hochaufgelösten C1s-Spektren zwischen linearen und verzweigten Einheiten des Netzwerkes sind gering. Die ermittelte mittlere Abweichung für die Analysedaten einer PEG-Diamin-GE Schicht liegt in der Elementaranalyse zwischen +/- 0,1 at % (für

Stickstoff) und $\pm 0,3$ at % (für Kohlenstoff und Sauerstoff). In den Daten aus den C1s-Spektren liegt die mittlere Abweichung der Komponenten bei ca. $\pm 0,7 - 1,0$ %. Damit lässt sich aus den XPS-Spektren zwischen einer Schicht basierend auf PEG-2000-Diamin und PEG-3000-Diamin unterscheiden. Die Komponenten, mit denen sich die C1s-Spektren auswerten lassen, sind zu wenig isoliert, um eine ausreichende Genauigkeit über die Konzentrationsverhältnisse der Kohlenstoffatome abzuleiten. Dadurch lassen sich nur schwer Strukturinformationen ableiten. Eine Abhilfe kann die chemische Derivatisierung der Proben liefern.

In einer mit dieser Arbeit im Zusammenhang stehenden Publikation wurde gezeigt, dass eine Unterscheidung zwischen Aminen und Hydroxy-Gruppen nach Derivatisierung mit TFAA möglich ist. Dazu wird die unterschiedliche BE der CF_3 -Komponente des Trifluoracetamids und des Trifluoracetats verwendet.^[138] Wird die Probe zusammen mit einer geeigneten Referenz gemessen, z.B. einer PE-Folie, kann die Verschiebung des Spektrums auf den Referenzwert für C-C-Bindungen (285,0 eV) exakter durchgeführt werden. Die C-C-Einheiten im PE sind eine ideale Referenz, da die kernnahen Orbitale von keinem anderen Atom beeinflusst werden. Dadurch ist die Energiekorrektur der Spektren exakter durchführbar und es können die Proben besser miteinander verglichen werden. Dadurch konnte festgestellt werden, dass die Komponente des CF_3 -Kohlenstoffes (vgl. 2.2.2) in Abhängigkeit der derivatisierten Gruppe eine andere BE besitzt. Dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen Aminen und Hydroxygruppen in der selben Probe mit einer Messung.

Auf Basis der Analyse des Verhältnisses von Hydroxy- und Aminogruppen können weitere Aussagen zur Struktur des Netzwerkes abgeleitet werden. Im Schema 13 wurde gezeigt, dass die Reaktion zwischen dem Epoxid und einem primären Amin bzw. die Hydrolyse der Epoxid-Ringe zu unterschiedlichen Produkten führt, welche durch spezifische funktionelle Gruppen charakterisiert sind. Durch die Reaktion mit den primären Aminen des PEG-Diamins bildet sich durch die Ringöffnung ein sekundäres Amin und eine Hydroxy-Gruppe aus. Die Hydrolyse führt zu zwei Hydroxy-Gruppen. Aus dem Verhältnis von OH-Gruppen und den sekundären Aminen kann der Abstand zwischen zwei verzweigten Einheiten berechnet werden. In einer verzweigten Einheit beträgt das Verhältnis von OH- zu NH-Gruppen eins. Durch die Ringöffnung bildet sich eine OH-Gruppe und ein sekundäres Amin. Reagieren nur zwei der drei Epoxid-Ringe am GE mit dem PEG-Diamin, bildet sich in der Folge eine lineare Einheit aus und das Verhältnis von OH zu NH liegt bei zwei. Demzufolge bildet sich bei einem OH/NH-Verhältnis zwischen größer gleich 1 und kleiner gleich 2 ein Netzwerk aus. Ein

Verhältnis von über 2 kann auf eine Reaktion des GE mit sich selbst schließen lassen (Schema 14), da dabei sehr viele OH-Gruppen entstehen.

In Abbildung 17 ist das C1s-Spektrum eines PEG-2000-Diamin-GE-Netzwerkes nach Derivatisierung mit TFAA dargestellt. Bei der Auswertung der experimentellen Daten wurden die aus der Stöchiometrie bekannten Verhältnisse vorgegeben, d.h. die CF_3 -Komponente des Esters steht mit dem Esterkohlenstoff im gleichen Verhältnis. Analog gilt dies für die NH-Gruppe bzw. das Amid. Durch diese Vorgabe werden die Lösungsmöglichkeiten der Annäherung reduziert. Eine Nebenreaktion muss beachtet werden. TFAA reagiert auch mit Epoxiden,^[139] die Reaktion führt allerdings zu den gleichen Produkten wie eine Reaktion mit den OH-Gruppen eines hydrolysierten Epoxids und muss daher in den folgenden Betrachtungen nicht gesondert berücksichtigt werden.

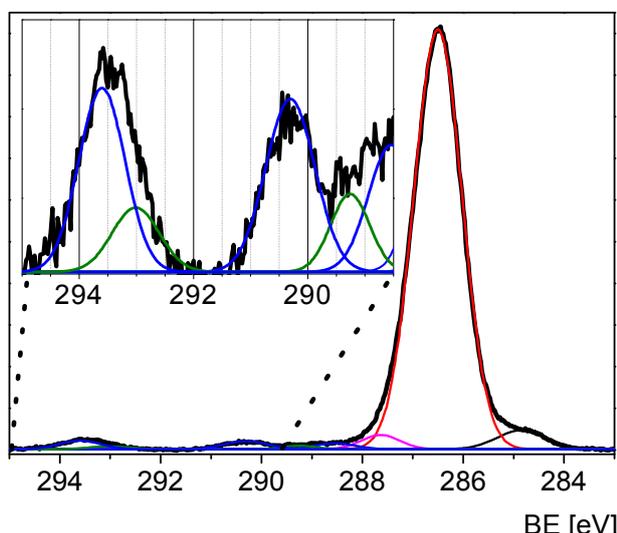


Abbildung 17: C1s-Spektrum einer PEG-2000-Diamin-GE-Schicht nach Markierung mit TFAA – neue Komponenten bei einer BE zwischen 293,6 eV – 293,7 eV: CF_3 des Esters (blau), 290,3 eV: Trifluoressigsäure-Kohlenstoff (blau); 293,0 eV – 293,1 eV; CF_3 -Komponente des Amids (grün), 289,3 eV: Trifluoroamid (grün)

Wird die CF_3 -Komponente mit höherer Auflösung dargestellt, ist die Unterscheidbarkeit zwischen NH- und OH-Gruppen anhand der Asymmetrie des Signals (schwarzes Spektrum, Abbildung 18) noch deutlicher zu erkennen. Diese Asymmetrie ist ein deutliches Zeichen dafür, dass das Spektrum besser durch zwei Komponenten beschrieben wird. Die CF_3 -Komponenten zeigen in den Spektren eine unterschiedliche BE-Position des Maximums. Die blaue Kurve stellt das Reaktionsprodukt mit den OH-Gruppen (Trifluoressigsäure) und die grüne das Reaktionsprodukt mit den sekundären Aminen (Trifluoroamid) dar. Auf diesen Ergebnissen aufbauend lässt sich eine Netzwerkanalyse durchführen.

Die Konzentration der primären Amine kann, auf Basis der Fluoreszenzmessungen, als klein angenommen werden, demzufolge sind die meisten Amine in sekundärer Form vorliegend. Sekundäre Amine entstehen durch die Netzwerkbildung.

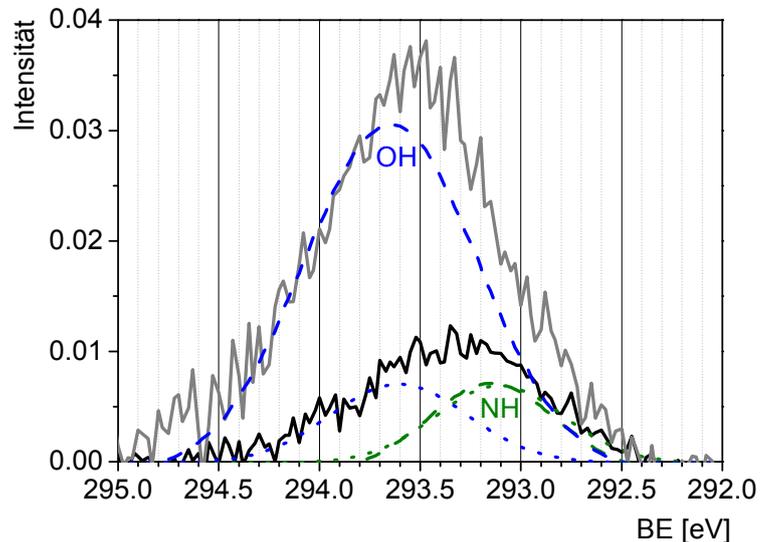


Abbildung 18: CF_3 -Komponenten des $\text{C}1\text{s}$ -Spektrums von Netzwerken mit unterschiedlicher chemischer Zusammensetzung – *grau* + gestrichelte Linien: hoher Anteil der Reaktion von GE mit sich selbst (Überschuss von GE bzgl. PEG-Diamin > 2), hohe Konzentration an OH-Gruppen und damit dem CF_3 -Ester (293,6 eV – 293,7 eV); *schwarz* + gepunktete Linien: Netzwerkbildung, das Verhältnis von OH (Trifluoracetat, blaue Kurve) zu NH (Trifluoracetamid, grüne Kurve (die Kurven aus beiden Spektren sind fast überlagert), bei 293,1 eV – 293,2 eV) liegt zwischen 1 und 2 (Verhältnis GE zu PEG-diamin 1)

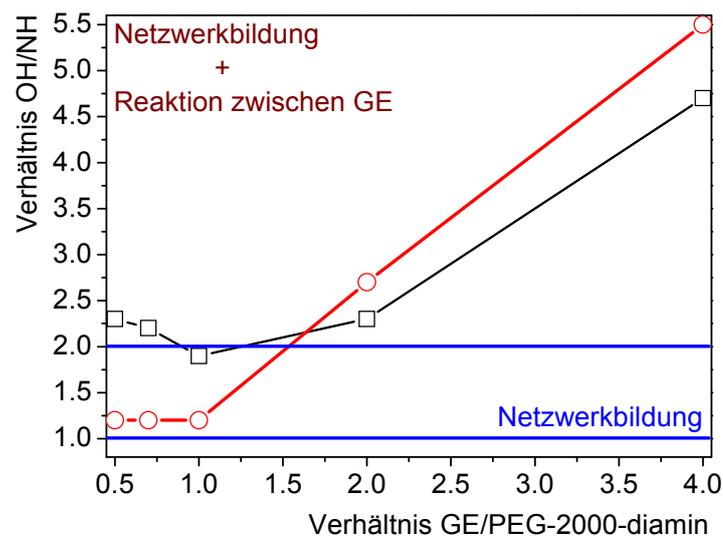


Abbildung 19: OH/NH-Verhältnis bei verschiedenen Verhältnissen von GE/PEG-2000-Diamin - \square : Reaktion bei RT; \circ : Reaktion bei 40°C

In einer auf der Bestimmung des Verhältnisses von OH zu NH-Gruppen basierenden Versuchsreihe wurde die Konzentration von GE, bei einer konstanten Konzentration des PEG-2000-Diamins (5 mmol l^{-1}), variiert (Abbildung 19). Der Grafik ist zu entnehmen, dass sich bei Raumtemperatur bei einem molaren Verhältnis von GE zu PEG-2000-Diamin um 1 ein Netzwerk bildet. Wird die Temperatur erhöht, bildet sich auch bei einem Überschuss an PEG-2000-Diamin ein Netzwerk aus. Oberhalb eines Verhältnisses von 1,5 kommt es im verstärkten Maße zur Reaktion des GE mit sich selbst (großer Überschuss von GE). Der im Vergleich zur Stöchiometrie zu niedrige Stickstoffgehalt in den Netzwerken deutet darauf hin, dass es bei jedem Verhältnis immer zu einem bestimmten Teil zu einer Reaktion des GE mit sich selbst kommt. Der Anteil dieser Reaktion lässt sich zum einen über die stöchiometrischen Verhältnisse der Edukte aber auch über die Temperatur steuern. Wird das PEG-2000-Diamin im Überschuss eingesetzt kommt es bei Raumtemperatur ebenfalls zu einer verstärkten Reaktion des GE mit sich selbst. In diesem Fall reicht die Konzentration des GE nicht aus, um zu einer Netzwerkbildung zu führen. Dies lässt sich damit begründen, dass die Reaktion des GE mit Diamin bei Raumtemperatur nicht vollständig verläuft. Durch Erhöhung der Temperatur lässt sich diese Reaktion mit höherem Umsatz führen. Dies ermöglicht eine Netzwerkbildung mit einem Überschuss an PEG-2000-Diamin. Allerdings ist die Dicke der Schichten dann geringer, was auf eine stärkere Vernetzung hindeuten kann.

Aus diesen Daten lassen sich die Abstände zwischen zwei verzweigten Einheiten bei einer erfolgreichen Netzwerkbildung (Verhältnis von PEG-diamin zu GE ~ 1), unter Annahme der Länge einer PEG-Einheit von $0,342 \text{ nm}^{[9]}$, von über 21 nm (OH/NH = 1,2 bei 40°C) und von 230 nm (OH/NH = 1,9 bei RT)) berechnen. Demzufolge ist die Vernetzung bei erhöhter Temperatur stärker, was auch der Erwartung entspricht. Die scheinbar große Maschenweite bei Raumtemperatur könnte auf die Reaktion des GE mit sich selbst zurückzuführen sein. Dadurch würde die OH-Gruppen-Konzentration stark ansteigen. Eventuell ist die Diffusionskonstante des PEG-Diamins bei Raumtemperatur zu klein. Somit kann der GE nicht mit hoher Ausbeute mit dem PEG-Diamin reagieren und es bildet sich auch das Selbstkondensationsprodukt

In Vorversuchen wurde neben einem PEG-Diamin ein trifunktionelles Aziridin-Derivat als eine Ausgangsverbindung für die Netzwerkbildung untersucht. Die Experimente zeigten, dass die Reaktion mit sich selbst stark bevorzugt ist. Beim GE ist die Reaktion mit sich selbst anhand der gefundenen Daten deutlich schwächer ausgeprägt.

4.2.1.3 Schichtdicke

Neben der Maschenweite ist die Schichtdicke ein Parameter welcher kontrolliert werden sollte. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen und molare Verhältnisse der Ausgangsstoffe untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss der Temperatur und der Reaktionszeit betrachtet. Als ein Indikator für eine Erhöhung der Schichtdicke der PEG-Schicht wurde, in erster Näherung, der Anstieg der C-O-Komponente mit der Reaktionszeit verwendet (Abbildung 20). Es ist anzumerken, dass sich nicht zwischen lateraler Bedeckung und Dicke der Schicht unterscheiden lässt. Es lässt sich aber eine Aussage darüber ableiten, ob die Schicht dicker als die Analysentiefe von XPS ist. Zudem ist das Netzwerk im XPS (unter Hochvakuum) kollabiert.

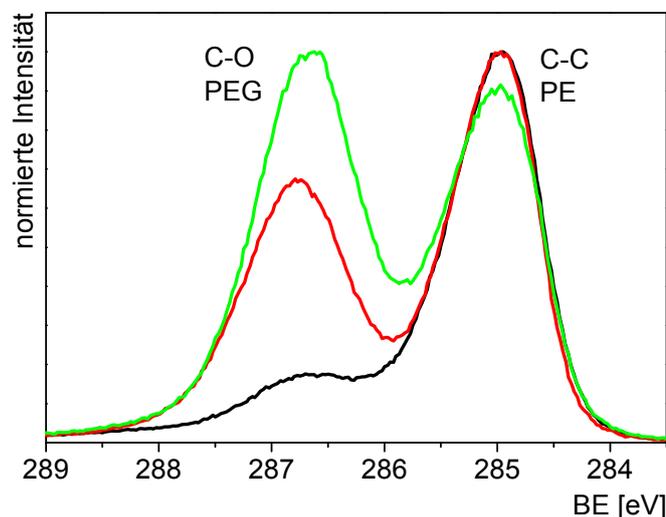


Abbildung 20: C1s-Spektrum einer PEG-2000-Diamin-GE-Schicht auf plasmaoxidiertem PE: Anstieg der C-O-Komponente mit der Reaktionszeit als Indikator für die Ausbildung eines PEG-Netzwerkes; Referenz: APPG 230 (schwarz), 4 h Reaktion (rot), 8 h Reaktion (schwarz)

Damit können die XPS-Daten zur Abschätzung der Dicke (im trockenen Zustand) im Bereich von ca. 10 nm verwendet werden. In Abbildung 21 ist die Entwicklung des Anteils der C-O-Komponente im Spektrum mit der Reaktionszeit zu erkennen, der nach der Stöchiometrie maximale Anteil der C-O-Komponente beträgt 96 %

Die Reaktion verläuft bei höherer Temperatur schneller, erreicht allerdings eine maximale Konzentration der C-O-Komponente (als Indikator für Dicke der PEG-Schicht), die niedriger ist als bei einer Reaktion bei Raumtemperatur.

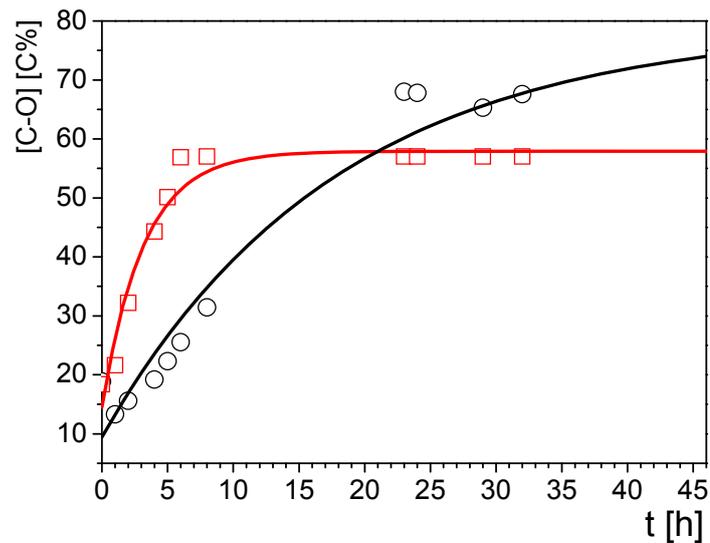


Abbildung 21: Anstieg der C-O-Komponente im C1s-Spektrum nach unterschiedlichen Reaktionszeiten – Konzentration der Ausgangslösung: $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$ PEG-2000-Diamin und $4,5 \text{ mmol l}^{-1}$ GE (Reaktion bei 50°C (rot) und bei RT (schwarz))

Zur Beschreibung dieses Ergebnisses kann ein qualitatives Modell verwendet werden, das von folgenden Annahmen ausgeht:

- I. Es findet eine Reaktion zwischen den Molekülen statt.
- II. Es erfolgt ebenfalls eine Reaktion zwischen den Molekülen und der Oberfläche.
- III. Beide Reaktionen werden durch die Erhöhung der Temperatur beschleunigt.

Wird die Reaktion zwischen den Molekülen in der Schicht stärker beschleunigt als die Anbindung an die Oberfläche selbst, werden die Netzwerkbestandteile nach einer bestimmten Zeit zu groß und binden nicht mehr an die Oberfläche an. In der Folge werden sie im Reinigungsschritt als Überschuss entfernt. Dies zeigt sich in einem konstanten Anteil der C-O-Komponente.

Die Kopplung auf der Oberfläche wird durch die Konzentration der Ausgangsstoffe und durch das molare Verhältnis von GE zu den PEG-Diamin-Oligomeren beeinflusst.

Zur Untersuchung dieses Einflusses wurden die Ausgangsstoffe in unterschiedlichen Verhältnissen auf die Oberfläche gegeben.

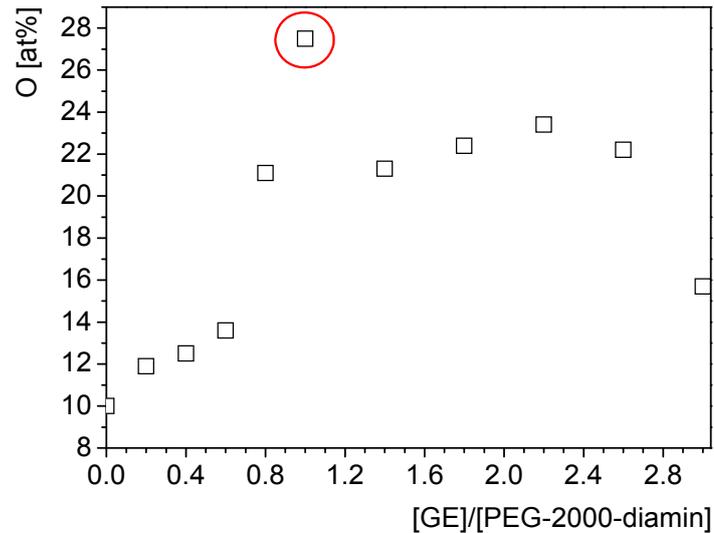


Abbildung 22: Zunahme des Sauerstoffanteils in der analysierten Schicht in Abhängigkeit der Konzentration von GE in der Beschichtungslösung bei einer konstanten Konzentration von $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$ für PEG-2000-Diamin (aufgetragen aus THF)

Aus Abbildung 22 lässt sich ein optimales Verhältnis für eine Netzwerkbildung, erkennbar an der Erhöhung der Sauerstoffkonzentration, zwischen dem GE und dem PEG-Diamin von $1,25 - 0,8$ erkennen. Es ist ein Maximum der Sauerstoffkonzentration bei ein Verhältnis von 1 zu finden. Dieser Wert liegt mit $27,5 \text{ at } \%$ nahe an der aus Stöchiometrie berechneten Maximalkonzentration von $32,5 \text{ at } \%$. Die Abbildung zeigt weiterhin, dass die Reaktion zuverlässiger mit einem Überschuss von GE (> 1 ($2,5 \text{ mmol l}^{-1}$) – $2,6$ ($6,5 \text{ mmol l}^{-1}$)) verläuft. Der Konzentrationsbereich für einen Überschuss an PEG-2000-Diamin ist wesentlich kleiner und liegt bei einem Verhältnis von $0,8$ bis < 1 , dies entspricht einer Konzentration von $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ bis $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$ für den GE.

Entsprechend der Anzahl der funktionellen Gruppen in den Molekülen (2 im PEG diamin, 3 im GE) muss zum Erreichen der gleichen Anzahl an Gruppen ein Verhältnis von $0,7$ für den Glycidyl-Glycerolether bezüglich des Diamins eingestellt werden. Dies entspricht beispielsweise einer Konzentration von $1,7 \text{ mmol l}^{-1}$ für den GE bei einer Konzentration von $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$ für das PEG-Diamin. In den Experimenten wurde ein optimales Verhältnis der beiden Edukte (GE/PEG 2000-diamin) zwischen $0,8 - 1,25$ ermittelt.

Für einige Anwendungen können Schichten mit einer Dicke von größer als 10 nm von Interesse sein. Aus diesem Grund wurden die folgenden Untersuchungen zur Veränderung der Schichtdicke mittels Ellipsometrie durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden PE-Schichten auf goldbeschichteten Objektträgern hergestellt

und analog den Untersuchungen mit einer Folie verfahren (vgl. 3.3.2). Im Gegensatz zu XPS wird der Film mittels Ellipsometrie unter Atmosphärenbedingungen untersucht.

Von jeder PE-Schicht wurde die Dicke bestimmt. Diese nimmt Eingang in die weiteren Untersuchungen. Abbildung 23 zeigt die mit einem CAUCHY-Modell gefitteten ellipsometrischen Messungen von PE-Schichten auf goldbeschichteten Substraten.

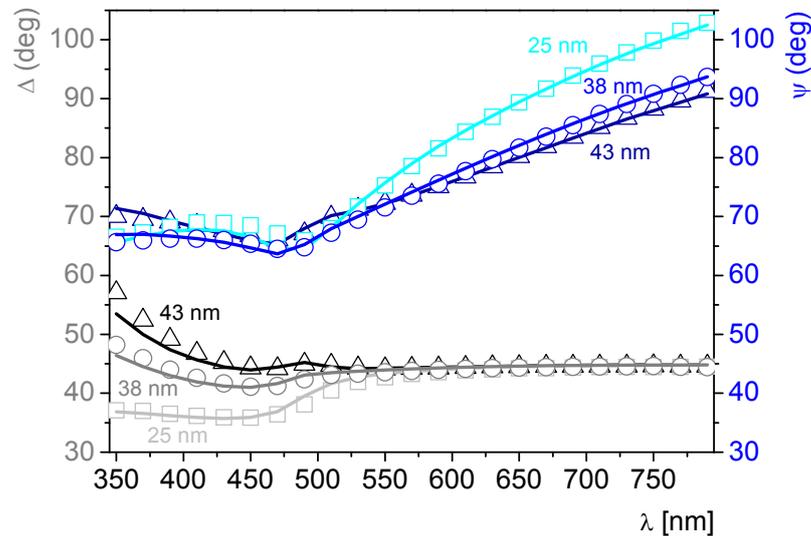


Abbildung 23: Veränderung von Ψ (Blautöne) und Δ (Schwarzttöne) mit der Wellenlänge – durchgezogene Kurven = Fit, Symbole = Messwerte, unterschiedlich Dicke PE-Schichten auf Gold (dunkel = 43 (0,9) nm; mittel = 38 nm (0,5), hell = 25 nm (1,2))

Als Brechungsindex wurde 1,51 vorgegeben, wobei die Annahme getroffen werden muss, dass der Brechungsindex den gleichen Wert wie bei einer Folie annimmt. Die Messungen der Dicke der PE-Schicht (auf dem Substrat) wurde vor und nach der Plasmaaktivierung und Kopplung von APPG 230 durchgeführt. Die ermittelten Schichtdicken liegen zwischen 20 und 60 nm (von jeder Probe wird die Schichtdicke bestimmt). Im Durchschnitt konnte eine Abnahme der Dicke des PE-Filmes nach Plasmaaktivierung und Anbindung des Diamins von 4 nm festgestellt werden.

Auf den PE-Schichten mit APPG-230 wurden im Anschluss die PEG-Netzwerke hergestellt und deren Dicke, unter Berücksichtigung der Dicke der PE-Schicht, ermittelt.

Dazu wurde die Dicke der PE-Schicht und der Brechungsindex von PE (1,51) aus der vorhergehenden Messung festgesetzt. Der Brechungsindex vom PEG wurde mit 1,46 vorgegeben. Als variabler Parameter wurde die Dicke der PEG-basierten Schicht gewählt (Abbildung 24).

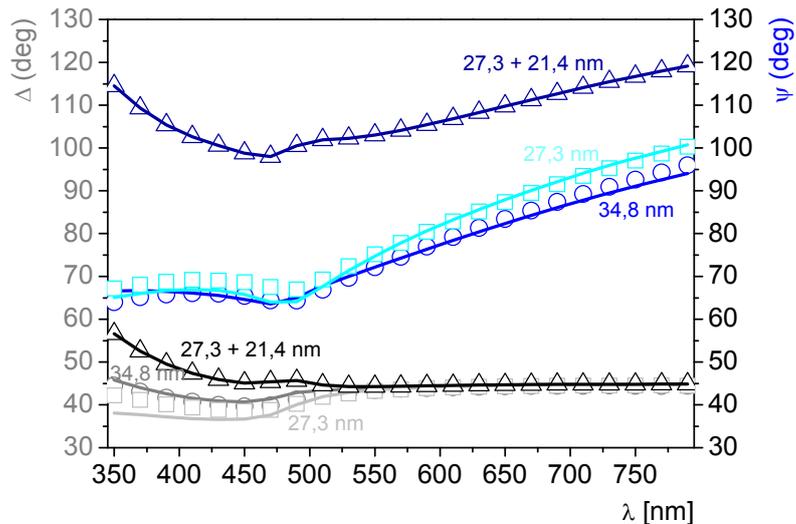


Abbildung 24: Veränderung der ellipsometrischen Parameter (Ψ und Δ) nach der Synthese eines PEG-2000-Diamin-GE-Netzwerkes auf einer PE-Schicht nach Plasmaaktivierung und mit APPG-230 auf einem goldbeschichteten Objektträger – dunkel = 27,3 + 21,4 nm (PE + PEG-2000-Diamin-GE); mittel = 34,8 nm (PE vor Aktivierung); hell = 27,3 nm (PE nach Aktivierung und Kopplung von APPG-230)

Es wurde die Schichtdicke eines Netzwerkes aus PEG-3000-Diamin und GE in Abhängigkeit der Reaktionszeit untersucht. Daneben wurde das Verhältnis von GE zu PEG-Diamin variiert. Das PEG-3000-Diamin wurde aus einer 5 mmol l^{-1} Lösung in Ethanol auf die Oberfläche aufgetragen. Die Konzentration vom GE wurde auf 5 mmol l^{-1} bzw. 10 mmol l^{-1} eingestellt. In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass die Dicke der Schicht mit höherer Konzentration an GE innerhalb der gleichen Zeit deutlich größer ist aber einen niedrigeren Maximalwert von ca. 50 nm erreicht.

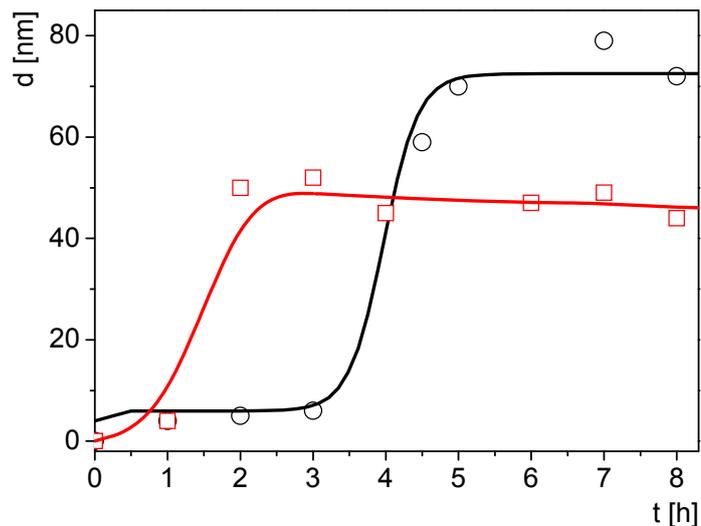


Abbildung 25: Zunahme der ellipsometrischen Dicke einer PEG-3000-Diamin-GE-Schicht mit der Zeit – Beschichtungslösungen: 5 mmol l^{-1} PEG-3000-Diamin-Lösung mit 5 mmol l^{-1} (schwarz) bzw. 10 mmol l^{-1} (rot) GE

Die Verringerung des Anteils an GE in der Beschichtungslösung führt zu einer langsameren Zunahme der Dicke der Schicht. Dafür wird eine größere Maximaldicke erreicht.

Mit der folgenden Gleichung (6) lässt sich die Schichtdicke d von Molekülen auf einem Substrat berechnen:

$$d = \frac{c_L \cdot M \cdot h_L}{\rho_S} \quad (6)$$

Wobei c_L die molare Konzentration der Moleküle in der Lösung, M die molare Masse des Stoffes, h_L die Dicke des Lösemittelfilmes auf dem Substrat und ρ_S die Dichte des Filmes auf dem Substrat repräsentiert. Die Dicke des Lösemittelfilmes h_L (Gleichung 7) lässt sich über die Geschwindigkeit des Herausziehens der Folie v , die Viskosität η_L und die Dichte ρ_L der Lösung berechnen.^[140]

$$h_L = \sqrt{\frac{2 \cdot v \cdot \eta_L}{9 \cdot \rho_L \cdot g}} \quad (7)$$

Somit beträgt die berechnete Gesamtdicke der Reagenzien auf der Oberfläche, aufgetragen aus einer Lösung mit 5 mmol l^{-1} GE und 5 mmol l^{-1} PEG-Diamin, ca. 100 nm und mit 10 mmol l^{-1} GE ca. 107 nm. Es zeigt sich, dass der größte Zuwachs der Schichtdicke durch das PEG-3000-Diamin erreicht wird. Die experimentell bestimmten und die berechneten Schichtdicken stimmen nicht vollkommen überein. Dies zeigt, dass nicht alle PEG-Oligomere kovalent im Netzwerk an der Oberfläche gebunden werden. Der berechnete Wert wird bei einer geringeren Konzentration von GE zu 75 % erreicht. Bei der doppelten Konzentration des GE sind es 44 %. Damit unterstützt das Ergebnis die im vorhergehenden Abschnitt aufgestellte Hypothese. Durch Erhöhen der Konzentration einer Komponente wird die Reaktion beschleunigt, die Fragmente wachsen schneller und das kovalente Anbinden der größeren Moleküle des Netzwerkes an die Oberfläche wird erschwert, was in der Folge zu einer geringeren Schichtdicke führt.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von unterschiedlich langen PEG-Diamin-Oligomeren auf die Bildung des Netzwerkes untersucht. Dazu wurde das Netzwerk zum einen mit PEG-2000- und PEG-3000-Diaminen gebildet. Durch die Verwendung von PEG-3000 anstelle von PEG-2000 wächst die Maschenweite formal um einen Faktor von 1,5. Die Konzentration der beiden netzwerkbildenden Komponenten, das PEG-Diamin-Oligomer und der GE, wurde auf 5 mmol l^{-1} festgesetzt. In Abbildung 26 ist die Schichtdicke in Abhängigkeit der Reaktionszeit

dargestellt. Die Reaktion führt unter Verwendung von PEG-2000-Diamin nach 4 h zum Erreichen einer maximalen Schichtdicke von 20 nm. Bei der Verwendung von PEG-3000-Diamin wird die maximale Dicke nach 5,5 h erreicht. Sie ist mit ca. 70 nm wesentlich größer, als bei der Verwendung des PEG-2000-Oligomers. Die Schichtdicken unterschieden sich mit einem Faktor von 3,5. Damit ist die Zunahme der Dicke nicht proportional der Zunahme der Kettenlänge (oder der molekularen Masse) des Oligomers.

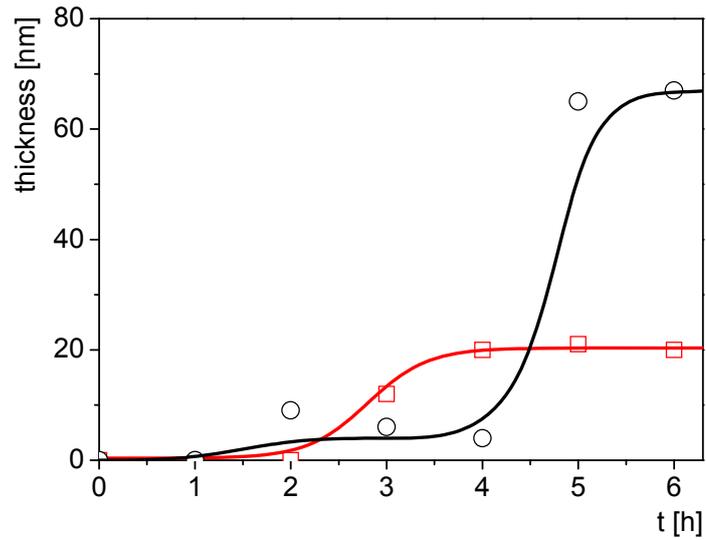


Abbildung 26: Ellipsometrische Dicke einer PEG-Diamin-GE Schicht in Abhängigkeit der Reaktionszeit unter Verwendung von PEG-2000-Diamin (rot)- und PEG-3000-Diamin (schwarz) – die Konzentration der Komponenten in der Lösung beträgt je 5 mmol l^{-1}

Die zu erwartende Schichtdicke liegt bei der Verwendung von PEG-2000-Diamin bei ca. 70 nm und bei PEG-3000-Diamin bei ca. 100 nm, dass heißt der zu erwartende Wert wird bei der Verwendung von PEG-2000-Diamin zu 30% und bei PEG-3000-diamin zu 70% erreicht.

Die mögliche Erklärung basiert wiederum darauf, dass die Reaktion mit PEG-2000-Diamin schneller verläuft, da die Diffusionskonstante des kleineren PEG-2000-Oligomers größer ist und daher in der gleichen Zeit größere Netzwerkfragmente gebildet werden, welche dann nicht mehr an die Oberfläche anbinden können. Eine wesentliche Einschränkung der angestellten Betrachtungen lässt sich darin finden, dass die Dichte des PEG-Filmes selbst nicht bekannt ist. Diese wird benötigt, um die theoretische Schichtdicke zu berechnen. In den Berechnungen wurde daher von der Dichte der Ausgangsstoffe ausgegangen. Die Dicke des PEG-Filmes selbst ist abhängig von den Umgebungsbedingungen. Einen wesentlichen Einfluss auf die Dicke des Filmes hat der Wassergehalt. Es ist anzunehmen, dass der Film gebunden auf einem

Substrat in Wasser zu 99% aus Wasser besteht und sich daher nur schwer vom Quellungsmittel unterscheiden lässt. Einen alternativen Zugang können Quellungsuntersuchungen in feuchtem Gas darstellen.

Dazu wurden die mit Netzwerken funktionalisierten Substrate in die in Abschnitt 3.1.3 vorgestellte Zelle gelegt. Wie in Abbildung 27 gezeigt wird, werden die ellipsometrischen Parameter vom Aufbau wenig beeinflusst.

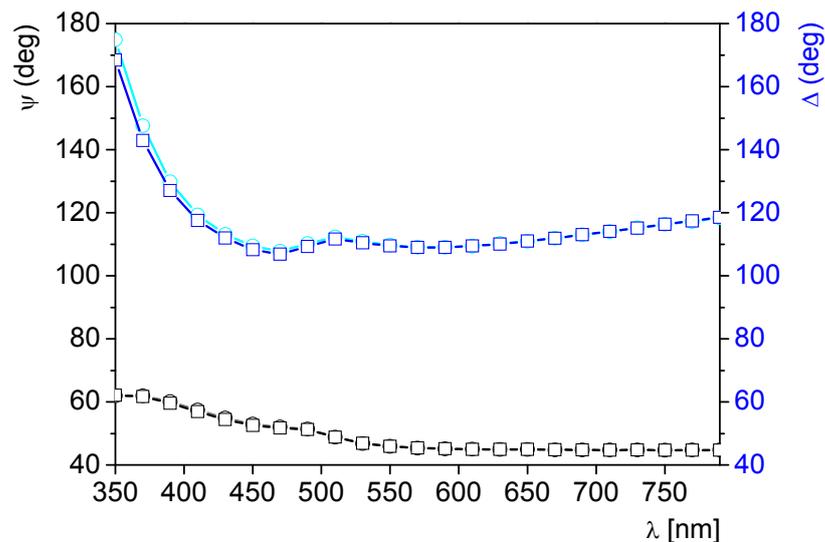


Abbildung 27: Validierung der verwendeten Messzelle – Messung des ellipsometrischen Spektrums einer PE-Schicht auf Gold mit (helle Farben) und ohne (dunkle Farben) Küvette (in beiden Fällen: $\Phi_1 = \Phi_2 = 60^\circ$)

Nach dem Einlegen der Probe wurde die Zelle mit wassergesättigtem Stickstoff gespült und Spektren in Abhängigkeit der Zeit aufgenommen. Die Beschreibung erfolgte wiederum als Zweischichtsystem aus PE + PEG auf einem Goldsubstrat. Im Unterschied zu den vorhergehenden Untersuchungen wurde die PEG-Schicht als eine Mischung mit Wasser beschrieben. In Abbildung 28 ist der Fit eines durch Einlagerung von Wasser veränderten Spektrums eines PEG-Netzwerkes dargestellt. Demnach liegt der Wasseranteil der Schicht im gequollenen Zustand zwischen 80 – 95%.

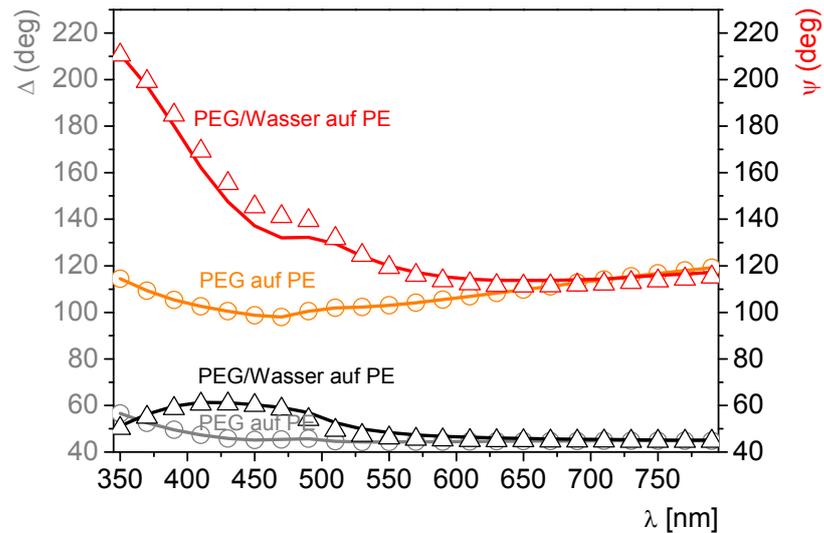


Abbildung 28: Veränderung der ellipsometrischen Parameter einer PEG-Schicht auf einem goldbeschichteten Substrat durch Aufnahme von Wasser aus einem wassergesättigten Stickstoffstrom – rötlicher Farbton = Ψ ; schwarzer Farbton = Δ (Kreise = Messwerte PEG-Film: 21 nm; Dreiecke = Messwerte PEG-Film + Wasser: 66 nm)

Um die Zeitdauer bis zur maximalen Quellung zu bestimmen wurden kinetische Untersuchungen zur Quellung der Schichten unter erhöhter Luftfeuchtigkeit (95 – 99%) vorgenommen (Abbildung 29).

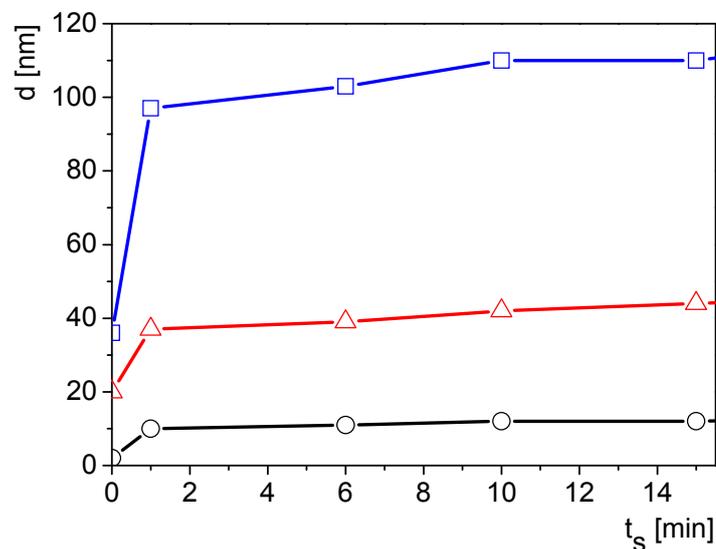


Abbildung 29: Kinetik der Quellung PEG-2000-Diamin-GE-Hydrogelschichten auf einer PE-Schicht getragen durch einen goldbeschichteten Objektträger

Es lässt sich sehr gut erkennen, dass die Quellung der Gelschichten in Luftfeuchtigkeit in weniger als einer Minute zu einem konstanten Wert führt. In Wasser sollte die Quellung der Gelschichten noch schneller erfolgen. Diese hohe Quellgeschwindigkeit ist ein Indikator für die große Maschenweite der hergestellten Gelschichten. Basierend

auf der Kenntnis der Quellkinetik konnten Untersuchungen zum Quellungsgrad verschiedener Schichten durchgeführt werden. Dazu wurden PEG-2000-Diamin-Netzwerke aus verschiedenen konzentrierten GE-Lösungen hergestellt. In Tabelle 11 lässt sich erkennen, dass bei äquimolarem Einsatz der Ausgangsstoffe ein Quelfaktor* von 2,5 – 3 erreicht wird. Wird das Netzwerk mit einem zweifachen Überschuss an GE gebildet wird ein Quelfaktor von 1,9 – 2,3 ermittelt.

Tabelle 11: Quellungsgrad verschiedener PEG-2000-Diamin-Gelschichten auf PE (hergestellt aus einer 5 mmol l⁻¹-Lösung in Ethanol)

c_{GE} [mmol l ⁻¹]	$d_{trocken}$ [nm]	$d_{gequollen}$	Faktor
5	6	15	2,5
5	12	32	2,7
5	20	66	3,3
5	36	112	3,1
10	9	21	2,3
10	11	24	2,2
10	17	33	1,9
10	35	81	2,3

Dies lässt sich damit erklären, dass mit der Verdopplung der Konzentration von GE ein höherer Anteil des Vernetzungsproduktes des GE gebildet wird. Dieses stärker vernetzte und engmaschigere Nebenprodukt quillt weniger als ein PEG-Diamin-GE-Netzwerk.

In der Literatur sind Untersuchungen zum Quellungsgrad von anderen EG-basierten Schichten auf Oberflächen zu finden. Bilen et. al. hat die Quellung von auf PEG-MA basierten Kammpolymeren auf goldbeschichteten Substraten mittels optischer Wellenleiterspektroskopie (OWLS) untersucht. Dabei wurde ein Quellungsgrad bei einer Luftfeuchtigkeit von max. 98 % von 1,2 bestimmt.^[120] Eine mit einem Elektronstrahl vernetzte PEG-5000-Schicht auf Siliziumsubstraten zeigt in Wasser einen Quellungsgrad von 5.^[141] Die in der vorgestellten Untersuchung bestimmten Quelfaktoren ordnen sich gut in die Werte anderer Untersuchungen ein. Es ist anzumerken, dass die Experimente mit befeuchtetem Stickstoff und nicht in Wasser durchgeführt wurden. Die Gelschichten werden in Wasser verwendet und sollten unter diesen Bedingungen noch stärker quellen als in den vorgestellten Versuchen ermittelt wurde.

* Der Quelfaktor ergibt sich aus dem Verhältnis der Schichtdicke nach der Quellung zum trockenen Zustand.

Im Vergleich dazu quellen nicht oberflächengebundene PEG basierte Gele noch stärker, so sind Quellfaktoren für ein auf PEG-MA basierendes Gel (hergestellt über radikalische Polymerisation) von 30 zu finden.^[142] Dies kann die Vermutung nahe legen, dass die Werte für die Quellung von PEG-Netzwerken auf Oberflächen eher zu niedrig sind.

4.2.1.4 Stabilität

Im Hinblick auf eine Anwendung der Gelschichten im diagnostischen- bzw. biomedizinischen Bereich ist ihre Stabilität von Bedeutung.

Viele biochemische Experimente werden in Puffersystemen unter unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Aus diesem Grund wurde die Stabilität der Gelschichten in Puffersystemen mit unterschiedlichem pH-Werten untersucht. Als Indikator wurde die Konzentration des Sauerstoffes aus der XPS-Analyse heran gezogen. Wie in der Abbildung 30 zu erkennen ist, ist die Gelschicht bei verschiedenen pH-Werten über einen Zeitraum von einer Stunde stabil.

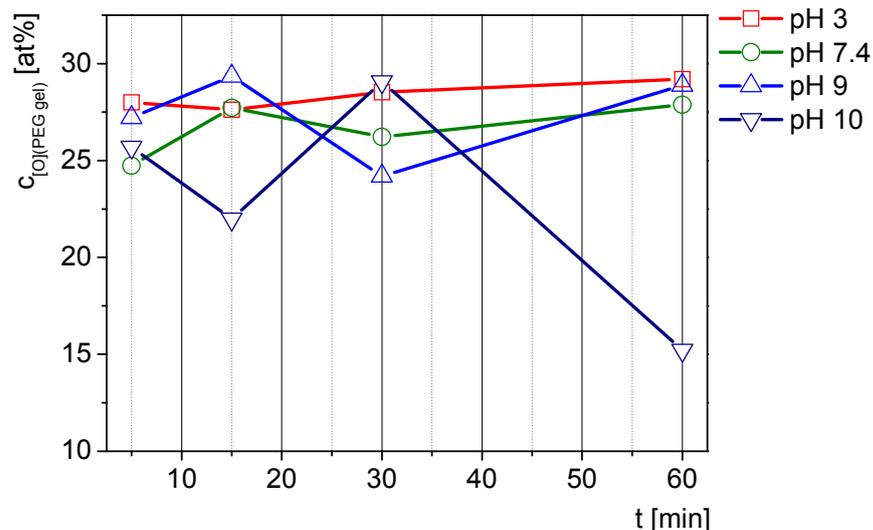


Abbildung 30: Konzentration des Sauerstoffes als Indikator für die Stabilität der Gelschichten in Puffersystemen mit unterschiedlichem pH-Wert

Einzig unter sehr basischen Bedingungen ist ein starkes Schwanken der Werte festzustellen. Wird die Gelschicht über einen Zeitraum von einer Stunde in einem basischen Puffer geschüttelt, zeigt sie einen starken Abbau. Eine Erklärung kann die Hydrolyse der Amidbindung mit der Oberfläche sein. Es sei angemerkt, dass die Daten nur über eine komplette Abspaltung des Gels Auskunft geben können.

Die Gelschicht ist im pH-Bereich zwischen 3 – 9 stabil. In diesem Bereich finden die meisten biochemischen Experimente statt, daher ist die Funktionalisierung für diese Anwendungen geeignet.

4.2.1.5 Homogenität

Zur Untersuchung der lateralen Homogenität der Schicht wurden REM-Messungen auf einem Goldsubstrat mit einer PE-Schicht und einem PEG-2000-Diamin-GE-Netzwerk durchgeführt. Die Aufnahmen lassen keine Hinweise auf eine signifikante morphologische Abweichung erkennen (Abbildung 31). Einzig ein paar helle Punkte sind zu erkennen, deren Größe in der Fläche kleiner als 5 μm ist.

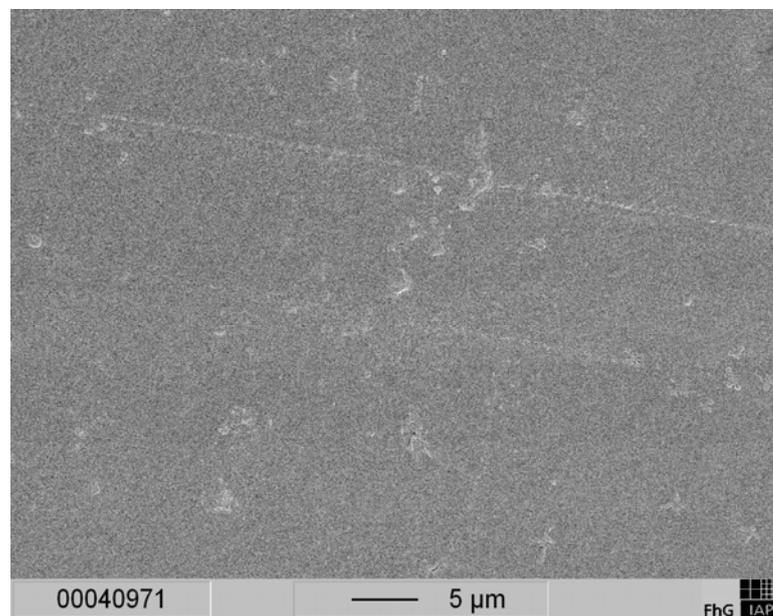


Abbildung 31: REM-Aufnahmen eines PEG-Diamin-GE-Gels nach Bedampfen mit Platin

Aus den XPS-Daten abgeleitet, kann es sich bei den weißen Flecken nicht um die Gelschicht handeln. Die Fläche, welche durch XPS während einer Messung erfasst wird, beträgt in den vorgestellten Untersuchungen $500\,000\ \mu\text{m}^2$. Würden nur die weißen Flecken die Gelschicht repräsentieren und der graue Bereich das Substrat, würde keine der Stöchiometrie entsprechende Zusammensetzung gemessen werden können. Durch XPS werden maximal die oberen 10 nm des Netzwerkes erfasst. Dies würde bedeuten, dass selbst wenn die hellen Flecken eine Dicke von über 10 nm hätten, wäre die Gesamtfläche immer noch zu klein, um die mit XPS gemessenen Daten zu erklären. Es soll Erwähnung finden, dass sich durch die Tauchbeschichtung am unteren Ende der Folie, in Folge der Stauung der Lösung, sichtbare Punkte bilden

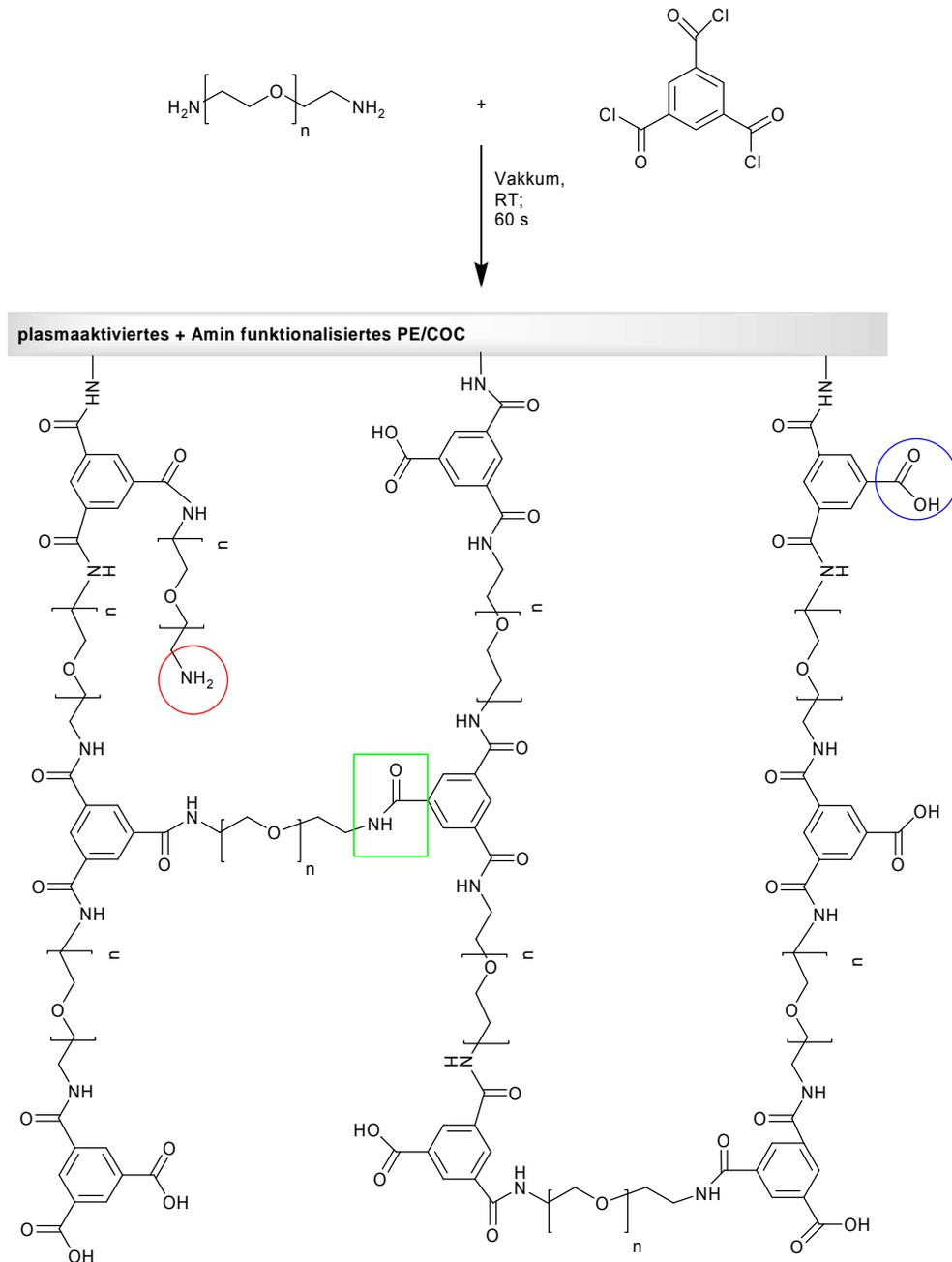
können. Durch eine andere Auftragstechnik, z.B. durch Sprühen, ist es eventuell möglich diese Abweichungen zu vermeiden.

4.2.2 PEG-Säurechlorid-Netzwerk

4.2.2.1 Prinzip

Eine zweite Strategie, Oberflächen mit dünnen Schichten zu versehen, basiert auf der Knüpfung von Amidbindungen. Dazu werden PEG-Diamine mit Säurechloriden auf dem Substrat zur Reaktion gebracht (Schema 15).

Im Vergleich zu den PEG-Diamin-GE-Netzwerken werden die beiden Ausgangsstoffe nicht in einem Schritt auf die Oberfläche aufgetragen. Zuerst wird das PEG-Diamin auf die Oberfläche aufgetragen. Dies kann durch verschiedene Verfahren, wie zum Beispiel Sprühen oder Aufschleudern geschehen. In den Untersuchungen wird der erste Ausgangsstoff, das PEG-Oligomer, wiederum durch eine Tauchbeschichtung aufgegeben. In der nächsten Stufe wird, unter Ausnutzung des vergleichsweise hohen Dampfdruckes, ein trifunktionelles Säurechlorid auf die Oberfläche aufgebracht. Dort kommt es direkt oder im Anschluss, nach dem Benetzen mit einem Lösemittel, zur Reaktion. Durch die Reaktion zwischen den Säurechloriden und den Aminen bildet sich ein Amid. Reagiert das Säurechlorid nicht mit einem Amin, hydrolysiert es an der Atmosphäre zügig zu einer Carbonsäure. Daneben sind im Netzwerk noch primäre Amine zu erwarten, welche aus einer unvollständigen Reaktion stammen. In Abbildung 32 ist das C1s-Spektrum eines PEG-2000-Diamin-BTC-Netzwerkes mit den Komponenten für die verschiedenen Kohlenstoffatome dargestellt.



Schema 15: Bildung eines Netzwerkes aus PEG-Diaminen und einem trifunktionellen Säurechlorid auf einer mit Aminogruppen funktionalisierten Polymeroberfläche unter Ausbildung von Amidbindungen (grüner Kasten). Daneben weist das Netzwerk Carbonsäuregruppen (blauer Kreis) und primäre Amine (roter Kreis) auf.

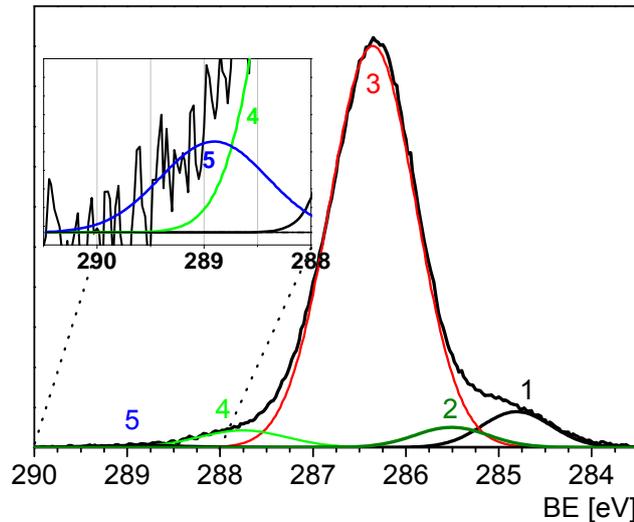


Abbildung 32: C1s-Spektrum eines PEG-2000-diamin-BTC-Netzwerkes auf einem plasmaaktivierten und mit APPG-230 funktionalisierten PE-Substrat – 1: C=C/C-C-Komponente, 2: C-N-Komponente, 3: C-O-Komponente, 4: CONH-Komponente, 5: COOH-Komponente

Wie auch im PEG-Diamin-GE-Netzwerk repräsentiert die größte Komponente mit einer Bindungsenergie von 286,5 eV die Kohlenstoffatome mit einer Einfachbindung zum Sauerstoff, welche den EG-Einheiten zugeordnet werden können. Bei 284,8 eV ist das Spektrum mit einer Komponente beschrieben, welche sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome, aus den Doppelbindungen des Benzen-1,3,5-tricarbonsäurechlorides (BTC), repräsentiert. Diese Komponente kann auch einige Kohlenstoffatome vom Substrat beinhalten, da die zu erwartende Verschiebung (Ref. [95]) zwischen der C-C- und C=C-Komponente, mit ca. 0,3 eV, sehr klein ist und daher eine Unterscheidung schwer möglich ist. Bei einer BE von 285,5 eV ist die Komponente dargestellt, welche dem Kohlenstoff mit einer Bindung zum Stickstoff zugeordnet werden kann. Der entsprechende Kohlenstoff im Amid selbst lässt sich mit der gleichen Konzentration bei einer BE von 287,9 eV finden. Bei einer BE von 289,2 eV ist das Spektrum mit einer Komponente zu beschreiben, welche auf Kohlenstoff in COOH-Gruppen schließen lässt.

Neben den hochauflösenden C1s-Spektren wurden ebenfalls N1s- und O1s-Spektren aufgenommen. Das N1s-Spektrum kann mit einer Komponente bei 399,8 eV ausgewertet werden. Diese repräsentiert die Stickstoffatome in den Amiden. Das O1s-Spektrum wird durch eine Hauptkomponente um 532,7 eV am besten angenähert.

Auf Grund der ähnlichen Bindungsenergie der 1s-Elektronen im Kohlenstoff in C-C und C=C Bindungen, lässt sich mittels XPS in dem vorgestellten Beispiel keine Unterscheidung zwischen Kohlenstoff in Einfach- oder Doppelbindungen vornehmen. Aus diesem Grund wurden NEXAFS-Spektren von einer PEG-2000-diamin-BTC-

Schicht aufgenommen, da diese Methode sehr empfindlich für die konjugierten Doppelbindungen im aromatischen System ist. Zudem lassen sich über winkelabhängige Messungen (wobei der Winkel der Polarisationssebene variiert wird) Aussagen zur Orientierung der Moleküle in dem Netzwerk treffen.

Im Spektrum des Kohlenstoffes eines PEG-2000-Diamin-BTC-Netzwerkes sind alle zu erwartenden Signale zu finden (Abbildung 33).

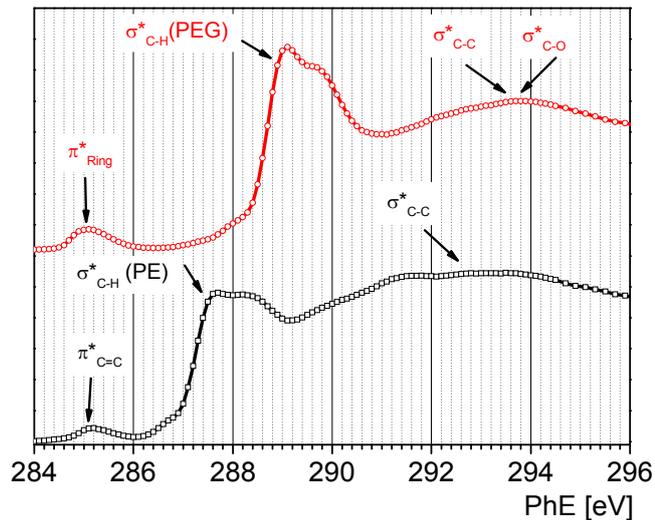


Abbildung 33: NEXAFS-Spektrum der K-Kante des Kohlenstoffes – schwarz: PE als Referenz; rot: PEG-2000-Diamin-BTC-Netzwerk

Mit einer Photonen-Energie von 289,0 eV ist der $C1s \rightarrow \pi^*$ -Übergang der Elektronen im Kohlenstoff der EG-Einheiten^[143] zu finden. Im Vergleich dazu liegt der $C1s \rightarrow \pi^*$ -Übergang der CH-Einheiten in der PE-Referenz mit einer Photonen-Energie von 287,6 eV bei einer niedrigeren Energie als in den sauerstoffhaltigen EG-Einheiten. Ein ähnliches Ergebnis wurde von Dhez et. al. veröffentlicht.^[144] Um 293,5 eV sind die Signale der $C1s \rightarrow \sigma^*$ Übergänge der Elektronen im Kohlenstoff der C-O- (PEG) und C-C- (PE) Einheiten im Spektrum zu erkennen.^[145] Von besonderer Bedeutung für den Nachweis der Phenyleinheiten ist der Bereich um 285 eV, welcher den $C1s \rightarrow \pi^*$ -Übergang darstellt.^[144] Dieser lässt sich ebenfalls im plasmaaktivierten PE finden, das Signal ist in den PEG-Diamin-BTC-Netzwerk noch stärker ausgeprägt, was auf die Phenyleinheiten aus dem BTC hindeutet. Eine weitere Ursache von Doppelbindungen können Reaktionsprodukte durch Einwirkung der Röntgenstrahlung sein.^[143]

Zum Nachweis von Amidbindungen in der PEG-Diamin-BTC-Schicht wurde der N1s-Bereich untersucht (Abbildung 34). Zur Interpretation der Messung wurde eine Veröffentlichung von Graf et. al. herangezogen, welche eine Untersuchung von Absorptionen von Stickstoffatomen darstellt.^[146]

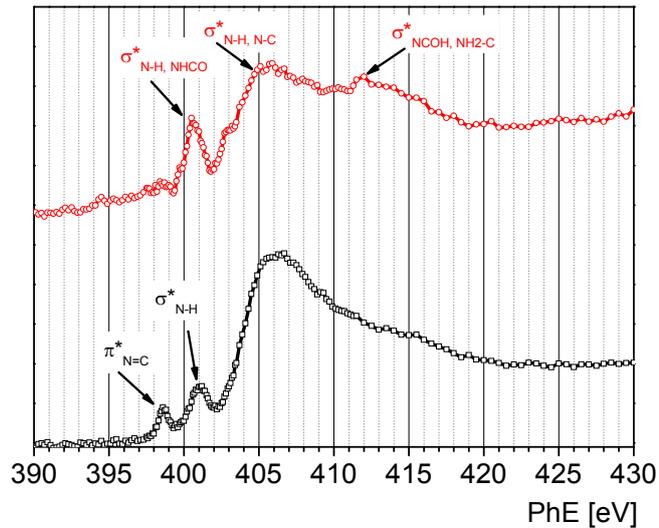


Abbildung 34: NEXAFS-Spektrum der N1s-Region – schwarz: PE + Diamin als Referenz; rot: PEG-2000-diamin-BTC-Netzwerk

Ein deutliches Signal lässt sich bei 400,5 eV finden. Dieses deutet auf Stickstoff in Verbindung mit Wasserstoff oder Kohlenstoff hin. Bei 411,8 eV ist ein Peak zu erkennen, welcher auf Stickstoff in Amidbindungen schließen lässt. Im Referenzspektrum, PE + Diamin (1,2-Diaminoethan), wurde bei einer Photonenenergie von 398,5 eV eine N=C-Bindung gefunden.

In einem weiteren Experiment, wurde das Kohlenstoffspektrum mit unterschiedlichen Winkeln der Polarisationssebene der eingestrahlten Röntgenstrahlung aufgenommen. Dabei wurde kein Einfluss des Winkels der eingestrahlten Strahlung festgestellt. Daraus lässt sich schließen, dass es in dem Netzwerk zu keiner Ausbildung einer Ordnung kommt und die Schicht als amorph beschrieben werden kann. Daraus ableitbar scheint es nicht zu einer Kristallisation des PEG's zu kommen.

Zur Bestimmung der Flächenkonzentration der COOH-Gruppen im Netzwerk wurde mit Dansylcadaverin markiert. Zur Untersuchung der Kinetik der Markierungsreaktion wurde die Fluoreszenzintensität nach unterschiedlichen Reaktionszeiten gemessen (Abbildung 35).

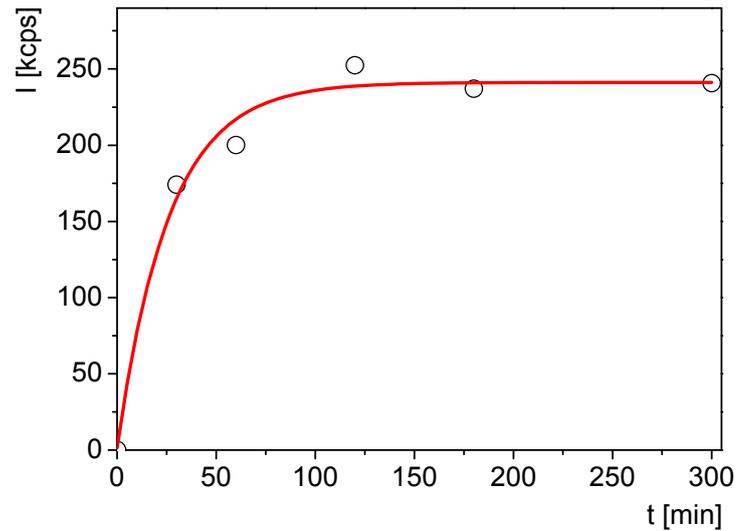


Abbildung 35: Fluoreszenzintensität von mit Dansylcadaverin markierten COOH-Gruppen eines PEG-2000-Diamin-BTC-Netzwerkes nach unterschiedlichen Reaktionszeiten

Es ist zu erkennen, dass die Reaktion nach 180 min zu keiner weiteren Erhöhung der Fluoreszenzintensität führt und der Umsatz konstant bleibt. Damit sind die Proben auch bei einer Ausbeute kleiner 100% miteinander vergleichbar.

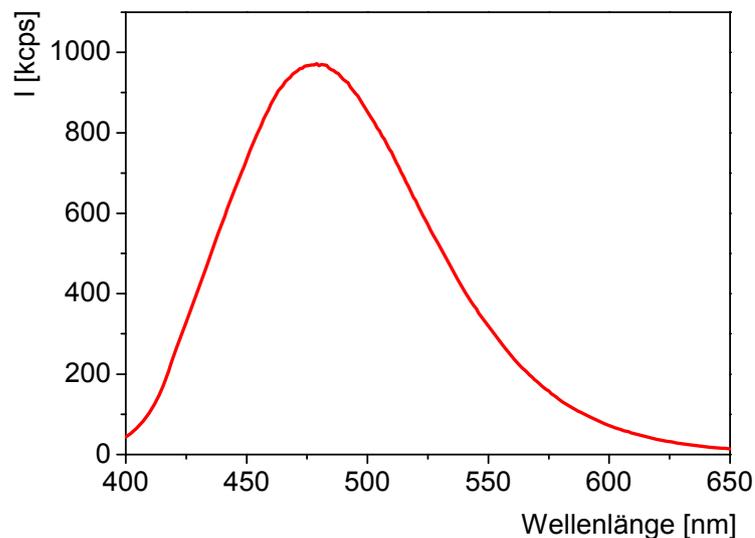


Abbildung 36: Fluoreszenzspektrum von mit Dansylcadaverin markierten COOH-Gruppen in einer PEG-2000-diamin-BTC-Schicht

Auf Basis dieser Ergebnisse wurden die COOH-Gruppen in einem PEG-2000-Diamin-BTC-Netzwerk markiert (nach Netzwerkbildung in zwei Zyklen) und die Fluoreszenzintensität gemessen (Abbildung 36). Die Konzentration der COOH-Gruppen wurde mit 292 pmol cm^{-2} bestimmt. Zur Einordnung dieses Wertes kann auf Ref. [60] verwiesen werden. In der Veröffentlichung wurde die Konzentration an

COOH-Gruppen in einem PAA-Propfpolymer mit 400 nmol cm^{-2} angegeben. Dieser Wert ist um einen Faktor von 1400 größer als in den hergestellten Schichten.

Neben den COOH-Gruppen wurde die Konzentration der primären Aminogruppen im PEG-Netzwerk ermittelt. Dazu wurde wie in Abschnitt 4.2.1 mit Fluram markiert und die Fluoreszenzintensität gemessen. Die Konzentration der primären Amine wurde mit 56 pmol cm^{-2} bestimmt und ist damit mindestens fünfmal kleiner als die Konzentration an COOH-Gruppen.

Um zu demonstrieren, dass der Lösungsansatz für Reaktionen mit anderen Säurechloriden durchführbar ist wurde BTC durch eine mit Thionylchlorid in ein Säurechlorid überführte Propan-1,2,3-tricarbonsäure (PTC) ausgetauscht. Im C1s-Spektrum sind die gleichen Komponenten wie im Spektrum einer PEG-2000-Diamin-BTC-Schicht zu finden (Abbildung 37).

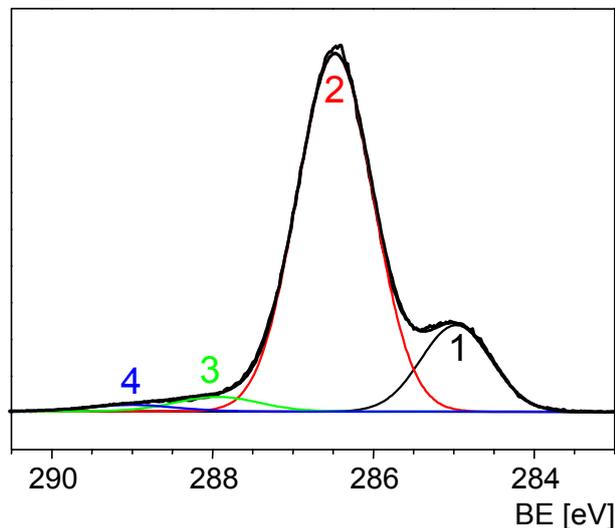
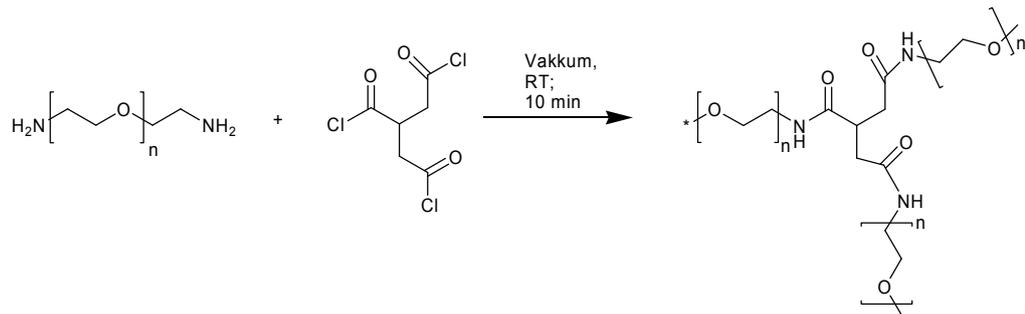


Abbildung 37: C1s-Spektrum einer PEG-2000-Diamin-PTC-Schicht auf einem PE-Substrat – 1: C-C- und C-N-Komponente, 2: C-O-Komponente, 3: CONH-Komponente, 4: COOH-Komponente

Mit einer Bindungsenergie von $285,0 \text{ eV}$ lässt sich das Spektrum mit einer Komponente auswerten, welche die Kohlenstoffatome des Substratmaterials repräsentiert. Sie nimmt einen Anteil von $17,4 \%$ an allen Kohlenstoffatomen ein. (Schema 16). Dies deutet darauf hin, dass die Schicht etwas dünner als 10 nm ist.

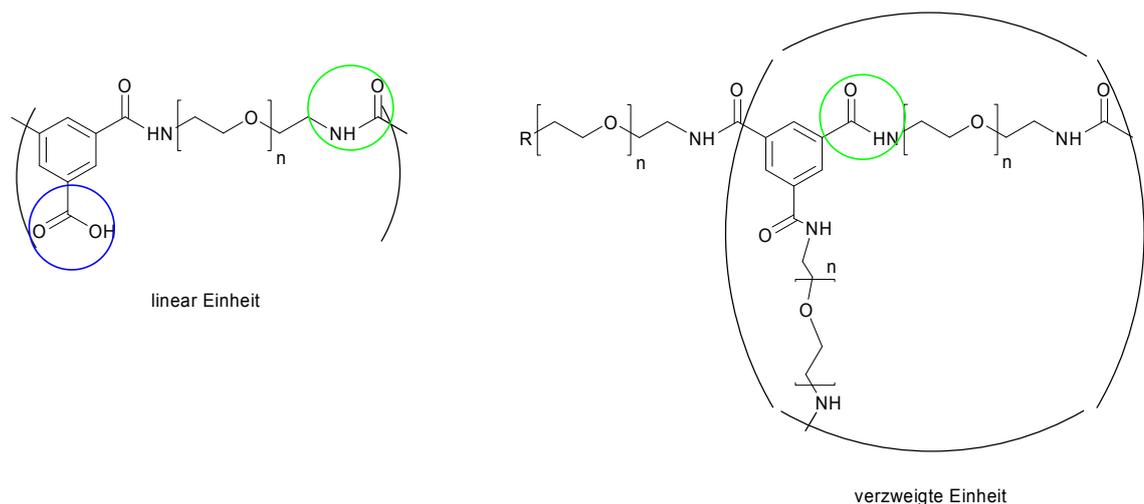


Schema 16: Netzwerkbildung unter Verwendung von Propan-1,2,3-tricarbonsäurechlorid (PTC)

Eine Komponente, welche den sauerstoffgebundenen Kohlenstoff der EG-Einheiten mit einer BE von 286,5 eV im Spektrum repräsentiert ist ebenfalls zu finden. Die Komponente nimmt einen Anteil von 77,6 % ein. Der Kohlenstoff des Amids aus der Reaktion zwischen dem PEG-Diamin und dem Säurechlorid lässt sich bei einer Bindungsenergie von 288,0 eV mit einem Anteil von 3,5 % bestimmen. Bei BE von 289,2 eV ist eine Komponente zu finden, die auf Kohlenstoff in COOH-Gruppen (1,5 %) schließen lässt. Diese stammen aus nicht reagierten und im Anschluss hydrolysierten COCl-Gruppen.

4.2.2.2 Maschenweite

Ähnlich der PEG-Diamin-GE-Netzwerken können zwei verschiedene Produkte der Netzwerkbildung formuliert werden (Schema 17).



Schema 17: Mögliche Einheiten des auf der Oberfläche des Substrates gebildeten Netzwerkes

In einem Fall reagiert das Säurechlorid dreimal mit den PEG-Diaminen, dies führt zu einer Verzweigung. Kommt es nur zu zwei Reaktionen, bildet sich eine lineare Kette

aus. Findet nur eine Reaktion am BTC statt, entsteht eine Endgruppe oder es kommt zu keinem Einbau in das Netzwerk, analog gilt dies für die PEG-Diamine. Werden die Verhältnisse der Komponenten in den beiden Strukturelementen in Betracht gezogen, können wiederum tiefergehende Strukturinformationen abgeleitet werden.

Tabelle 12: Vergleich zwischen aus der Stöchiometrie berechneten Zusammensetzung einer linearen und verzweigten Netzwerkeinheit und eines PEG-2000-Diamin-BTC-Netzwerkes - links: Elementaranalyse; rechts: hochaufgelöstes C1s Spektrum

PEG 2000 BTC	C [at%]	O [at%]	N [at%]	C=C [%]	C-N [%]	C-O [%]	CONH [%]	COOH [%]
linear	66,5	32,2	1,3	5,9	2,0	89,1	2,0	1,0
verzweigt	66,2	32,4	1,4	3,1	2,1	92,7	2,1	0,0
Experiment	68,6	30,1	1,3	2,5	3,5	90,1	3,5	0,4

Dazu werden die theoretischen Werte aus der Stöchiometrie mit den experimentell ermittelten Werten einer PEG-2000-Diamin-BTC-Schicht verglichen (Tabelle 12). Im Experiment wurde ein etwas höherer Kohlenstoffanteil gemessen, dieser kann auf 1s-Elektronen aus dem Substratmaterial hindeuten. Besonders auffällig ist der Unterschied in der Konzentration der COOH-Gruppen. Durch die isolierte Position können genauere Aussagen zur Konzentration der Komponente getroffen werden.

Zur Analyse der Abstände zwischen zwei Verzweigungen wird folgendes Modell aufgebaut. Die Vernetzungspunkte werden durch COOH und CONH-Gruppen repräsentiert. Eine lineare Einheit besteht aus einer COOH-Gruppe. Im Gegensatz dazu weist eine Verzweigung keine COOH-Gruppen auf. Das Verhältnis der Summe aus COOH- und CONH-Komponenten bezogen auf die C-O-Bindungen in den EG-Einheiten beinhaltet die Information über die tatsächliche Länge einer PEG-Kette im Netzwerk. Für die Elementaranalyse sind die Verhältnisse von Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Stickstoffatomen interessant. In Tabelle 12 sind die Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen linearen und verzweigten Einheiten erkennbar. Die Zusammensetzung wird davon beeinflusst ob lineare oder verzweigte Einheiten vorliegen. Daraus lässt sich der Abstand zwischen zwei Verzweigungen berechnen. In den Formeln wird von linearen Einheiten ausgegangen, welche durch eine Verzweigung eine zusätzliche Kette erhalten. Die Elementarkonzentration kann demzufolge nach den folgenden Gleichungen (8) berechnet werden:

$$\begin{aligned} \frac{C_{lin} + n_{verz} C_{PEG}}{C_{ges} + O_{ges} + N_{ges}} &= [C] \\ \frac{O_{lin} + n_{verz} O_{PEG}}{C_{ges} + O_{ges} + N_{ges}} &= [O] \quad (8) \\ \frac{N_{lin} + n_{verz} N_{PEG}}{C_{ges} + O_{ges} + N_{ges}} &= [N] \end{aligned}$$

X_{lin} stellt die Anzahl der Atome eines jeweiligen Elementes in einer linearen Einheit dar. $[X]$ repräsentiert den Anteil des jeweiligen Atoms in at %. Die Zunahme der Anzahl an Atomen durch eine Verzweigung wird durch den Faktor n_{verz} ausgedrückt. Bildet jede lineare Einheit eine Verzweigung aus liegt n_{verz} bei 1, was auch dem Maximalwert und damit der Zusammensetzung einer verzweigten Einheit entspricht. Wurde keine Verzweigung gebildet, ist $n_{verz} = 0$, und es liegen nur lineare Einheiten vor. Demzufolge liegt n_{verz} zwischen 0 und 1. Der Faktor n_{verz} beinhaltet die Information über das Verhältnis von linearen zu verzweigten Einheiten. Liegt n_{verz} beispielsweise bei 0,5 ist jede zweite Einheit im Netzwerk verzweigt. Zur Auswertung wird n_{verz} so variiert, dass das Modell die experimentellen Daten am besten beschreibt, d.h. die Differenz zwischen experimentellen und theoretischen Werten minimiert wird. Die Verhältnisse der Elemente sind durch die eingesetzten Edukte vorgegeben.

Für das C1s-Spektrum kann die Berechnung auf ähnliche Weise durchgeführt werden. Der Aufbau der Gleichungen (9) ist analog der Elementaranalyse, nur werden die Atome aus der Elementaranalyse durch die Komponenten im C1s-Spektrum ersetzt:

$$\begin{aligned} \frac{\{C = C\}_{lin}}{\{C = C\}_{ges} + \{C - N\}_{ges} + \{C - O\}_{ges} + \{CONH\}_{ges} + \{COOH\}_{ges}} &= [\{C = C\}] \\ \frac{\{C - N\}_{lin} + n_{verz} \{C - N\}_{PEG}}{\{C = C\}_{ges} + \{C - N\}_{ges} + \{C - O\}_{ges} + \{CONH\}_{ges} + \{COOH\}_{ges}} &= [\{C - N\}] \\ \frac{\{C - O\}_{lin} + n_{verz} \{C - O\}_{PEG}}{\{C = C\}_{ges} + \{C - N\}_{ges} + \{C - O\}_{ges} + \{CONH\}_{ges} + \{COOH\}_{ges}} &= [\{C - O\}] \quad (9) \\ \frac{\{CONH\}_{lin} + n_{verz} \{CONH\}_{PEG}}{\{C = C\}_{ges} + \{C - N\}_{ges} + \{C - O\}_{ges} + \{CONH\}_{ges} + \{COOH\}_{ges}} &= [\{CONH\}] \\ \frac{\{COOH\}_{lin} - n_{verz} \{COOH\}_{BTC}}{\{C = C\}_{ges} + \{C - N\}_{ges} + \{C - O\}_{ges} + \{CONH\}_{ges} + \{COOH\}_{ges}} &= [\{COOH\}] \end{aligned}$$

Es wird wiederum davon ausgegangen das lineare Einheiten vorliegen, von denen einige durch eine zusätzliche Kette zu einer verzweigten Einheiten reagieren. Die Werte in den geschweiften Klammern stellen die jeweilige Anzahl der Atome dar, die

der entsprechenden Komponente zugeordnet sind. Diese sind durch die Stöchiometrie vorgegeben. Der variable Parameter ist wiederum $n_{\text{verzweigt}}$.

Einen besonders deutlichen Indikator für den Grad der Verzweigung stellt der Kohlenstoff in COOH-Gruppen dar, der sich im Spektrum, auf Grund seiner isolierten Position, gut quantifizieren lässt. Ist $n_{\text{verzweigt}} = 0$, liegen keine Verzweigungen vor und an jedem Vernetzungspunkt befindet sich eine COOH-Gruppe, liegen ausschließlich verzweigte Einheiten vor ist $n_{\text{verzweigt}} = 1$ (oder 100%). Dann wären dem Modell nach keine Kohlenstoffatome in COOH-Gruppen im Spektrum zu erkennen. Der variable Parameter $n_{\text{verzweigt}}$ wird nun so gewählt, dass die experimentellen Daten am besten beschrieben werden. Aus dem Verhältnis, bzw. dem Anteil von verzweigten Einheiten kann wiederum der mittlere Abstand zwischen zwei Verzweigungen berechnet werden.

In Tabelle 13 werden die Modelldaten mit den experimentellen Werten verglichen.

Tabelle 13: Vergleich zwischen den experimentellen Daten eines PEG-2000-Diamin-BTC-Netzwerkes mit den Werten aus dem aufgestellten Modell

PEG 2000 BTC C [at%] O [at%] N [at%]	C=C [%]	C-N [%]	C-O [%]	CONH [%]	COOH [%]			
Experiment	68,6	30,1	1,3	2,5	3,5	90,1	3,5	0,4
Modell	66,5	31,9	1,6	4,7	2,4	90,1	2,4	0,4

Die vorgestellte Lösung zeigt, dass der mittlere Abstand zwischen zwei Verzweigungen 26 nm beträgt ($n_{\text{verzw.}} \approx 0,5$). Eine PEG-Kette im Netzwerk besteht im Durchschnitt aus 38 EG-Einheiten ($1 \text{ EG-Einheit} = 0,342 \text{ nm}$)^[9], dieser Wert ist etwas kleiner als die zu erwartenden Größe von 45 EG-Einheiten, basierend auf der Zusammensetzung des Oligomers. Eine mögliche Erklärung ist, dass die PEG-Oligomere mit einer niedrigeren Molmasse bevorzugt eingebaut werden.

Eine Möglichkeit, die Steglänge zu variieren, ist der Einsatz von längeren PEG-Ketten wie beispielsweise PEG-3000-Diaminen, wie schon im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde. Ein weiterer Ansatz ist die Variation der Steglänge durch Veränderung der Reaktionsbedingungen und damit die bevorzugte Bildung von linearen oder verzweigten Einheiten.

Nach dem Aufdampfen des Säurechlorides wird die Netzwerkbildung durch Benetzen mit einem Lösemittel vervollständigt. Die Folie mit dem PEG-Diamin und dem Säurechlorid wurde über das Einleiten des Lösemittels in die Apparatur, durch Dippen und durch Schwenken in verschiedenen Lösemittel benetzt. Die besten Ergebnisse lieferte das Benetzen durch Schütteln in Aceton. Das alleinige Dippen in

das Lösungsmittel war nicht ausreichend. Ist der Wassergehalt in dem dünnen Reagenzienfilm auf der Oberfläche zu groß, wie es beim Dippen der Fall sein kann, ist die Reaktion mit dem Wasser aus der Luft schneller als mit dem Diamin. In der Folge bilden sich keine langen Ketten aus. Ist mehr als eine COCl-Gruppe in dem trifunktionellen BTC hydrolysiert, ist die Bildung von linearen Einheiten bzw. längeren Ketten nicht möglich.

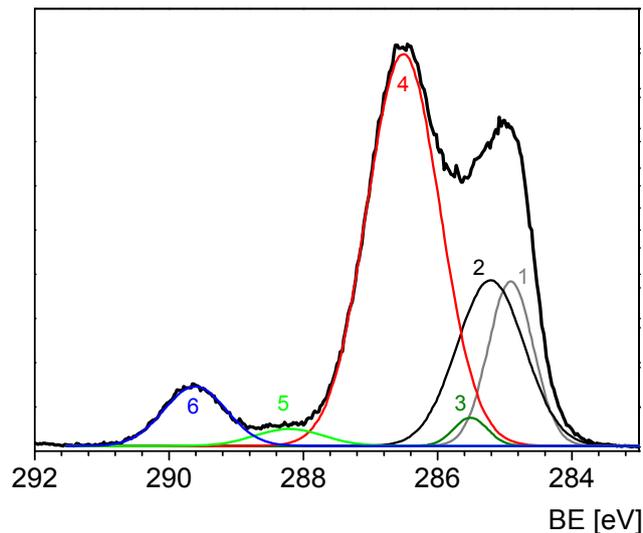


Abbildung 38: C1s-Spektrum der funktionalisierten Oberfläche nach starker Hydrolyse des Säurechlorides – Komponenten: 1 = C=C bei 284,8 eV; 2 = C-C bei 285,0 – 285,2 eV; 3 = C-N bei 285,5 eV; 4 = C-O bei 286,5 eV; 5 = CONH bei 288,0 – 288,2 eV; 6 = COOH/COOR bei 289,6 eV

Besonders deutlich lässt sich eine unvollständige Netzwerkbildung an dem Anteil der COOH-Komponente erkennen. Diese kann der Stöchiometrie nach selbst bei einer linearen Verknüpfung der PEG-2000-Diamine einen Anteil von einem Prozent aller Kohlenstoffatome nicht übersteigen. In dem abgebildeten C1s-Spektrum (Abbildung 38) beträgt der Anteil 7 %. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Hydrolyse des Säurechlorides. Auf Grund des hohen Anteils der C-O-Komponente lässt sich darauf schließen, dass auch einige PEG-Oligomere mit dem BTC reagiert haben. Es kann nicht von einem Netzwerk gesprochen werden. Die Versuche haben gezeigt, dass die alleinige Tauchbeschichtung nach der Reaktion in einem Acetonbad unter der Laboratmosphäre nicht ausreichend ist, um die Hydrolyse, eine „Nebenreaktion“, zu minimieren. Der sich nach dem Tauchen des Substrates in Aceton ausbildende Lösemittelfilm ist dünn und damit die Kontaktfläche zur (wasserhaltigen) Atmosphäre bezogen auf das Volumen des Filmes groß. Zudem verdampft das Aceton schnell. Dabei kühlt die Oberfläche ab und das Wasser aus der Atmosphäre kondensiert auf der Oberfläche, was zu einer verstärkten Hydrolyse der Säurechloride führen kann.

Gelingt es jedoch die Hydrolyse zu kontrollieren, stellt dieser Weg eine Möglichkeit dar den Vernetzungsgrad zu variieren. Dazu wurden die Folien nach dem Aufdampfen des Säurechlorides in Acetonlösungen mit Wassergehalten zwischen 0,01 und 1% geschwenkt. Der Anteil der COOH-Komponente liegt zwischen 0,45 – 0,60 %, was auf die Bildung eines Netzwerkes schließen lässt. Demnach kann der Abstand zwischen zwei Verzweigungen, ausgehend vom bisher ermittelten, auf über 26 nm bis hin zu Bildung von linearen Ketten erhöht werden.

In einer weiteren Versuchsserie wurde der Einfluss der Bedampfungszeit mit dem Säurechlorid BTC auf mit unterschiedlichen Mengen an PEG-2000-Diamin beladene Polymeroberflächen untersucht (Abbildung 39).

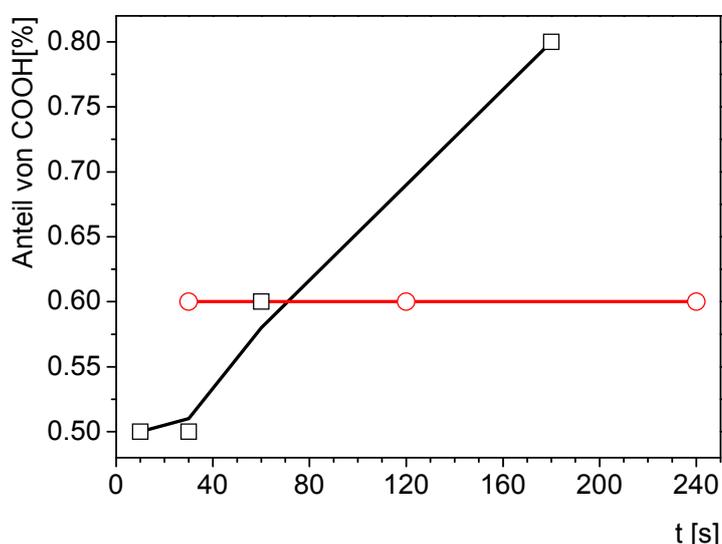


Abbildung 39: Veränderung des Anteils der COOH-Komponente im C1s-Spektrum mit der Aufdampfzeit – schwarz: PEG-2000-Diamin-Lösung in EtOH (Konzentration 10 mmol l⁻¹); rot: PEG 2000-Diamin-Lösung (Konzentration 20 mmol l⁻¹)

Unter Verwendung von PEG-2000-Diamin (aus einer 10 mmol l⁻¹-Lösung) bildet sich nach den Berechnungen aus Abschnitt 4.2.1.3 eine ca. 122 nm dicke Schicht auf der Oberfläche aus. Nach einer Bedampfungszeit von über 30 s steigt der Anteil der COOH-Komponente in den Spektren des Reaktionsproduktes von 0,5 % bis 0,8 %. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch die längere Aufdampfzeit mehr Moleküle vom BTC auf der Substratoberfläche aufkondensieren und der Überschuss bezüglich des Diamins immer größer wird. Durch den größeren Überschuss des BTC's reagieren weniger COCl-Gruppen mit den primären Aminen und hydrolysieren anschließend, nach dem Belüften der Anlage, zu COOH-Gruppen. Nach Verdopplung der Menge des PEG-2000-Diamins auf der Oberfläche (ca. 244 nm) bleibt der Anteil an COOH-Gruppen über den betrachteten Zeitraum konstant. Dies lässt darauf schließen, dass

der Überschuss des Säurechlorides nicht groß genug ist, um die Ausbildung von linearen Ketten bzw. Terminierungen zur bevorzugten Reaktion werden zu lassen.

4.2.2.3 Schichtdicke

Neben der Maschenweite wurde ebenfalls die Variation der Schichtdicke des Netzwerkes untersucht. Dazu wurde wiederum die Ellipsometrie verwendet und auf die Methodik aus Abschnitt 4.2.1 aufgebaut. Es wurde davon ausgegangen, dass die Schichtdicke der Gelschicht von der aufgetragenen Menge des PEG-Diamins abhängig ist. Daneben sollte ebenfalls die Aufdampfzeit des Säurechlorids die Schichtdicke des Endproduktes beeinflussen.

Es zeigte sich, dass eine ca. 122 nm dicke Schicht (theoretisch) des Ausgangsstoffes, PEG-2000-Diamin (aus einer 10 mmol l^{-1} Lösung), schon nach 10 s Aufdampfzeit zu einer konstanten Dicke des Reaktionsproduktes (Netzwerk) führt. Für eine 244 nm (theoretisch) dicke Schicht (aus einer 20 mmol l^{-1} Lösung) wird eine konstante Schichtdicke nach 60 s erreicht (Abbildung 40) wird.

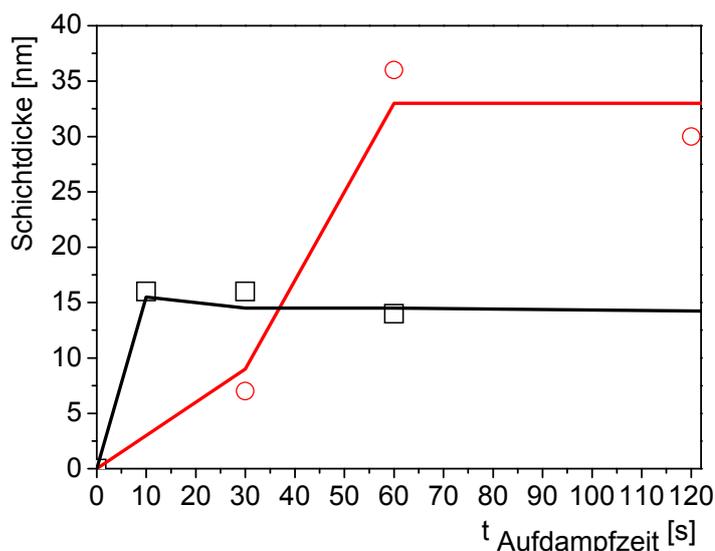


Abbildung 40: Veränderung der Schichtdicke mit der Aufdampfzeit – schwarz: PEG-2000-Diamin (aus 10 mmol l^{-1} Lösung); rot: PEG 2000-Diamin (aus 20 mmol l^{-1} Lösung)

Die analog Abschnitt 4.2.1.3 (nach Formel 6) berechneten Schichtdicken werden nicht erreicht. Dies lässt sich damit erklären, dass ein Teil des PEG-Diamins durch das Eintauchen in die Aceton-Lösung abgewaschen wird, bevor es reagiert. Die Konstanz der Schichtdicke nach einer bestimmten Zeit, kann darauf hindeuten, dass die durch die Reaktion gebildeten Fragmente ab einer bestimmten Größe nicht mehr an die Oberfläche anbinden und durch die Reinigung entfernt werden.

Die Schichtdicke kann ebenfalls über die Anzahl an Reaktionszyklen beeinflusst werden (Abbildung 41).

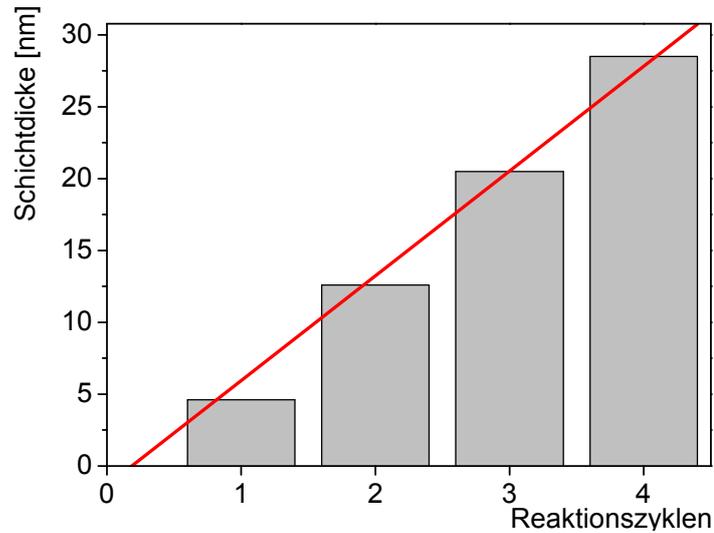


Abbildung 41: Zunahme der Schichtdicke eines PEG-2000-Diamin-BTC-Netzwerkes (aus einer 10 mmol l^{-1} Lösung) mit Wiederholung des Reaktionszykluses

Es kann ein linearer Zuwachs festgestellt werden. Pro Zyklus ergibt sich eine Zunahme der Schichtdicke von ca. 8 nm.

Die Quellung der PEG-Diamin-Netzwerke zu Gelschichten wurde analog dem schon vorgestellten Verfahren untersucht.

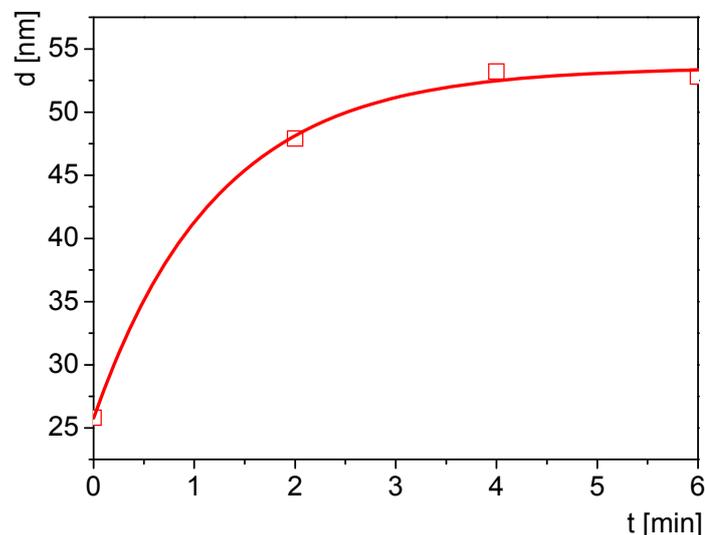


Abbildung 42: Quellkinetik einer PEG-2000-Diamin-BTC-Gelschicht in einem wassergesättigtem Stickstoffstrom

Dabei wurde ein Quellfaktor von 2,2 – 2,5 ermittelt. Dieser Wert liegt im gleichen Bereich der PEG-Diamin-GE-Gelschicht. Dies zeigt, dass das Quellverhalten selbst wenig von dem niedermolekularen (trifunktionellen) Edukt beeinflusst wird.

4.2.2.4 Stabilität

Es wurde die pH-Stabilität der PEG-Diamin-BTC-Netzwerke in Pufferlösungen bei unterschiedlichen pH-Werten getestet. Es zeigt sich, dass die Schichten innerhalb von einer Stunde stabil sind. Einzig bei pH-Wert 3 scheint es zur Hydrolyse der Schicht zu kommen, was an dem deutlichen Abfall der Sauerstoffkonzentration in der Elementaranalyse zu erkennen ist (Abbildung 43). Die Experimente können allerdings nur einen Hinweis auf die Abspaltung der gesamten Schicht geben. Untersuchungen die den Abbau des Netzwerkes selbst betrachten sind wesentlich aufwendiger.

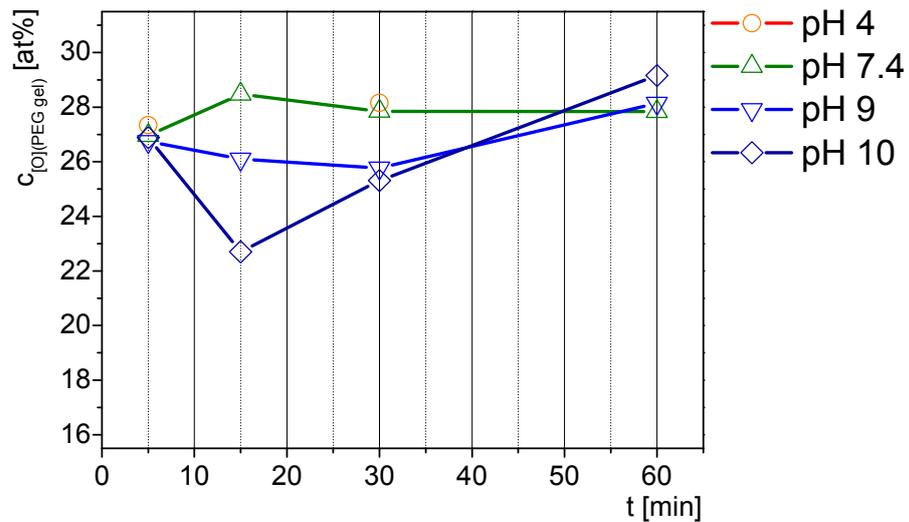


Abbildung 43: Konzentration des Sauerstoffes als Indikator für die Stabilität der Funktionalisierung in Puffersystemen mit unterschiedlichem pH-Wert

Die Daten zeigen, dass die Hydrogelschichten im pH-Bereich der meisten biochemischen Experimente (\sim pH 7) eine hohe Stabilität aufweisen.

4.2.2.5 Homogenität

Zur Überprüfung der Homogenität der PEG-Diamin-BTC-Schichten wurden REM-Aufnahmen durchgeführt. Dazu wurde ein PE-Film auf einem goldbeschichteten Substrat mit einer Gelschicht versehen.

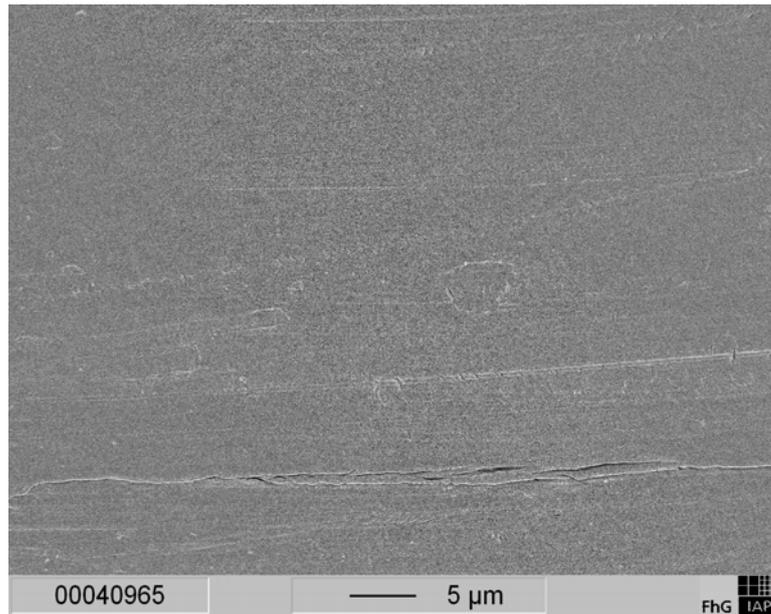


Abbildung 44: REM-Aufnahme einer PEG-Diamin-BTC-Schicht nach Bedampfen mit Platin

Es lassen sich ein paar helle Stellen und Schäden auf der Probe erkennen, es sind aber keine deutlichen morphologischen Abweichungen festzustellen. Einzig der Riss am unteren Rand der Aufnahme scheint einer Diskussion zu bedürfen. Der Riss befindet sich am unteren Ende der Probe. Dies ist der Bereich, an dem es zur Stauung des Lösemittels während des Tauchbeschichtungsprozesses kommt und welcher daher eine höhere Schichtdicke aufweisen kann, als die Schicht in der Mitte des Substrates.

4.3 Variation der Dichte und Art der funktionellen Gruppen

4.3.1 Veränderung der Konzentration an funktionellen Gruppen

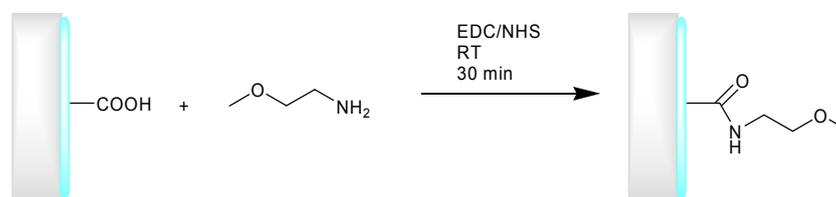
Im folgenden Abschnitt werden Wege vorgestellt mit denen die Konzentration und die Art der funktionellen Gruppen variiert werden kann. Ziel ist es weitere funktionelle Gruppen in das Netzwerk zu integrieren und/oder die Konzentration der vorhandenen zu verändern. Dazu gibt es zwei prinzipielle Wege:

A: Zum einen können die nicht abreagierten Gruppen aus der Netzwerkbildung für weitere Funktionalisierungen oder die Immobilisierung von biologisch aktiven Molekülen Verwendung finden. Dies sind in den PEG-Diamin-GE-Netzwerken primäre Amine, OH-Gruppen und Epoxide. Bei den PEG-Diamin-BTC-Netzwerken stehen COOH-Gruppen für weitere Umsetzungen zur Verfügung. Die Konzentration der

Gruppen wird, entsprechend der vorhergehenden Betrachtungen, im unteren pmol cm^{-2} Bereich liegen.

B: Die zweite Möglichkeit besteht darin, geeignete Moleküle an der Netzwerkbildung zu beteiligen. Die Voraussetzung dafür ist, dass die Moleküle nur mit einer Gruppe an der Reaktion teilnehmen oder die anderen funktionellen Gruppen langsamer oder nicht reagieren. Dabei wird im Gegensatz zur Methode A in die Netzwerkbildung eingegriffen. Dadurch muss sich die Maschenweite erhöhen, was beispielweise für die Immobilisierung von Proteinen von Vorteil sein kann.

In einem ersten Beispiel wird gezeigt, dass sich durch die Reaktion der COOH-Gruppen eines PEG-Diamin-BTC-Netzwerkes mit 2-Methoxyethylamin nach Methode A die Konzentration der COOH-Gruppen graduell reduzieren lässt (Schema 18).



Schema 18: Kopplung von 2-Methoxyethylamin an eine COOH-Gruppe in einem Netzwerk über die EDC/NHS-Methode

Ist eine homogene Reaktionsführung gewährleistet, können Oberflächen mit einem Konzentrationsgradienten versehen werden. Gradienten an funktionellen Gruppen können Verwendung finden, um konzentrationsabhängige Zellanlagerung oder Wechselwirkungen mit Proteinen zu studieren. Ein Gradient kann beispielweise durch eine Relativbewegung eines Flüssigkeitsspiegels gegen eine Substratoberfläche erreicht werden. Durch die Relativbewegung stehen Bereiche des Substrates unterschiedliche Zeiten mit der Reaktionslösung in Kontakt, diese zeigen dann einen höheren Umsatz. In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde dazu ein Objektträger aus COC verwendet. Im Anschluss werden die funktionellen Gruppen im PEG-Netzwerk mit Dansylcadaverin markiert und die Fluoreszenzintensität bestimmt (Abbildung 45).

Der Konzentrationsbereich der COOH-Gruppen des mit dieser Methode hergestellten Gradienten liegt zwischen 290 pmol cm^{-2} bis 210 pmol cm^{-2} . Werden diese Werte durch die mit Ellipsometrie gemessene Schichtdicke von 90 nm (30 nm trocken; Quellfaktor 3) dividiert, lässt sich die Volumenkonzentration mit $32 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3}$ bis $23 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3}$ bestimmen.

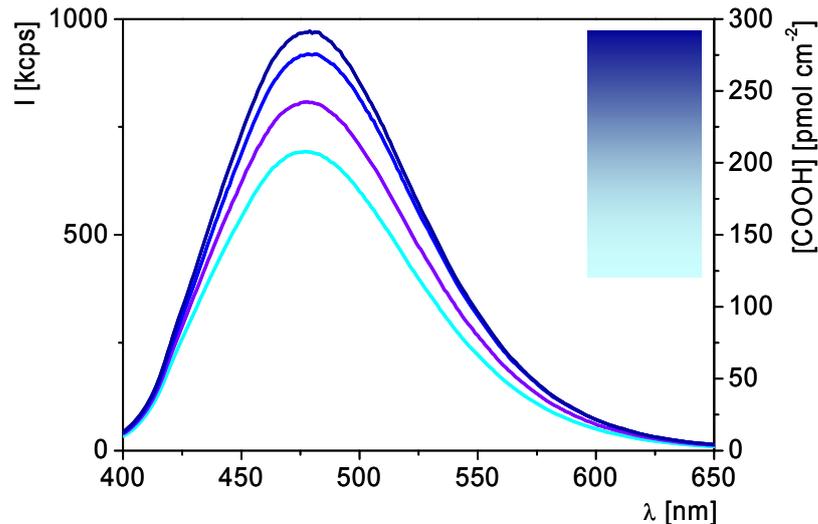


Abbildung 45: Fluoreszenzspektrum der mit Dansylcadaverin markierten COOH-Gruppen einer PEG-2000-Diamin-BTC-Gelschicht nach partieller Absättigung mit 2-Methoxyethylamin – blaues Rechteck: Objektträgerformat

Durch die Zugabe eines Moleküls, welches nur mit einer Gruppe an der Netzwerkbildung beteiligt ist, kann die Konzentration einer funktionellen Gruppe erhöht oder eine neue Gruppe eingeführt werden (Methode B). Als Modellsubstanz wurde Alanin gewählt, welches in einem PEG-BTC-Netzwerk chemisch gebunden wird. Das Substrat wurde in PEG-2000-Diamin Lösungen mit unterschiedlicher Alaninkonzentration getaucht und anschließend mit BTC vernetzt. In den C1s-Spektren lässt sich eine Erhöhung des Anteils der COOH-Komponente mit steigender Konzentration von Alanin in der PEG-Diamin-Lösung erkennen (Abbildung 46).

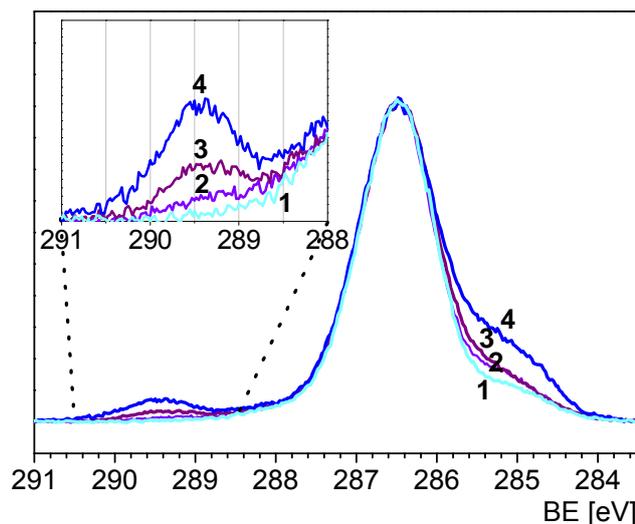


Abbildung 46: C1s-Spektrum eines PEG-2000-Diamin-BTC-Alanin-Netzwerkes - Zugabe von Alanin in die PEG-2000-Diamin-Lösung – Konzentration von Alanin in PEG-2000-Diamin-Lösung: 1: ohne Alanin; 2: 0,1 mmol l⁻¹; 3: 0,2 mmol l⁻¹; 4: 0,6 mmol l⁻¹

Mit steigender Alaninkonzentration nimmt der Anteil der C-C-Komponente (284 eV bis 285,5 eV) ebenfalls zu, dies deutet darauf hin, dass die Schichtdicke des Netzwerkes auf der Oberfläche abnimmt. Dies ist damit zu erklären, dass das Säurechlorid bevorzugt mit dem Alanin reagiert, da die PEG-Diamin-Oligomere im Vergleich einen kleineren Diffusionskoeffizienten aufweisen. Zur Unterstützung der XPS-Messungen wurden Fluoreszenzspektren, nach Markierung der COOH-Gruppen mit Dansylcadaverin, aufgenommen (Abbildung 47).

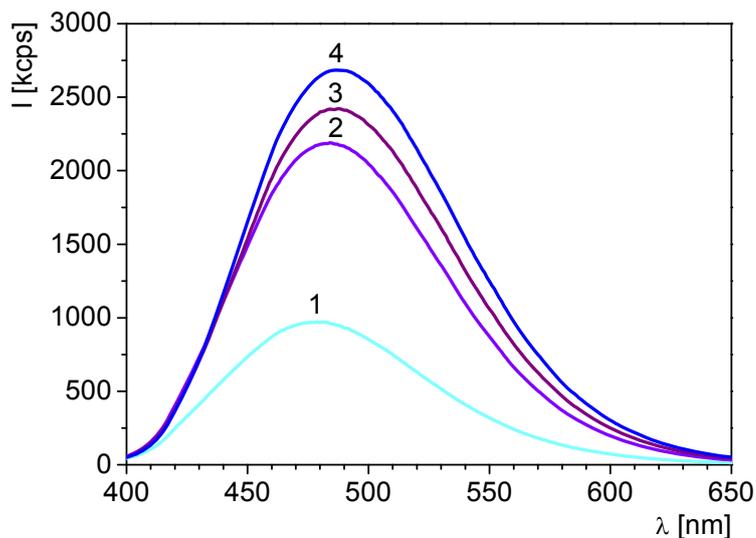


Abbildung 47: Fluoreszenzspektren der Erhöhung der Konzentration an COOH-Gruppen durch Einbau von Alanin in das Netzwerk – Alaninkonzentration in Lösung: mol l⁻¹, 2: 0,1 mol l⁻¹; 3: 0,2 mol l⁻¹; 4: 0,6 mol l⁻¹

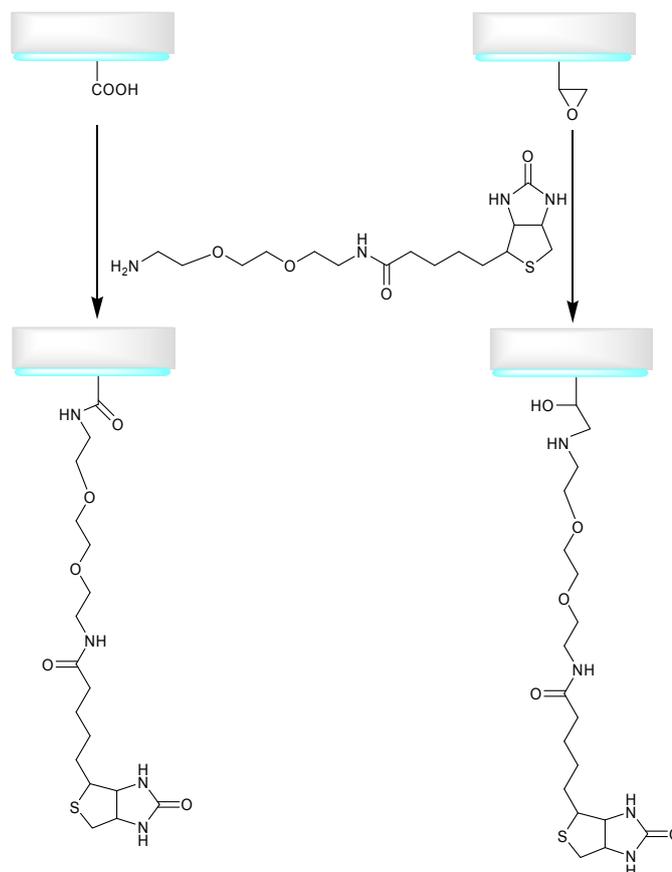
Aus den Fluoreszenzintensitäten lassen sich die Konzentrationen an COOH-Gruppen mit 0,6 bis 0,8 nmol cm⁻² berechnen. In einer 90 nm Gelschicht lässt sich daraus eine Volumenkonzentration von 66,7 μmol cm⁻³ bis 88,9 μmol cm⁻³ bestimmen, somit liegt der mittlere Abstand der funktionellen Gruppen zwischen 2,7 nm bis 2,9 nm.

4.3.2 PEG-Diamin-Biotin-Netzwerke

Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, dass durch die Beteiligung eines dritten Eduktes weitere funktionelle Gruppen in das Netzwerk eingeführt werden können. Wird ein biologisch aktives Molekül in dem Netzwerk gebunden, können viele Anwendungen erschlossen werden. Dies können zum einen Mikroarrays oder Bioreaktoren sein. So können beispielweise Proteine gezielt immobilisiert werden. Dies kann zum einen über COOH-Gruppen geschehen. Ein weiterer, sehr verbreiteter Weg ist die Bindung des Proteins Streptavidin an Biotin.^[112] Voraussetzung einer gezielten und damit spezifischen Immobilisation von Proteinen ist das Unterbinden einer unkontrollierten Kopplung des Proteins an die Substratoberfläche. Verhalten sich die Proteine in der

Gelschicht zusätzlich noch wie in ihrer natürlichen Umgebung, können verbesserte Experimente zur molekularen Erkennung durchgeführt werden. Die „molekulare Erkennung“ findet in der Natur in vielfacher Form statt.^[147] Dabei gehen zwei Moleküle über eine räumliche Wechselwirkung eine Bindung ein. Ein Beispiel für eine Wechselwirkung auf Basis der „molekularen Erkennung“ ist die schon angesprochene Biotin-Streptavidin-Interaktion. Dabei wird der Biotin-Rest vom Protein Streptavidin spezifisch erkannt.^[112,148] Diese Methode ist sehr weit verbreitet.^[12,56,149] Es existieren zahlreiche Proteine mit einem Biotin-Rest, welche sich dann über Streptavidin kontrolliert fixieren lassen.

Um eine Biotin-Einheit in den Netzwerken zur Verfügung zu stellen, wurde Biotinyl-3,6-dioxaoctandiamin (Biotin-Amin) in die Reaktion einbezogen. Dazu wurde die Substanz analog dem Alanin in die Reaktionslösungen gemischt. Das Biotin-Derivat nimmt mit seiner primären Aminogruppe an der Netzwerkbildung teil und wird als sekundäres Amin (in den PEG-Diamin-GE-Netzwerken) oder als Amid (in den PEG-Diamin-BTC-Netzwerken) gebunden.



Schema 19: Reaktion des Biotin-Amin-Derivates mit seiner primären Aminogruppe während der Netzwerkbildung – rechts: PEG-Diamin-BTC-Netzwerk; links: PEG-Diamin-GE-Netzwerk

Zum Nachweis der spezifischen Bindung von Streptavidin an Biotin in den Gelschichten wurden Durchflussversuche mit Lösungen eines fluoreszenzmarkierten Streptavidins durchgeführt. Für diese Experimente wurde ein Durchflusszelle gebaut (siehe Abschnitt 3.2.5). Dieser Aufbau ermöglicht es die Fluoreszenzintensität eines farbstoffmarkierten Streptavidins in einer Schicht während eines Spülprozesses zu verfolgen. Zur Evaluierung des Aufbaus wurden mehrere Versuche mit dem gleichen Substrat durchgeführt. Die Intensitäts-Zeit-Verläufe sind überlagert in Abbildung 48 dargestellt.

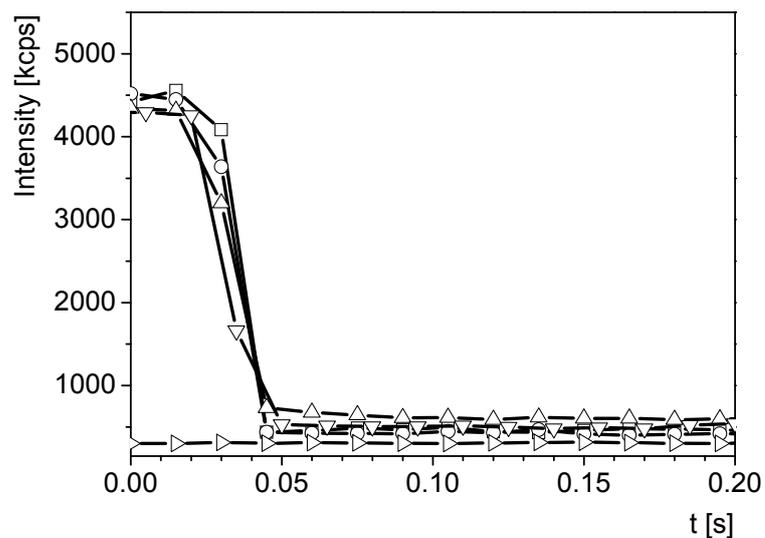


Abbildung 48: Evaluierung des Aufbaus: Auswaschverhalten eines fluoreszenzmarkierten Proteins (Streptavidin-FITC) aus einer Hydrogelschicht (PEG-3000-Diamin-GE)

Dazu wurde die Durchflusszelle mit einer Lösung eines markierten Proteins gefüllt und im Anschluss mit PBS-Puffer durchspült (vgl. 3.2.5). Der prinzipielle Verlauf der Kurven lässt sich wie folgt beschreiben:

Während der deutlichen Abnahme der Intensität am Anfang der Kurve wird das Flüssigkeitsvolumen über der Substratoberfläche abgesaugt. Der für die Untersuchung interessante Bereich folgt zeitlich auf diesen Abschnitt (nach ca. 30 ms). Dabei wird das Streptavidin-FITC durch die strömende Flüssigkeit von der Oberfläche entfernt.

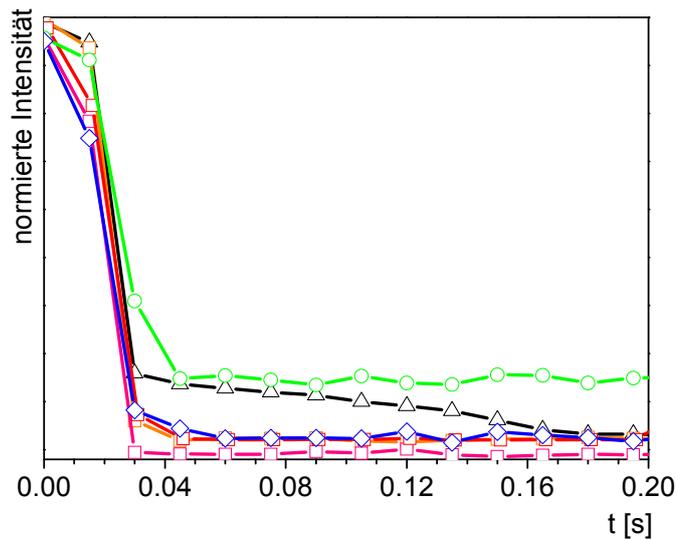


Abbildung 49: Fluoreszenzintensität von Streptavidin-FITC ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ -Lösung) während des Auswaschens aus verschiedenen Gelschichten bzw. während des Abwaschens von einer COC-Oberfläche – schwarz: COC-Platte; blau: PEG-2000-Diamin-BTC-Gelschicht; orange: PEG-2000-Diamin-GE-Gelschicht; rot: PEG-3000-Diamin-GE-Gelschicht; grün: PEG-2000-GE-Gelschicht mit Biotin

Es lässt sich ein Unterschied in den zeitlichen Verläufen der Fluoreszenzintensität zwischen Experimenten mit einer COC-Platte als Substrat zu einer mit einem Gel funktionalisierten Platte feststellen (Abbildung 49). Wird eine unfunktionalisierte COC-Platte untersucht vergehen ca. 170 ms bis eine konstante Fluoreszenzintensität erreicht wird. Befindet sich auf der Platte jedoch eine Gelschicht wird eine konstante Fluoreszenzintensität innerhalb von 20 ms festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von Streptavidin-FITC in einer Gelschicht ohne Biotin klein ist. Die Unterschiede in den Intensitäts-Zeit-Verläufen sind zwischen den verschiedenen Gelschichten gering. Wird ein Netzwerk verwendet, das mit Biotin-Gruppen versehen ist, nimmt die Fluoreszenzintensität nicht ab. Dies deutet darauf hin, dass es zu einer Immobilisierung des Streptavidins an den Biotin-Gruppen kommt. Um ihre Stabilität zu prüfen wurden alle mit Netzwerken versehenen Substrate mit XPS auf ihre Veränderungen untersucht.

Ein weiterer zu beachtender Punkt ist die Diffusion von makromolekularen Verbindungen (z.B. Proteinen) in den Gelschichten. Besonders für sensorische Anwendungen kann die langsame Diffusion großer Moleküle eine Limitierung sein.^[150] Es zeigte sich, dass in den vorgestellten dünnen und weitmaschigen Hydrogelschichten die Diffusionskonstante ausreichend groß ist um kurze Analysenzeiten zu gewährleisten. Der Wert der Diffusionskonstante liegt in der Größenordnung eines Proteins in Wasser. Neben einer ausreichend großen

Diffusionskonstante müssen die Filme dünn sein, damit sich biologisch aktive Makromoleküle gleichmäßig in der Schicht verteilen.

In anderen Versuchen wurde die Konzentration des Biotins in den Gelschichten variiert. Dazu wurde das Biotin-Derivat in unterschiedlichen Konzentrationen den PEG-Diamin-Lösungen beigemischt. Nach der Synthese der Gelschichten und der Reinigung wurden die funktionalisierten Substrate in eine Lösung von Streptavidin-FITC ($0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) in PBS-Puffer gelegt. Nach einem Waschschrift wurden XPS- und Fluoreszenzspektren aufgenommen. In den Fluoreszenzspektren (Abbildung 50) lässt sich erkennen, dass mit der Erhöhung der Konzentration des Biotin-Amins die Fluoreszenzintensität ebenfalls größer ist. Es ist eine Korrelation zwischen dem Biotin-Gehalt in den Gelschichten und der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Wenn das Biotin-Derivat in das Netzwerk eingebaut ist kann aus den hochaufgelösten Spektren ein Schwefelgehalt um 0,04 % ermittelt werden. Zusätzlich lässt sich eine leichte Erhöhung des Stickstoffgehaltes finden, wenn Streptavidin-FITC an den Biotin-Gruppen immobilisiert wurde.

Zur Ermittlung des Hintergrundes, wurde ein gelbeschichtetes Substrat ohne Biotin in die Streptavidin-FITC-Lösung gelegt. In der Abbildung 50 ist zu erkennen, dass die gemessene Intensität im Vergleich zu einer Gelschicht mit Biotin deutlich geringer ist. Dies zeigt, dass die unkontrollierte Adsorption des Streptavidins klein ist und daher eine spezifische Bindung des Proteins an das Biotin in den Gelschichten stattfindet.

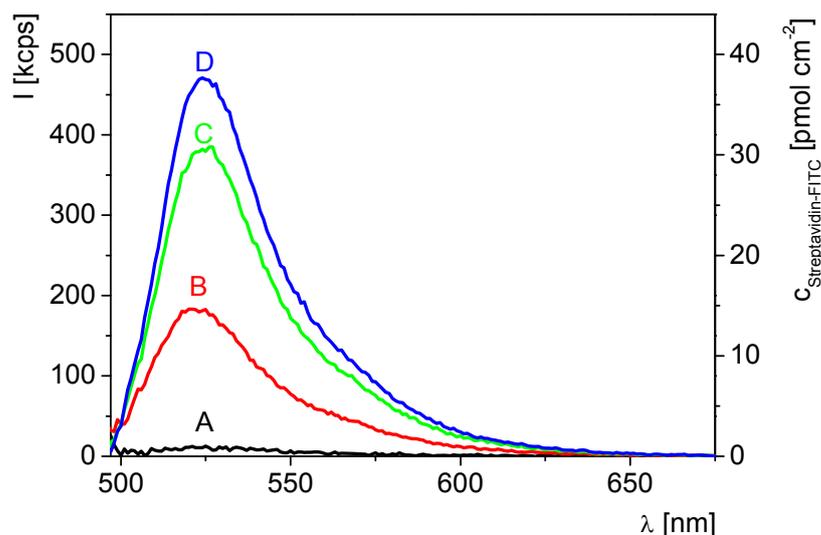


Abbildung 50: Erkennung von Biotin durch Streptavidin-FITC in einer PEG-Diamin-GE-Hydrogelschicht hergestellt bei 35°C – A: PEG-2000-Diamin-GE-Schicht ohne Biotin; B: PEG-2000-Diamin-Biotin-Amin (Lösung: $0,07 \text{ mmol l}^{-1}$); C: PEG-2000-Diamin-GE-Biotin-Amin (Lösung: $0,27 \text{ mmol l}^{-1}$); D: PEG 3000-Diamin-GE-Biotin-Amin (Lösung: $0,27 \text{ mmol l}^{-1}$) – in Klammern: Konzentration des Biotin-Derivates in Lösung

Neben den GE-Schichten wurden auch die PEG-Diamin-BTC-Gelschichten mit dem Biotin-Derivat versehen und analog die Fluoreszenz- und XPS-Spektren (Abbildung 51) aufgenommen. Bei den PEG-Diamin-BTC-Gelschichten lässt sich ebenfalls eine Zunahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Biotin-Konzentration feststellen. In den hochgelösten XPS-Spektren lässt sich Schwefel nach dem Einbau von Biotin in das Netzwerk nachweisen.

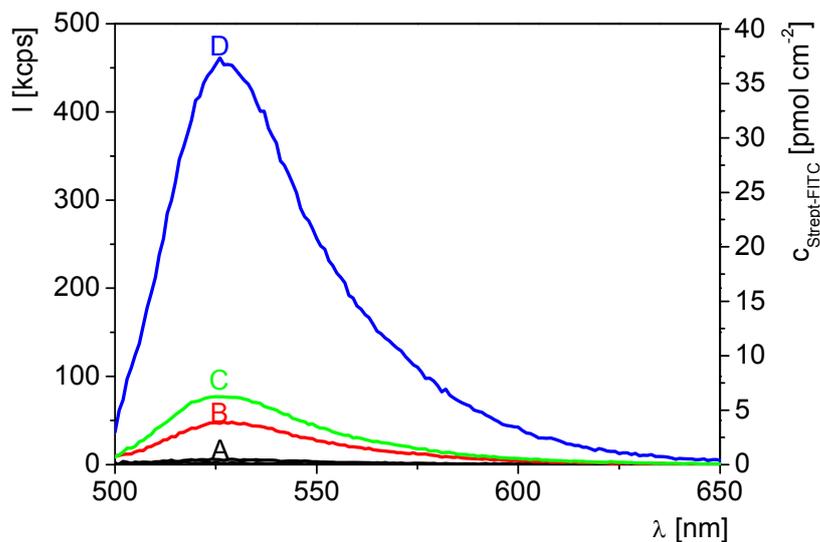


Abbildung 51: Erkennung von Biotin durch Streptavidin-FITC in einer PEG-Diamin-BTC-Hydrogelschicht: A: PEG-2000-Diamin-BTC-Gel ohne Biotin-Amin; B: PEG 2000-Diamin-BTC-Biotin-Amin (Konzentration: $0,13 \text{ mmol l}^{-1}$); C: PEG-2000-Diamin-BTC-Biotin-Amin (Konzentration: $0,27 \text{ mmol l}^{-1}$); D: PEG-3000-Diamin-BTC-Biotin-Amin (Konzentration: $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$) – in Klammern: Konzentration des Biotin-Derivates in Lösung

Die C1s-Spektren der mit einem PEG-Diamin-Netzwerk versehenen Substrate weisen die gleichen Verhältnisse der Komponenten wie die nicht mit Biotin funktionalisierten Gelschichten auf und sind daher nicht abgebildet.

Mittels dieses Weges kann in den vorgestellten Versuchen eine Maximalkonzentration des Streptavidin-FITC von 38 pmol cm^{-2} ermittelt werden. Wird dieser Wert mit der auf einer Fläche theoretisch erreichbaren Maximalkonzentration (ermittelt aus rein geometrischen Überlegungen) von $6,7 \text{ pmol cm}^{-2}$ ^[56] verglichen*, ergibt sich eine Erhöhung der Kapazität um einen Faktor 5,7. Es wird mehr Streptavidin detektiert als auf einer „2D“ Oberfläche gebunden sein kann. Damit der Nachweis erbracht werden kann, dass das Streptavidin tatsächlich an das Biotin angebinden hat, müssen die Vergleichsmessungen mit Gelschichten ohne Biotin herangezogen

werden. Diese zeigen eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität. Damit kann gezeigt werden, dass das Streptavidin in mehreren Lagen in den Gelschichten am Biotin immobilisiert wird.

Die Dicke der hergestellten Schichten kann im gequollenen Zustand mit mindestens 100 nm angenommen werden. Dabei stützt sich diese Annahme auf die bisher durchgeführten Untersuchungen mittels Ellipsometrie. Aus der Flächenkonzentration lässt sich die Volumenkonzentration mit $3800 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($3,8 \mu\text{mol cm}^{-3}$) ermitteln. Alle Schritte erfolgten ohne die in biosensorischen Anwendungen übliche Blockierung freier Bindungsstellen mit zum Beispiel BSA.^[9]

Protein A – IgG

Die Immobilisation von Streptavidin kann ein erster Schritt zur Verwendung der Gelschichten als Material für einen Biosensor sein. Zur Demonstration einer komplexeren Erkennung wurde Protein A und ein Antikörper als Modell ausgewählt. Ein ähnliches Modell für Erkennungsexperimente ist beispielsweise in Ref. [21] beschrieben. Protein A ist in der Lage verschiedene IgG's spezifisch zu binden.^[151] Der Durchmesser von Protein A wird in Lösung mit 3 nm angegeben.^[152] IgG bindet mit der F_c -Bindungseinheit an das Protein A (Abbildung 52).^[153] Das IgG hat einen hydrodynamischen Radius von 5,5 nm.^[154]

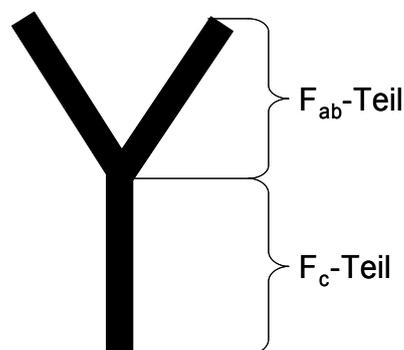
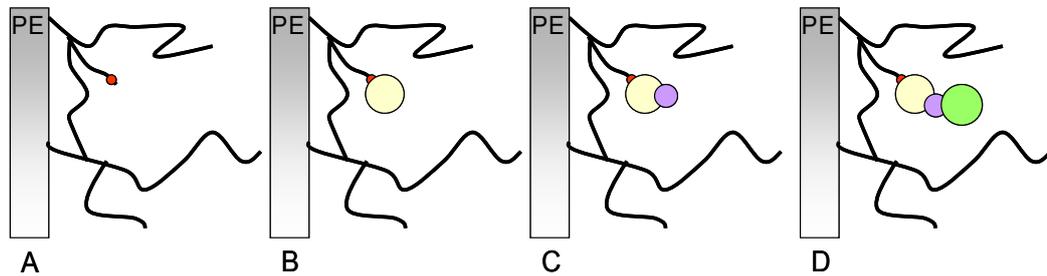


Abbildung 52: Schematische Darstellung eines Antikörpers mit den aktiven Teilen – F_{ab} und F_c

Zuerst wird das Streptavidin an einem Biotin-Molekül in der Gelschicht immobilisiert. Damit das Protein A angebunden werden kann, wurde es mit einem Biotin-Rest versehen (kommerziell erhältlich). Im nächsten Schritt wird das Biotin-Protein-A mit dem Biotin-Rest über Streptavidin gekoppelt. Dabei wird ausgenutzt, dass Streptavidin vier Biotin-Einheiten binden kann. Das Protein A wird im Anschluss

* Die Größe von Streptavidin beträgt $5,5 \times 4,5 \text{ nm}^2$. Damit kann berechnet werden wieviel Streptavidin-Moleküle auf eine Oberfläche passen.

vom Protein IgG erkannt. Ist das IgG mit einem Farbstoff markiert (zum Beispiel FITC) wird eine Detektion mittels Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht (Schema 20).



Schema 20: Erkennung von Protein A in einer PEG-Diamin-Gelschicht: A: Gelschicht mit Biotin; B: + Streptavidin; C: + Biotin-Protein A; D: + IgG-FITC

Werden die Durchmesser der Proteine addiert ergibt sich eine Ausdehnung von ca. 15 nm. Die ermittelte Maschenweiten liegen deutlich über 15 nm, demzufolge ist das Eindringen von Protein A und IgG(-FITC) in die Gelschicht möglich.

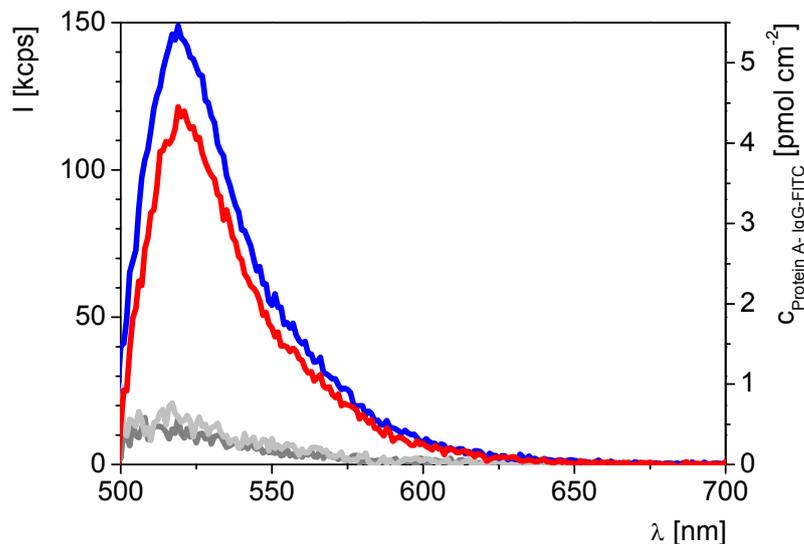


Abbildung 53: Fluoreszenzspektren von IgG-FITC nach der spezifischen Bindung an Protein A in einer Gelschicht – blau: PEG-3000-Diamin-GE-Biotin mit Protein A; rot: PEG-3000-Diamin-BTC-Biotin mit Protein A; grau: PEG-3000-Diamin-BTC/GE-Gelschichten mit Biotin aber ohne Protein A (grau)

Nach der Kalibrierung, welche analog dem Streptavidin-FITC erfolgt, lässt sich die Konzentration von IgG-FITC mit $4,7 \text{ pmol cm}^{-2}$ (BTC) bzw. mit $5,5 \text{ pmol cm}^{-2}$ (GE) bestimmen. In einigen Versuchen wurde maximal $9,5 \text{ pmol cm}^{-2}$ (GE) und 19 pmol cm^{-2} (BTC) für die Konzentration von IgG-FITC bestimmt. Die maximale Konzentration auf einer 2-D-Oberfläche bei dichter Packung lässt sich unter der Annahme eines Flächenbedarfs des IgG von $30,3 \text{ nm}^2$ mit $5,5 \text{ pmol cm}^{-2}$ berechnen. In den durchgeführten Versuchen konnte festgestellt werden, dass das IgG in 3,4fach höherer Konzentration gebunden ist, als es in einer Monolage zu erwarten wäre.

Allerdings wurde eine geringe Fluoreszenz detektiert, wenn kein (Biotin)-Protein A in die Gelschicht eingelagert wurde.

Wird das Biotin-Protein A aus einer Lösung mit einer Konzentration von $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ ($1,7 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) an die Oberfläche angebinden bzw. in das Netzwerk eingebunden, wird nach der Einlagerung in eine 1 mg ml^{-1} IgG-FITC-Lösung keine Fluoreszenz gemessen. Erst die Verdünnung der Biotin-Protein-A-Lösung auf eine Konzentration von $1 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ (17 nmol l^{-1}) führte zum Erfolg des Experiments. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass das Biotin-Protein A das Biotin des Gels aus den Bindungstaschen des Streptavidins (ohne FITC) verdrängt, wenn dessen Konzentration zu groß ist.

Neben der Fluoreszenzspektroskopie wurden die Experimente von XPS-Messungen begleitet. Dabei wurden korrelierend mit den Fluoreszenzmessungen Veränderungen im Stickstoffgehalt und im Anteil der Amidkomponente festgestellt. Vertiefende XPS-Experimente wurden mit den PEG-3000-Diamin-BTC-Biotin-Netzwerken durchgeführt. In den C1s-Spektren ist ein Intensitätsanstieg im Amidbereich (BE um 288 eV) nach Anbindung der Proteine festzustellen (Abbildung 54). Die anderen Bereiche der Spektren zeigen keine isolierten Komponenten, aus denen sich die Bindung der Proteine exakt verifizieren lässt.

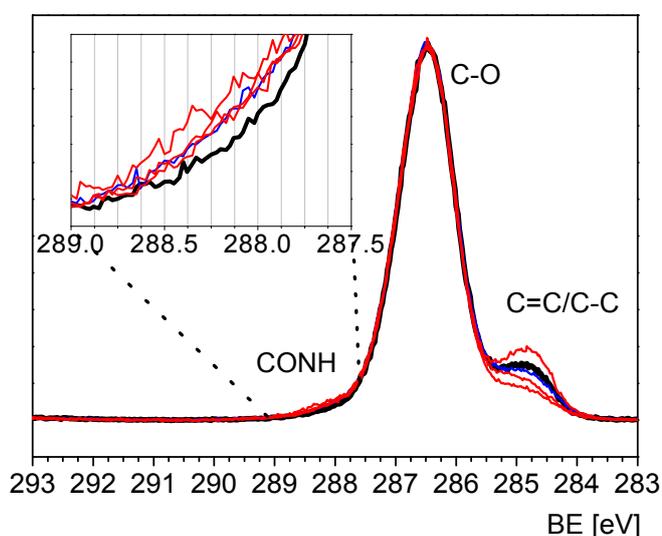


Abbildung 54: C1s-Spektren eines PEG-3000-Diamin-Netzwerkes (PEG-3000-Diamin; 20 mmol l^{-1} ; BTC aus der Gasphase; $0,2 \text{ mmol l}^{-1}$ Biotin-Amin) – schwarzes Spektrum: PEG-3000-Diamin-BTC-Biotin ohne gebundenes IgG-FITC (nach Test auf unspezifische Bindung), blaues Spektrum: mit gebundenen Streptavidin; rotes Spektrum: mit gebundenen Streptavidin, Biotin-Protein A und IgG-FITC (Vergleich verschiedener Proben)

In der Elementaranalyse lässt sich ein Anstieg der Stickstoffkonzentration durch die Bindung der Proteine von 0,9 bis auf 2,0 at% feststellen (Tabelle 14, Abbildung 55). Zur Interpretation der Ergebnisse wurde ein Modell aufgestellt. Dazu wurden die

Spektren als eine Mischung aus linearen und verzweigten PEG-3000-Diamin-BTC-Einheiten und Streptavidin bzw. Protein A und IgG aufgefasst. Die Sequenzen von Streptavidin^[155], Protein A und IgG (aus den einzelnen Bestandteilen ausgerechnet) lassen sich in der Literatur finden.

Tabelle 14: Vergleich von experimentellen Daten (E.) aus der Elementaranalyse und den C1s-Spektren von XPS-Messungen des Erkennungsexperimentes mit auf der Stöchiometrie basierenden berechneten Schichtzusammensetzungen (T.) – Theorie: 6:1-Verhältnis von linear zur verzweigten Einheit; Anteil Protein 0,05 bzw. 0,02

	Elementaranalyse [at%]					
	C _{E.}	C _{T.}	O _{E.}	O _{T.}	N _{E.}	N _{T.}
PEG-BTC	72,4	66,7	26,6	32,4	0,9	0,9
Streptavidin	70,4	66,2	28,0	32,3	1,5	1,5
Str.-Prot. A-IgG	70,4	65,7	27,6	32,2	2,0	2,1

	C1s - Spektrum [%]									
	C-C		C-N		C-O		CONH		COOH	
	E.	T.	E.	T.	E.	T.	E.	T.	E.	T.
PEG-BTC	14,3	3,6	2,9	1,4	79,5	93,5	2,9	1,4	0,3	0,1
Streptavidin	6,9	4,7	4,3	2,2	83,9	91,0	4,3	2,1	0,6	0,1
Str.-Prot. A-IgG	11,4	6,5	4,1	3,4	79,6	86,7	4,1	3,1	0,7	0,3

Aus dem Modell ergibt sich, dass die elementare Zusammensetzung und die Verhältnisse der Bindungszustände im C1s-Spektrum nur wenig von dem Verhältnis zwischen den linearen und verzweigten Netzwerkeinheiten beeinflusst werden. Einen im Vergleich sehr großen Einfluss hat der molare Anteil der Proteine im Netzwerk. Es zeigt sich, unter der Annahme eines Verhältnisses von linearen zu verzweigten Einheiten von 6 zu 1, eine Zunahme der Konzentration des Stickstoffes nach der Bindung von Streptavidin von 0,9 at% auf 1,5 at%.

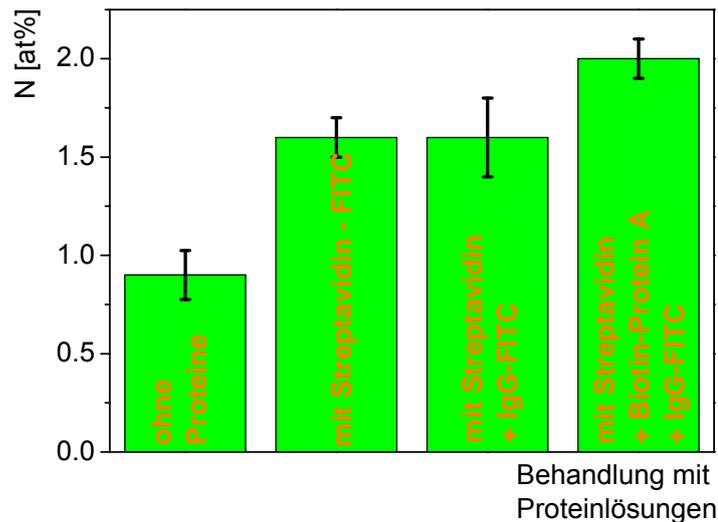


Abbildung 55: Anstieg der Konzentration des Stickstoffes in einem PEG-3000-Diamin-BTC-Biotin-Netzwerk durch die spezifische Anbindung der Modellproteine

Die Berechnung der Elementarzusammensetzung nach Bindung aller Proteine, d.h. von Streptavidin, Biotin-Protein A und IgG-FITC, ergibt eine Konzentration des Stickstoffes von 2,1 at %.

Bei der Interpretation der Werte muss beachtet werden, dass mit XPS maximal die obersten 10 nm der Schicht analysiert werden. Mittels Fluoreszenzspektroskopie wird die gesamte Schicht erfasst. Die Eindringtiefe der Proteine in das Gel muss größer als 10 nm sein. Zudem wird mit Fluoreszenzspektroskopie der gequollene Zustand analysiert. Im Vergleich dazu ist das Netzwerk während der XPS-Messungen kollabiert.

In allen Experimenten wurde ein im Vergleich zu den Berechnungen aus der Stöchiometrie zu hoher Anteil des Kohlenstoffes festgestellt. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration an Stickstoff und Sauerstoff niedriger als die theoretischen Berechnungen es erwarten lassen. Dies kann auf die Präsenz von Adsorbaten oder Verunreinigungen hindeuten.

Die durchgeführten Messungen können zeigen, dass neben den Messungen mit Fluoreszenzspektroskopie, eine markierungsfreie Analyse von Molekülinteraktionen (im Besonderen großer Moleküle bestehend aus anderen Elementen als Kohlenstoff oder Sauerstoff) mit XPS und den vorgestellten Gelschichten möglich sein kann. Dies ist qualitativ damit zu begründen, dass der Stickstoffgehalt der vorgestellten Netzwerke sehr gering ist. Durch die Einlagerung eines Moleküls mit einem hohen Anteil von Stickstoff kommt es im Vergleich zur Zusammensetzung des Ausgangsmaterials zu einer deutlichen Veränderung der elementaren Zusammensetzung in der analysierten Schicht. Daneben wurde gezeigt, dass die Schichten ohne Biotin eine geringe Bindung

der untersuchten Proteinen zeigen. Erst durch die Biotin-Gruppe wird die Bindung der Proteine ermöglicht.

Die Messungen wurden mit den Standardinstellungen durchgeführt. Mit einer weiteren Optimierung der Messparameter kann die Messzeit für ein Spektrum der Elementaranalyse auf unter 2 min reduziert und die Empfindlichkeit weiter gesteigert werden. Somit lassen sich mit XPS innerhalb von 24 h 720 Experimente auf einem Mikroarray auswerten, ohne dass eine Markierung der Proteine mit einem Farbstoff notwendig ist. Ein weiterer Vorteil liegt darin begründet das Polymersubstrate verwendet werden können. Bei anderen markierungsfreien Techniken zum Studium von zwischenmolekularen Wechselwirkungen werden Nb_2O_5 -^[56], Silizium- oder goldbeschichtete^[135] Substrate benötigt. Eine Einschränkung bei der Anwendung von XPS zum Auslesen von Mikroarrays liegt darin begründet, dass die Ortsauflösung im Vergleich zu Methoden der Fluoreszenzspektroskopie (Fluoreszenzreader) wesentlich kleiner ist. In den durchgeführten Messungen kann die Ortsauflösung mit $500\ 000\ \mu\text{m}^2$ angegeben werden, die Fluoreszenzspektroskopie erreicht eine wesentlich höhere Ortsauflösung. XPS ist für die oberen 10 nm der Schicht sensitiv. Somit wird weniger Probenmaterial für die Analyse benötigt.

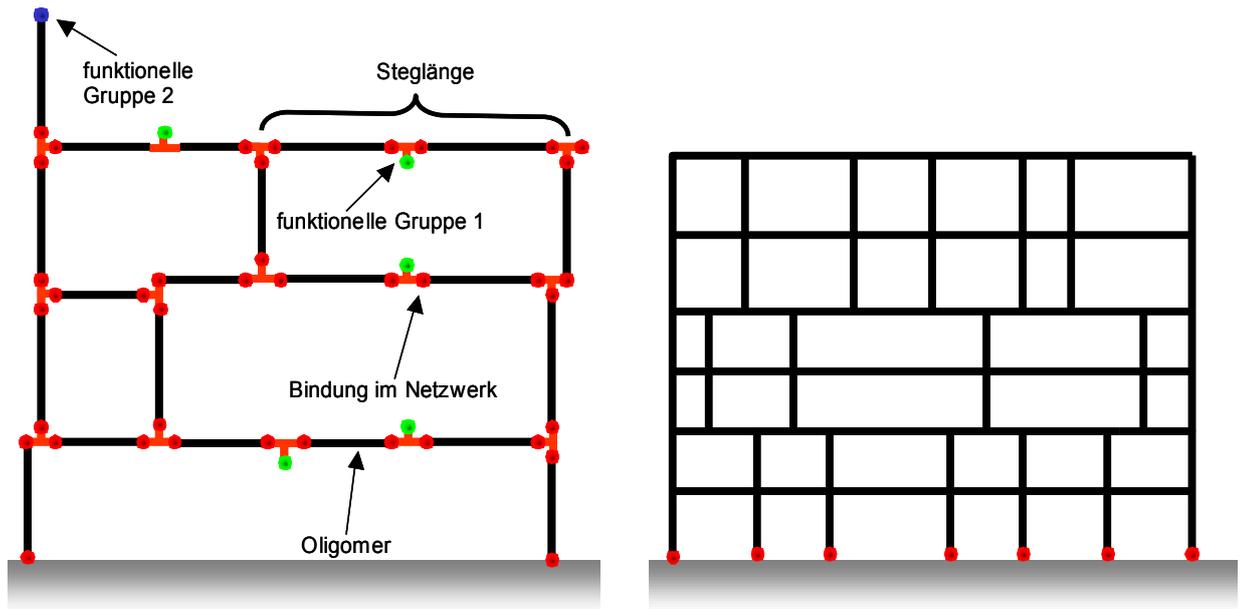
5 Diskussion

5.1 Vergleich der Schichten mit dem Stand der Technik

Synthese- und Analysenstrategie

Der vorgestellte Weg erlaubt es mit Kondensations- und Additionsreaktionen weitmaschige Netzwerke auf Oberflächen herzustellen. Im folgenden Abschnitt soll die Lösung mit anderen gängigen Ansätzen verglichen werden.

Ein wesentlicher Punkt ist, dass im Gegensatz zu ionischen und radikalischen Polymerisationen die Synthese robuster ist und sich mit weniger Aufwand realisieren lässt. So ist der Ausschluss von Sauerstoff nicht nötig und die Konzentration von Wasser kann im Vergleich zu einer anionischen Polymerisation höher liegen. Zudem erlaubt die gewählte Strategie, neben der Einstellung von Eigenschaften der Netzwerke, eine chemische Analyse. Es lässt sich zwischen den Atomen in den Verknüpfungspunkten, in den Netzwerkstreben und funktionellen Gruppen unterscheiden. Die funktionellen Gruppen können für die Kopplung von Proteinen oder weitere Synthesestufen Verwendung finden. Durch die Bestimmung der elementaren Zusammensetzung und der Verhältnisse der Elemente mit unterschiedlichen Bindungspartnern (und Anzahl an Bindungen zu dem Partner) zueinander lassen sich, über stöchiometrische Modelle, Abstände zwischen Verzweigungen in einem Netzwerk bestimmen. So wurden Abstände über 20 nm ermittelt (vgl. 4.2.1.2 und 4.2.2.2). Im Gegensatz zu Kondensationsreaktionen werden bei radikalischen Polymerisationen gleiche Einheiten geknüpft (wie beispielsweise bei Polymeren basierend auf Acrylsäure^[60], oder Acrylamid^[59]). Dadurch ist es schwierig die (molekulare) Netzwerkstruktur mittels XPS abzuleiten, da sich nicht zwischen Atomen in den Hauptketten und Verzweigungsstellen unterscheiden lässt. Die Bestimmung der Abstände zwischen zwei Verzweigungen mit XPS ist aber limitiert. Werden die Oligomere im Netzwerk zu groß, wird die Nachweisgrenze für die Atome an den Verknüpfungspunkten erreicht. Die Konzentration der Atome an den Verzweigungspunkten ist dann zu niedrig. In der Folge lässt sich die Komponente, welche die Schlussfolgerung auf eine Netzwerkbildung zulässt, nicht mehr vom Hintergrund der Messung unterscheiden.



Schema 21: Betrachtung eines Netzwerkes mittels molekularer Vorstellungen - links: hergestellt durch Polykondensation; rechts: hergestellt durch radikalische Polymerisation

Durch radikalische Polymerisationen lassen sich ebenfalls Netzwerke mit funktionellen Gruppen aufbauen. Dabei kann die Konzentration der Gruppen sehr groß werden, wenn Monomere mit funktionellen Gruppen eingesetzt werden. Durch die Synthese von geeigneten Copolymeren kann die Konzentration einer funktionellen Gruppe reduziert werden.^[63] Es ist anzunehmen, dass bei der Verwendung von Techniken der freien radikalischen Polymerisation, Netzwerke mit kleinen Maschen gebildet werden. Diese sind für die in der Einleitung vorgestellten Anwendungen weniger geeignet.

Die anionische Polymerisation erlaubt ebenfalls die Herstellung von Copolymeren auf Oberflächen. Wird Oxiran als Edukt verwendet, lassen sich PEG-Ketten gezielt auf Oberflächen aufbauen. Die anionische Polymerisation stellt damit prinzipiell eine weitere Möglichkeit dar, ähnliche Netzwerke herzustellen. Dabei muss jedoch für einen sehr strikten Ausschluss von Wasser gesorgt werden. In vielen Veröffentlichungen wird von langen Reaktionszeiten berichtet (Abschnitt 2.1.3). Im Anschluss kann ein weiterer Reaktionsschritt zur Vernetzung nötig sein. Die anionische Polymerisation erlaubt, im Vergleich zur vorgestellten Lösung, eine größere Flexibilität im Aufbau der Netzwerke, da durch die Verwendung von Monomeren eine variabelere Architektur möglich ist. Die direkte kovalente Anbindung von Blockpolymeren mit einer hohen Molekülmasse (keine Oligomere) an eine Oberfläche lässt eine niedrige Kopplungseffizienz erwarten. Zudem sind viele Reaktionsstufen nötig, wenn dickere Schichten hergestellt werden sollen.

Die vorgestellten Netzwerke lassen sich durch die Reaktion eines trifunktionellen Epoxides oder eines Säurechlorides mit PEG-Diaminen herstellen. Ein Nachteil der Verwendung des Glycidyl Glycerolethers als niedermolekulare Komponente besteht darin, dass er zu einem gewissen Grad mit sich selbst reagiert wie in Abschnitt 4.2.1.2 gezeigt wurde. Damit liegen in Abhängigkeit des Verhältnisses der Konzentrationen der Edukte unterschiedliche Netzwerkstrukturen vor. Allerdings konnte der Bereich, in dem sich bevorzugt ein weitmaschiges Netzwerk auf der Oberfläche bildet, gefunden und nachgewiesen werden.

Der GE stellt ein Gemisch dar, dessen exakte Zusammensetzung nicht bekannt ist. Dies scheint aber keinen erkennbaren Einfluss auf die Netzwerkbildung zu haben. Das deutet darauf hin, dass die verwendete Charge hauptsächlich aus trifunktionellen Molekülen besteht. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass sich die Reaktionslösung über die Zeit, z.B. durch Hydrolyse der Epoxide, verändert. Ein Vorteil des Triepoxides besteht in dem einfachen Auftrag zusammen mit dem PEG-Diamin-Oligomer als Gemisch auf die Substratoberfläche. Die Reaktionszeiten liegen im Vergleich zur Reaktion mit dem trifunktionellen Säurechlorid in einer um einen Faktor 100 größeren Zeitskala.

Wird als niedermolekularer Ausgangsstoff BTC verwendet, ist eine Trennung des Auftrages der beiden Edukte möglich. Durch das gezielte Verdampfen des Säurechlorides ist eine im Prozess integrierte Reinigung der Ausgangssubstanz möglich, denn durch die Hydrolyse des Säurechlorides zu einer Carbonsäure, welche einen niedrigeren Dampfdruck hat, wird die Carbonsäure im Verhältnis zum Säurechlorid einen geringen Anteil an der Gasphase einnehmen. Weiterhin birgt das Säurechlorid ein geringeres Risiko mit sich selbst zu reagieren. Die Reaktion mit dem Säurechlorid führt zu definierteren Produkten. Der experimentelle Aufwand ist durch die Verwendung von Vakuumtechnik allerdings größer.

Beide Verfahren bilden Schichten mit verschiedenen funktionellen Gruppen (Endgruppen) aus, welche gleichzeitig auch für die Charakterisierung und die (kovalente) Immobilisation von Molekülen (z.B. Proteinen) notwendig sind. Bei der Verwendung des GE als trifunktionelles Edukt wird ein Netzwerk mit primären Aminen, OH-Gruppen und Epoxiden gebildet. Die Konzentration der primären Amine ist allerdings klein, was ebenfalls auf eine Netzwerkbildung schließen lässt. Durch die Verwendung des Säurechlorides bildet sich bevorzugt ein Netzwerk mit COOH-Gruppen und wenigen primären Aminen aus. COOH-Gruppen können in einen reaktiven Ester überführt werden. An diesen Ester können dann Proteine gekoppelt werden. Eine Alternative ist die Aktivierung der COOH-Gruppen an den Proteinen um

sie an Aminogruppen im Netzwerk zu binden. Dabei besteht jedoch die Gefahr, dass die Proteine mit sich selbst kondensieren.

Der Ansatz durch Kondensations- und Additionsreaktionen ein Netzwerk zu bilden erlaubt, durch die Zugabe von weiteren Edukten in das Reaktionsgemisch, weitere funktionelle Gruppen einzuführen oder die Konzentration der vorhandenen zu erhöhen (vgl. 3.3.8). Dazu wird ein Ausgangsstoff dem Ansatz beigefügt, welcher nur mit einer funktionellen Gruppe reagiert. Das Verhältnis zwischen der bifunktionellen Komponente und dem „monoreaktiven“ Molekül muss genau eingestellt werden, da es eine Konkurrenz um die Reaktion mit der trifunktionellen Komponente gibt. Es wurde festgestellt, dass das Verhältnis von difunktioneller und „monoreaktiver“ Komponente einen Wert von größer 15 haben muss, damit ein Netzwerk gebildet wird. Es ist jedoch zu erwarten, dass dieses Verhältnis stark von der Art und den Größenverhältnissen der eingesetzten Edukte abhängig ist. Ist der Anteil der „monoreaktiven“ Komponente zu groß, wird die Netzwerkbildung unterbunden, da das trifunktionelle Edukt durch die Reaktion aus dem System entfernt bzw. deaktiviert wird. Eine weitere Möglichkeit, neue bzw. andere Gruppen einzuführen oder die Konzentration bereits vorhandener zu reduzieren, sind nachträgliche Umsetzungen an den funktionellen Gruppen im Netzwerk. Diese erfordern allerdings weitere Prozessstufen, welche den Aufwand für die Gelpräparation erhöhen.

Die Stabilität der Netzwerke ist für jede Anwendung im Speziellen zu diskutieren. Für viele biologische Experimente werden sehr oft Lösungen mit einem pH-Werte um 7 verwendet, in diesem Bereich haben sich die Schichten als stabil erwiesen. Für ein besseres Verständnis der Stabilität der Netzwerke müssten Untersuchungen durchgeführt werden, die den Zusammenhang zwischen Maschenweite und Stabilität unter verschiedenen Bedingungen aufzeigen.

Oberflächeneigenschaften und die Konzentration der funktionellen Gruppen

Im Zusammenhang mit Protein-Arrays sind im besonderen die Wechselwirkungen von Proteinen in einer Lösung (wenn auch in einem Tropfen) mit der Substratoberfläche und der Schicht zu diskutieren. Ein wesentlicher Gesichtspunkt ist dabei die Konzentration an funktionellen Gruppen. Da sie für chemische Reaktionen benötigt werden, aber auch für die physikalische Bindung verantwortlich sein können. Es werden allerdings einige funktionelle Gruppen für die kovalente Immobilisation von biologisch aktiven Molekülen, z.B. Proteinen, benötigt. Die Konzentration der Gruppen muss im Idealfall so eingestellt werden, dass eine Bindung der Proteine erlaubt ist, ohne dass sie ihre räumliche Struktur verändert.

Funktionalisierte Oberflächen bzw. Schichten, zeichnen sich durch um Größenordnungen unterschiedliche Konzentrationen an funktionellen Gruppen aus (Tabelle 15).

Tabelle 15: Vergleich der Konzentration von funktionellen Gruppen bzw. Polymerketten auf Substratoberflächen

Beispiel	Konzentration an Gruppen oder Molekülen	
	2 D [$\mu\text{mol cm}^{-2}$]	3 D [$\mu\text{mol cm}^{-3}$]
PEG-Moleküle auf Au	50 - 598	-
PEG-Moleküle auf Si	50 - 432	-
PAA-Kette	298 000 - 497 000	5 000 - 5 960
neue Gelschichten	292	32

Die Dichte von kleinen Molekülen, gebunden als Monolage auf Oberflächen, wird in den meisten Publikationen mit 0,3 – 2,6 pro nm^2 auf Siliziumoberflächen (silanbasierte Chemie), ^[119,156] und mit 0,3 – 3,6 pro nm^2 auf Goldoberflächen (thiolbasierte Chemie) angegeben.^[46,157] Zur Diskussion ist es sinnvoll, sich zu vergegenwärtigen, dass sich auf einer Si-Oberfläche (100) ca. 3 Atome pro nm^2 befinden.^[158] Die in der Arbeit verwendete Aktivierung einer Polymeroberfläche mit einem Sauerstoffplasma führt zu ca. 0,4 Gruppen pro nm^2 .^[27] In einer oberflächeninduzierten Polymerisation mit einer niedrigen Dichte des Initiators auf der Oberfläche werden 0,2 Ketten pro nm^2 bestimmt.^[72] Werden diese Werte mit einem Modellprotein, mit einer Kontaktfläche von 25 nm^2 verglichen, zeigt sich, dass dem Protein 5 – 90 funktionelle Gruppen gegenüber stehen. Daraus lässt sich ableiten, dass ein Protein mit mehreren funktionellen Gruppen in Kontakt kommt. Dies erhöht das Risiko von Mehrfachreaktionen und/oder der unkontrollierten Adsorption von an der Oberfläche. Zudem kommt das Protein nur mit einer Seite mit der „2-D“-Oberfläche in Kontakt. Es besteht die Möglichkeit, dass die Proteine einseitig flach an die Oberfläche adsorbieren oder kovalent gebunden werden. Dabei kann ihre räumliche Struktur und damit auch ihre Eigenschaften, andere Moleküle „zu erkennen“, verändert werden. Nach der Adsorption des Proteins auf einer 2-D-Oberfläche kommt es zu einer weiteren Adsorption von Proteinen, wie schon in Abschnitt 2.1.1 beschrieben wurde. Diese nachfolgende Adsorption erfolgt langsamer.^[18] Für weitere Reaktionen bzw. Interaktionen mit anderen Molekülen, ist dennoch nur die oberste Schicht zugänglich.

Um eine Immobilisation und Stabilisierung der Proteine zu erreichen, wurden in dieser Arbeit dünne weitmaschige Netzwerke auf Oberflächen hergestellt. Diese PEG-basierten Netzwerke können es ermöglichen Proteine in einer Umgebung zu untersuchen, in der sie sich ähnlich wie im Organismus verhalten. Daneben kann auch

die Kapazität für die Bindung von großen Molekülen (wie zum Beispiel Proteine) erhöht werden. Wobei die räumliche Dichte der Proteine durch die 3D-Struktur des Netzwerkes reduziert wird. Die Konzentration der COOH-Gruppen in einem PEG-Diamin-BTC-Netzwerk wurde mit 292 pmol cm^{-2} bestimmt. In einer 90 nm dicken Gelschicht ergibt sich daraus eine Volumenkonzentration von $32 \text{ } \mu\text{mol cm}^{-3}$. Zum Vergleich wird die Konzentration der Gruppen in einer Schicht eines PAA-Polymers mit 298 nmol cm^{-2} bis 497 nmol cm^{-2} angegeben.^[60] Auf die Fläche bezogen ist die Konzentration der funktionellen Gruppen im Vergleich zu den in dieser Arbeit vorgestellten Gelschichten um einen Faktor von 4000 – 7000 größer. Allerdings sollte zwischen der Flächen- und Volumenkonzentration unterschieden werden. Die Dicke der PAA-Schichten wird mit 500 – 1000 nm angegeben. Damit lässt sich eine Volumenkonzentration von 5 mmol cm^{-3} – 6 mmol cm^{-3} berechnen. Im Vergleich dazu ist die Volumenkonzentration vorgestellten Schichten um drei Größenordnungen kleiner. Zur Anbindung von Proteinen an die PAA-Schicht werden die COOH-Gruppen in NHS-Ester überführt. Neben der kovalenten Bindung der Proteine an die COOH-Gruppen wird auch von der Adsorption der Proteine berichtet.

Der durchschnittliche, aus der Konzentrationsbestimmung an COOH-Gruppen berechnete, mittlere Abstand der funktionellen Gruppen beträgt in einer PAA-Schicht 0,8 nm (ca. 4,5 C-C-Bindungen). Im Vergleich dazu ist der mittlere Abstand zwischen den funktionellen Gruppen in den vorgestellten PEG-Diamin-Säurechlorid basierten Gelschichten mit 3,2 nm deutlich größer (ca. 20 C-C-Bindungen). Der mittlere Abstand der funktionellen Gruppen ist abhängig vom Quellungsgrad der Gelschicht. Die Dicke der gequollenen Gelschicht wurde nach Kontaktieren mit feuchtem Stickstoff untersucht. In Wasser wird das Netzwerk bzw. die Gelschicht noch stärker quellen und sich damit auch der Abstand zwischen den funktionellen Gruppen vergrößern. Möglicherweise ist durch die vergleichsweise niedrige Konzentration der funktionellen Gruppen die adsorptive Bindung von Streptavidin an bzw. in der Schicht klein, wie in Abschnitt 4.3.2 gezeigt werden konnte. An die funktionellen Gruppen kann ein Protein kovalent gebunden werden. Dabei kann es zur Mehrfachreaktion an dem Protein kommen, wodurch die räumliche Struktur des Proteins ebenfalls verändert werden kann. Dennoch ist die Wahrscheinlichkeit von Mehrfachreaktionen an einem Protein geringer, da die Reaktionspartner, die funktionellen Gruppen in den vorgestellten Netzwerken, in niedrigerer Konzentration vorliegen. Die Konzentration der Gruppen muss in der jeweiligen Anwendung optimal eingestellt werden.

Die Netzwerke ermöglichen eine Immobilisation in einer Schicht (vgl. Abschnitt 4.3.2). Aus den Fluoreszenzspektren lässt eine sechsmal höhere Konzentration an

Streptavidin bestimmen als sie auf einer 2-D-Oberfläche denkbar ist. Diese Ergebnisse korrelieren mit den XPS-Messungen, aus denen sich ein Abstand von größer 20 nm zwischen zwei Verzweigungen im Netzwerk berechnen lässt. Die Maschenweite ist demzufolge für die angestrebte Zielstellung ausreichend.

Die Synthese von Netzwerken mit der vorgestellten Strategie kann zu Limitierungen führen. Durch die Knüpfung von Bindungen als sekundäres Amin in den PEG-Diamin-GE-Netzwerken wird eine tiefergehende Analyse mit XPS, nach Derivatisierung mit TFAA, ermöglicht. Auf der anderen Seite können Proteine durch protonierte sekundäre Amine, in Abhängigkeit des pH-Wertes, adsorptiv am Substrat binden. Daneben können bei der Verwendung des Glycidyl-Glycerolethers zur Bildung des Netzwerkes Epoxide, die während der Netzwerkbildung nicht reagiert haben, anschließend mit den Proteinen reagieren. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche haben allerdings gezeigt, dass die Konzentration dieser Gruppen so niedrig ist, dass nur eine geringe unspezifische Bindung von den Modellproteinen (Streptavidin, IgG, Protein A) aufgetreten ist. In den PEG-Diamin-Säurechlorid-Netzwerken werden Amide gebildet, die prinzipiell mit Proteinen Wasserstoffbrückenbindungen eingehen können. Dennoch ist die unspezifische Bindung von den untersuchten Proteinen in den Gelschichten klein. Dies lässt sich möglicherweise auf die niedrige Konzentration der Amide zurück führen.

5.2 Hypothese zum Mechanismus der Netzwerkbildung und deren Kinetik

Es wird versucht einen vereinfachten Mechanismus zur Bildung der Netzwerke aufzustellen. In der Synthesechemie in Lösung wird gerührt, um eine Durchmischung der Edukte zu erreichen. Dies ist für die Herstellung der Gelschichten nicht notwendig. Die Reagenzien werden auf das Substrat aufgetragen, im Anschluss findet die Reaktion statt. Allein die Diffusion der Edukte ist ausreichend, um eine erfolgreiche Reaktion zu gewährleisten. Ein möglicher Grund dafür könnte die geringe Dicke der Schichten sein. Die es erlaubt, dass die Moleküle den Reaktionsraum in kurzer Zeit durchschreiten.

Die Synthese der GE-Netzwerke findet in einem dünnen Film des Glycerolethers als Lösemittel statt. Die Wegstrecke, die ein Molekül (z.B. PEG-Diamin) in einer bestimmten Zeit zurück legt, lässt sich mit der integrierten Form des Fick'schen Gesetzes (Gleichung 10) berechnen^[159]:

$$x = 2 \left(\frac{Dt}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

Der Diffusionskoeffizient wird mittels der Stokes-Einstein-Gleichung (für Kugeln) berechnet (Gleichung 11).^[160] Da die folgenden Betrachtungen darauf abzielen eine Abschätzung zu sein, wird die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der räumlichen Struktur eines Moleküls nicht im Detail berücksichtigt.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (11)$$

Die Wegstrecke, die ein Molekül in einem Medium zurück legt, kann dann nach folgender Gleichung (12) berechnet werden.

$$x = 2 \left(\frac{kTt}{6\pi^2\eta R} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

Wobei k die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, η die dynamische Viskosität des Lösemittels und R den hydrodynamischen Radius des Moleküls repräsentieren. Bei einer Temperatur von 293 K und einer dynamischen Viskosität von 0,15 Pa s für den Glycidyl Glycerolether^[161] ergibt sich für ein Teilchen mit einem hydrodynamischen Radius von 20 nm eine mittlere zurück gelegte Wegstrecke von 118 nm in 1 s. Die in den Versuchen gewählten Reaktionszeiten sind demzufolge ausreichend, um ein vollständiges Durchschreiten der Moleküle durch die Schicht zu gewährleisten. Hat das Molekül eine Größe von 200 nm erreicht werden schon 10 s benötigt um die selbe Strecke zurückzulegen. Daraus lässt sich erkennen, dass mit steigender Größe der Teilchen die Diffusionszeiten für die gleiche Strecke immer größer werden. Neben der Größe der Teilchen erhöht sich ebenfalls die Viskosität des Systems, wodurch die Zeit, die benötigt wird, um die gleiche Strecke zurück zu legen, ebenfalls vergrößert wird. Diese Berechnungen legen nahe, dass wie in den Experimenten gezeigt wurde (vgl. 4.2.1.2), die Reaktion nach einer bestimmten Zeit zu einer konstanten Schichtdicke führt. Zu große Moleküle können nicht mit hoher Ausbeute an die Oberfläche des Substrats oder an das schon gebildete Netzwerk anbinden und werden durch die Reinigung der Proben entfernt (vgl. 4.2.1.3). Dadurch bleibt die Dicke der Schicht nach einer gewissen Zeit konstant. Dies ist im Besonderen bei den PEG-Diamin-GE-Netzwerken zu erkennen.

Die Beschreibung der Bildung der Säurechlorid-Netzwerke (vgl. 4.2.2) scheint auf molekularer Ebene noch komplexer zu sein. Das Säurechlorid wird auf die schon aufgetragene PEG-Schicht aus der Gasphase aufgebracht. Im Anschluss diffundiert es in die Schicht, wobei es zur Bildung eines Netzwerkes kommt. Durch das nachträgliche

Benetzen mit einem Lösemittel scheint sich die Reaktion zu vervollständigen. In einer anderen Vorstellung wird die PEG-Schicht von dem kondensierten Säurechlorid getränkt, im Anschluss fungiert es als Lösemittel. Danach reagiert es nach einem ähnlichen Prinzip wie das PEG-Diamin-GE-Netzwerk. Gegen diese Hypothese spricht, dass das nachträgliche Benetzen der Schicht mit einem Lösemittel einen Einfluss auf die Produktbildung hat. An diesem Punkt sind weitere Untersuchungen nötig, die sich vor allem mit der Menge des auf die Oberfläche aufgetragenen Säurechlorids und mit der Diffusion des Säurechlorids in dünnen Schichten befassen. In diesem Zusammenhang ist es interessant wie sich die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Größe der gebildeten Moleküle verändert.

Um die Wahrscheinlichkeit der Bildung verschiedener Einheiten des Netzwerkes zu beschreiben wurde ein kinetisches Modell aufgestellt. Damit können generelle Tendenzen der Netzwerkbildung aufgezeigt werden. Für die mathematische Beschreibung wurde von einem bimolekularen Zeitgesetz ausgegangen.^[162] Für unterschiedliche Konzentrationen der beiden Ausgangsstoffe ergibt sich nach Integration (Gleichung 13):

$$P = \frac{[X_0][Y_0](e^{kt([X_0]-[Y_0])} - 1)}{[X_0]e^{kt([Y_0]-[X_0])} - [Y_0]} \quad (13)$$

Für gleiche Konzentrationen der Ausgangsstoffe Z_0 berechnet sich die Konzentration des Produktes bzw. der Produkte P mit (Gleichung 14):

$$P = [Z_0] \left(1 - \frac{1}{[Z_0]kt + 1} \right) \quad (14)$$

Wobei P das Produkt repräsentiert. X_0 und Y_0 sind die Ausgangskonzentrationen der Reaktanten, k die Geschwindigkeitskonstante und t die betrachtete Zeit nach dem Start der Reaktion.

Die Reaktionen zwischen di- und trifunktionellen Ausgangsstoffen führen zu einem komplexen Produktspektrum (Tabelle 16). Die Moleküle wurden zu AA (X) Elementen für ein bifunktionelles und zu BBB (Y) Elementen für ein trifunktionelles Molekül vereinfacht. Die verwendeten Moleküle haben zwei bzw. drei funktionelle Gruppen und daher mehrere reaktive Zentren. Die Anzahl der reaktiven funktionellen Gruppen an jedem Molekül und die sich daraus ergebende Reaktionswahrscheinlichkeit wird durch einen Faktor (k_F) in die Geschwindigkeitskonstante einbezogen. Dabei können dieselben Produkte über unterschiedliche Reaktionswege gebildet werden, was im Modell Berücksichtigung

findet. Die gebildeten Produkte können wiederum neue Reaktionswege beschreiten. Somit steigt die Komplexität mit den Stufen der betrachteten Reaktionsebenen, im Weiteren als Generationen bezeichnet. Mit den Generationen nimmt auch die Größe der Moleküle zu. Das hat wiederum einen Einfluss auf das Diffusionsverhalten und damit auch auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Dies findet zur Vereinfachung keine Berücksichtigung in dem vorgestellten Modell. Ebenfalls findet ein möglicher Unterschied der Geschwindigkeitskonstante zwischen der Reaktion mit der Oberfläche und der Reaktion zwischen den Edukten selbst keine gesonderte Berücksichtigung.

Tabelle 16: Spektrum verschiedener Produkte der Generationen der Netzbildung – Die Zahlen in Klammern bezeichnen die selben Produkte, welcher über andere Reaktionswege gebildet wurden.

Ausgangsverbindung 1 (X_0)	Ausgangsverbindung 2 (Y_0)	P	Reaktivität k_F
1. Generation			
AA	BBB	ABB	6
2. Generation			
AA	ABB	AAB	4
BBB	ABB	BBBB	3
ABB	ABB	ABBB	7
3. Generation			
AA	AAB	AAA	2
AA	BBBB	ABBB (1)	8
AA	ABBB	ABBA (1)	6
BBB	AAB	ABBB (2)	6
BBB	ABBB	BBBBB (1)	3
ABB	AAB	ABBA (2)	4
ABB	AAB	ABBA (3)	1
ABB	BBBB	BBBBB (2)	4
ABB	ABBB	ABBBB (1)	2
ABB	ABBB	ABBBB (2)	3

Die Produkte können Klassen zusammengefasst werden. Diese geben Auskunft über das Verhältnis der funktionellen Gruppen zueinander.

- Klasse 1: A (von AA) > B (von BBB): AAA + AAB
- Klasse 2: A (von AA) = B (von BBB): ABBA
- Klasse 3: A (von AA) < B (von BBB): ABB + ABBB + BBBB + AB BBB + BBBB

Es werden mehr unterschiedliche Produkte mit den Generationen gebildet, aber die Produkte lassen sich in die gleichen Klassen einordnen. Aus diesem Grund werden die Ergebnisse der höchsten berechneten Komplexitätsstufe dargestellt. Eine vierte Generation wurde nicht aufgestellt, da sich die Verhältnisse der Klassen schon von der zweiten zur dritten nicht wesentlich verändert haben.

Für jede Reaktion lässt sich die Produktbildung in Abhängigkeit der Zeit darstellen. Die Produkte der vorhergehenden Reaktion gehen in die Folgegeneration als Ausgangskonzentrationen ein. Geht ein in der vorhergehenden Generation gebildetes Produkt in mehrere weitere Reaktionen ein wird es entsprechend auf mehrere Reaktionswege aufgeteilt.

In Abhängigkeit der Reaktionszeit, der Geschwindigkeit und der Ausgangskonzentration lassen sich so verschiedene zeitliche Verläufe der Produktbildung der Reaktionen modellieren. Für die Geschwindigkeitskonstante wurde ein fiktiver Wert gewählt, da sie selbst keinen Einfluss auf das Verhältnis der Produkte nehmen sollte. Im ersten Fall wird von gleichen Konzentrationen der Ausgangsstoffe ausgegangen. Eine Reaktion der Ausgangsstoffe mit sich selbst, wie sie beim GE auftreten kann, wird vernachlässigt

Fall 1: Konzentration von AA = BBB

Wird von den gleichen Ausgangskonzentrationen von AA und BBB ausgegangen, zeigt sich, dass mit einem großen Anteil ABB und ABBA Einheiten gebildet werden (Abbildung 56). Dies deutet einen Überschuss der funktionellen Gruppe des trifunktionellen Bausteins BBB im Netzwerk an. Produkte welche sich in die Klasse 1 ($A > B$) und Klasse 2 ($A = B$) einordnen lassen kommen im Produktspektrum jeweils mit einem Anteil von weniger als 10 % vor.

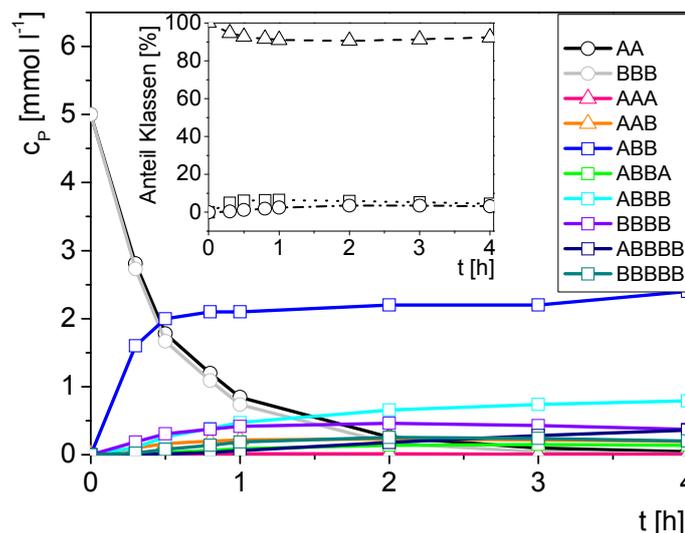


Abbildung 56: Verläufe der Produktbildung in der dritten Generation bei gleichen Ausgangskonzentrationen an AA und BBB - kleine Abbildung: Summendarstellung der Klassen: Klasse 1 = gepunktete Linie ($A > B$); Klasse 2 = Strich-Punkt-Linie ($A = B$); Klasse 3 = gestrichelte Linie ($A < B$)

Fall 2: Konzentration von AA \neq BBB

Wird der difunktionelle Baustein (AA) im Überschuss eingesetzt verringert sich der Anteil der Netzwerkelemente im Produktspektrum (Abbildung 57) mit einem Überschuss der funktionellen Gruppe des trifunktionellen Bausteins BBB (Klasse 3).

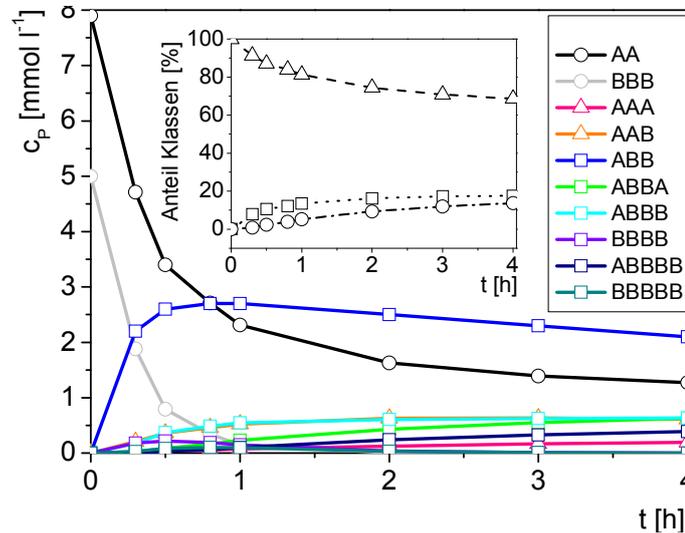


Abbildung 57: Verläufe der Produktbildung der Netzwerkbildung in der dritten Generation mit einem Überschuss von AA – kleine Abbildung: Summendarstellung der Klassen: Klasse 1 = gestrichelte Linie (A > B); Klasse 2 = Strich-Punkt-Linie (A = B); Klasse 3 = gepunktete Linie (A < B)

Netzwerkelemente mit einem Überschuss von A (Klasse 1) nehmen dann einen Anteil von 18 % ein. Produkte mit einem gleichen Anteil von A und B (Klasse 2) haben einen Anteil von 14 %.

Wird hingegen ein ähnlich hoher Überschuss an BBB in die Reaktion eingesetzt bilden sich zu 100% Netzwerkeinheiten mit einem Überschuss der funktionellen Gruppe B (Klasse 3).

Die Anteile der Produkte in den gebildeten Klassen können in Abhängigkeit der Konzentrationsverhältnisse der Ausgangsstoffe dargestellt werden (Abbildung 57).

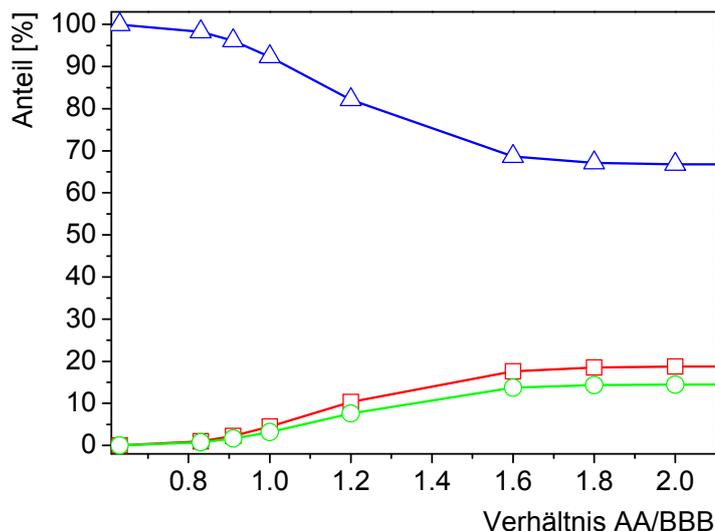


Abbildung 58: Anteil der Produktklassen – blau: Produkte mit einem Überschuss der funktionellen Gruppe B (aus BBB), rot: Produkte mit einem Überschuss an der funktionellen Gruppe A (aus AA), grün: Produkte mit der gleichen Anzahl von A (aus AA) und B (aus BBB)

Unabhängig von den Verhältnissen der Edukte bildet sich immer ein Überschuss der funktionellen Gruppe des trifunktionellen Eduktes aus. Ist das Konzentrationsverhältnis von AA zu BBB auf 0,8 bis 0,9 eingestellt (ein Überschuss von BBB), haben die Produkte der Klasse 1 ($A > B$) und Klasse 2 ($A = A$) den gleichen Anteil. Mit einem steigenden Überschuss von AA nimmt der Anteil der Produkte aus Klasse 1 im Verhältnis zu den Produkten mit einem gleichen Anteil der funktionellen Gruppe A und B (Klasse 2) zu. Ab einem Verhältnis von 1,6 bleibt die Verteilung der Produkte konstant. Produkte mit einem Überschuss von B kommen zu 69% vor, Produkte mit einem Überschuss von A zu 18% und Produkte mit gleichen Anteilen der funktionellen Gruppe A (aus AA) und B (aus BBB) zu 14%.

Das vorgestellte Modell stellt nur eine Näherung dar. Es baut auf zahlreichen Annahmen auf, da viele Parameter nicht bekannt sind oder in das Modell nicht einbezogen wurden. Dennoch lassen sich generelle Tendenzen erkennen.

Die Bildung des Netzwerkes mit dem Glycidyl Glycerolether (BBB) und dem PEG-Diamin (AA) ist für eine Beschreibung mit dem aufgestellten Modell zugänglicher. Da das Verhältnis der Ausgangskomponenten eingestellt werden kann (vgl. 4.2.1). Aus diesem Grund sollen die experimentellen Ergebnisse und das Modell der Netzwerkbildung mit dem PEG-Diamin und dem Glycidyl Glycerolether diskutiert werden. Als experimentelle Größe werden die XPS-Messungen herangezogen, welche eine Aussage über eine erfolgte Netzwerkbildung geben.

Die Experimente haben gezeigt, dass bei einem molaren Verhältnis von AA zu BBB um 1 der Anstieg in der Sauerstoffkonzentration der Elementaranalyse sehr

deutlich ist. Eine weitere Erhöhung der Konzentration des Glycidyl Glycerolethers führt im Vergleich zu einer APPG-Oberfläche ebenfalls zu einer Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in der Elementaranalyse. Durch die Derivatisierung mit TFAA konnte eine Reaktion des Glycidyl Glycerolethers mit sich selbst nachgewiesen werden.

Das Modell kann demzufolge einen Bereich der Verhältnisse von AA zu BBB zwischen $\sim 1,5 - 0,8$ beschreiben. Unterhalb eines Verhältnisses von AA zu BBB von 0,8 wird der Einfluss der Selbstkondensation des Glycidyl Glycerolethers zu groß, um das Modell anzuwenden. Durch das Modell wird diese Reaktion nicht berücksichtigt. Oberhalb eines Verhältnisses von 1,5 (AA/BBB) erfolgt die Bindung an die Oberfläche in geringerem Maße. Dies ist damit zu erklären, dass die Bindung an die mit NH_2 -Gruppen ausgestattete Oberfläche über das Epoxid (BBB) verläuft. Wird die Konzentration des Epoxides im Vergleich zum PEG zu klein kann die Bindung an die Oberfläche nicht mehr mit einem ausreichenden Umsatz erfolgen. Da die Anbindung an die Oberfläche mit einer anderen Geschwindigkeit verlaufen kann.

Der Konzentrationsbereich in dem eine Netzwerkbildung erfolgt lässt sich mit dem aufgestellten Modell beschreiben. Weiterhin hilft das Modell generelle Tendenzen zu verstehen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt wie auf mit Aminogruppen funktionalisierte Polymeroberflächen, mittels Additions- und Kondensationsreaktionen, weitmaschige Netzwerke aufgebaut werden können. In den sich daraus in Wasser ausbildenden Hydrogelschichten wird es ermöglicht Proteine zu immobilisieren. Diese können dann in einer Umgebung studiert werden, die zum größten Teil aus Wasser besteht. Die Schichten können helfen die Probleme, die bei einer Bindung von Proteinen auf einer Fläche oder auf den bisher verwendeten Gelschichten bestehen, zu überwinden.

Werden Proteine in der Fläche gebunden, dies kann auch ein engmaschiges Hydrogel sein, besteht die Gefahr, dass sie ihre biologische Aktivität verändern.

Ein Weg entsprechende Netzwerke aufzubauen lässt sich durch die Reaktion von PEG-Diaminen mit trifunktionellen Molekülen realisieren. Dazu wurde ein trifunktionelles Epoxid (Glycerol Glycidylether (GE)) oder Säurechloride (1,3,5-Benzentricarbonsäurechlorid (BTC) und Propantrisäurechlorid) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die auf einer Oberfläche aufgetragenen Ausgangsverbindungen zur Reaktion gebracht werden können, wobei sich Schichten ausbilden, die mehrere zehn Nanometer dick sind und in einem feuchten Stickstoffstrom zu einer dreifach dickeren Gelschicht quellen. Mit XPS konnte die atomare Zusammensetzung der Schichten ermittelt werden. Durch die Verwendung von auf der Stöchiometrie basierenden Modellen wurde die Maschenweite der Netzwerke abgeleitet. Es konnte gezeigt werden, dass der Abstand zwischen zwei Verzweigungen in den Netzwerken mindestens 20 nm beträgt, welcher damit ausreichend ist, um die Diffusion von Proteinen in das gebildete Netzwerk zu erlauben. Durch die Variation der Größe der PEG-Oligomere und über die Reaktionsbedingungen lässt sich die Maschenweite variieren. Da das Netzwerk aus PEG-Oligomeren mit einer molekularen Masse von 2000 bzw. 3000 g mol⁻¹ aufgebaut ist, wird eine niedrige Konzentration an funktionellen Gruppen erreicht. Mit Fluoreszenzmarkierung konnte die Konzentration der Gruppen im Bereich von wenigen 100 pmol cm⁻² bestimmt werden. Wird die Dicke eines gequollenen Gels, von ca. 100 nm, herangezogen, zeigt sich, dass die Konzentration der Gruppen im Bereich von mehreren 10 μmol cm⁻³ liegt. Der daraus berechenbare Abstand an Gruppen beträgt 5,5 nm. Dienen die funktionellen Gruppen der Immobilisation von Proteinen, stehen dem Protein viel weniger Gruppen zur Verfügung als das bei vielen anderen Funktionalisierungen der Fall ist. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit von mehrfachen

Reaktionen an den Proteinen reduziert, wodurch die biologische Funktion der Proteine weniger stark beeinflusst werden sollte.

Durch die verwendeten Reaktionen lassen sich Netzwerke mit Amino-, Hydroxy- oder COOH-Gruppen herstellen. Die Netzwerke weisen in Wasser bei unterschiedlichem pH-Wert eine ausreichende Stabilität aus.

Durch die Zugabe von heterofunktionellen Substanzen, bei denen nur eine der funktionellen Gruppen in der Netzwerkbildung reagiert, können weitere Gruppen in das Netzwerk eingeführt oder die Konzentration der vorhanden erhöht werden. Das Prinzip besteht darin, dass die dritte Komponente nur mit einer Gruppe reagiert und die anderen funktionellen Gruppen für die Immobilisierung von Proteinen zur Verfügung stehen. So konnte gezeigt werden, dass sich mittels dieses Verfahrens durch die Reaktion mit Alanin zusätzlich COOH-Gruppen einführen lassen. Mit dem Ziel das Protein Streptavidin zu immobilisieren wurde ein Biotin-Derivat mit einer primären Aminogruppe in das Netzwerk eingebaut. Mit Fluoreszenzspektroskopie konnte das fluoreszenzmarkierte Protein in den Schichten nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die Fluoreszenzintensität um einen Faktor 6 höher ist, als sie sein kann, wenn die Proteine in einer Monolage auf einer Fläche gebunden sind. In einem weiteren Schritt wurde Biotin-Protein A an dem immobilisierten Streptavidin gebunden und von einem Antikörper (IgG) erkannt. Damit konnte der Nachweis erbracht werden, dass die Nanohydrogelschichten für die Immobilisierung von Proteinen Verwendung finden können.

Neben der Bindung von Proteinen können die funktionellen Gruppen im Netzwerk für weitere Reaktionen eingesetzt werden. So lassen sich durch die kontrollierte Reaktion von COOH-Gruppen mit einem Alkoxyamin chemische Gradienten von funktionellen Gruppen auf einem Substrat erzeugen. Diese können unter anderem für die konzentrationsabhängige Zellanlagerung verwendet werden.

Es kann gezeigt werden, dass durch die Kombination von XPS, Fluoreszenzspektroskopie und Ellipsometrie eine molekulare Beschreibung von Netzwerken auf festen Substraten möglich ist. Aufbauend auf einer Synthesestrategie lassen sich Netzwerke herstellen, welche im Anschluss für eine gezielte Anwendung angepasst werden können. Folgende Parameter lassen sich verändern und analysieren:

- Konzentration und Art der funktionellen Gruppen in den Netzwerken
- Maschenweite
- Schichtdicke

In Tabelle 17 ist eine zusammenfassende Übersicht über einige Netzwerkparameter gezeigt.

Tabelle 17: Übersicht über ermittelte Parameter der Netzwerke

Parameter	GE-Netzwerke	BTC-Netzwerke
Substrat	PE, COC	PE, COC
Oligomer	PEG-Diamin	PEG-Diamin
trifunktionelle Komponente	Glycidyl Glycerolether	Benzenetricarbonsäurechlorid Propantricarbonsäurechlorid
Auftrag der Komponenten	aus Lösung	aus Lösung und Gasphase
Reaktionszeiten [min]	240 - 420	0,5 - 1
mögliche Endgruppen	NH ₂ , Epoxid (OH), OH	NH ₂ , COOH
Konzentrationsbereich NH ₂ [$\mu\text{mol cm}^{-2}$]	2 - 5	~ 60
Konzentrationsbereich COOH [$\mu\text{mol cm}^{-2}$]		210 - 290
Schichtdicke trocken [nm]	10 - 80	10 - 55
Quellfaktor in Luftfeuchtigkeit	1,9 - 3,3	2,2 - 2,5
Maschenweite [nm]	> 22	> 26
Stabilität im Puffer (1 h) - pH	3 < pH < 9	4 < pH < 9
Erweiterung auf drei Komponenten	ja	ja
Alanin - Konzentration - COOH [nmol cm^{-2}]		0,6 - 0,8
Biotin-Amin-Derivat - Streptavidin [$\mu\text{mol cm}^{-2}$]	15 - 40	2,5 - 40
Kapazitätserhöhung im Vgl. 2 D	~ 6	~ 6

Neben weiteren Untersuchungen zur Kontrolle und der Analyse der Netzwerkparameter können in Zukunft neue Reaktionswege beschrrieben werden.

Von Interesse wäre der Ersatz von PEG-Diaminen durch PEG-Diole in Kombination mit dem Glycidyl Glycerolether, dadurch kann die Bildung von Ammonium-Gruppen in den Netzwerken vollständig ausgeschlossen werden. Weiterhin kann es von Interesse sein anstelle von PEG lineare Polyglycerole (PG) zu verwenden, da sie eine höhere Stabilität aufweisen. Durch die Verwendung von Copolymeren lassen sich neue Richtungen erschließen. Ein anderer Weg kann die Bildung von Urethan-Bindungen sein. Urethan-Bindungen lassen sich in XPS-Spektren durch eine gut separierte Komponente auswerten. Einen weiteren möglichen Ansatzpunkt stellen silanbasierte Reaktionen zu Herstellung von Netzwerken für biologischen Anwendungen dar, wie sie von Habers et. al. vorgestellt wurden.^[78] Die Verwendung

von anderen Dreikomponentensystemen und ein besseres Verständnis des daraus gebildeten Produktes ist ebenfalls von Interesse.

Mit dem letzten Punkt im Zusammenhang stehend können Experimente durchgeführt werden, welche den Netzwerkbildungsprozess selbst untersuchen. Denkbar wäre es, die Reaktion des BTC mit Diaminen auf einem transparenten Substrat mit UV/Vis-Spektroskopie zu verfolgen. Erweiternd können bei dünnen Schichten und einer geringen Konzentration des aromatischen Systems Reaktionspartner Verwendung finden, welche zu fluoreszierenden Produkten führen.

In Hinblick auf die Anwendung der Schichten für ein Mikroarray sollte eine laterale Strukturierung der Substrate angestrebt werden, um eine lokal begrenzte Reaktivität für die Bindung von biologisch aktiven Molekülen zu erreichen. Daneben kann das Studium von anderen Protein-Molekül-Interaktionen durchgeführt werden, wobei diese Aufgabenstellung in die biologische Forschung hineinreicht. Dazu kann es notwendig werden, dass die funktionellen Gruppen gebunden an einem Spacer (z.B. aus EG-Einheiten) in das Netzwerk eingebracht werden müssen, um die Proteine vom Grundgerüst des Netzwerkes auf Abstand zu halten. Daneben ist es interessant die Konformation von Proteinen direkt in den Gelschichten zu untersuchen, um weiteres Wissen über die Eigenschaften der Netzwerke zu generieren.

Andere Anwendungen können Mehrkomponentenarrays sein. Auf Grund der räumlichen Struktur des Netzwerke können unterschiedliche Moleküle im Raum fixiert und ihre Interaktion studiert werden. Damit kann die weitere Entwicklung von nanoskaligen Hydrogelschichten in mehrere Richtungen betrieben werden. Diese können sein:

- Erschließen von neuen Anwendungen, neben Proteinarrays (z.B.: Beschichtungen für Bioreaktoren)
- Verbesserung des Verständnisses der Netzwerkbildung (insbesondere des gasförmigen Auftrags einer zweiten Komponente)
- Untersuchungen zum Abbau der Gelschichten (z.B.: Langzeitstabilität)
- Verwendung anderer Ausgangsstoffe.

7 Literaturverzeichnis

- [1] K. Büssow, Z. Konthur, A. Lueking, H. Lehrach, G. Walter *Am. J. Pharmacogenomics* **2001**, 1 (1), 1-7
- [2] D. R. Bentley, *Med. Res. Rev.* **2000**, 20 (3), 189 - 196
- [3] W. Kusnezow, J. D. Hoheisel., *J. Mol. Recognit.* **2003**, 16, 165 - 176
- [4] A. Bernard, J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard, E. Delamarche *Adv. Mater.* **2000**, 12, 1067 - 1770
- [5] A. H. Diercks, A. Ozinsky, C. L. Hansen, J. M. Spotts, D. J. Rodrigue, A. Aderem *Anal. Biochem.* **2009**, 386, 30 - 35
- [6] Y. Liu, C. M. Li, W. Hu, Z. Lu. *Talanta*, **2009**, 77, 1165 - 1171
- [7] B. D. Ratner, S. J. Bryant *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2004**, 6, 41 – 75
- [8] J. Fick, R. Steitz, V. Leiner, S. Tokumitsu, M. Himmelhaus, M. Grunze *Langmuir* **2004**, 20, 3848 - 3853
- [9] Z. Suo, F. T. Arce, R. Avci, K. Thieltges, B. Spangler *Langmuir* **2006**, 22 (8), 3844 – 3855
- [10] W. Kusnezow, J. D. Hoheisel *High-Throughput Proteomics: Protein-Arrays* **2002**, 33, 14-23,
- [11] S. M. Schiller, Dev Kambhampati, G. Stengel, J. Dolderer, P. E. Nielsen, R. Förch, W. Knoll, *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, 211, 222-228
- [12] H. Takahashi, K. Emoto K, M. Dubey, D.G. Castner, D.W. Grainger *Adv. Funct. Mater.*, **2009**, 2079 - 2088
- [13] A. Holländer, S. Kröpke, F. Pippig *Applied Surface Science* **2008**, 40; 379-385
- [14] J. R. Rasmussen, E. R. Stedronsky, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99 (14), 4736 - 4745
- [15] J. M. Goddard, J. H. Hotchkiss, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32 (7), 698 - 725
- [16] P. M. Claesson, E. Blomberg, J. C. Fröhberg, T. Nylander, T. Arnebrant *Adv. Colloid Interface Sci.* **1995**, 57, 161-227
- [17] J. J. Gray, *Current Opinion in Structural Biology* **2004**, 14, 110-115
- [18] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, 91, 233-244
- [19] V. Ragoonanan, A. Aksan A . *Transfus. Med. Hemother.* **2007**, 34, 246 - 252

-
- [20] D. Whitford; Proteins: Structure and Function; Wiley and Sons; **2005**
- [21] M. C. Coen, R. Lehmann, P. Groning, M. Biemann, C. Galli. L. Schlapbach *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, 233, 180 - 189
- [22] H. Dorst; Plasmachemie; Akademie Verlag; **1978**
- [23] R. Hippler, H. Kersten, M. Schmidt, K.H. Schönbach; Low Temperature Plasmas; WILEY- VCH; 2nd edition; **2008**
- [24] K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar, H. J. Griesser *Plasma Process. Polym.* **2006**, 3, 392 - 418
- [25] N. V. Bhat, D. J. Upadhyay *J. Appl. Polym. Sci.* **2002**, 86, 925 - 936 P323
- [26] J. G. A. Terlingen, H. F. C. Gerritsen, A. S. Hoffman, J. Feijen. *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, 57, 969 - 982
- [27] V. B. Ivanov, J. Behnisch, A. Holländer, F. Mehdorn, H. Zimmermann *Surf. and Interface Anal.* **1996**, 24, 257 - 262
- [28] S. Weidner, G. Kuhn, R. Decker, A. Ghode, J. Friedrich. *Surf. Coat. Technol.* **1999**, 116, 796 - 801
- [29] A. Vesel, M. Mozetic, A. Zala Vacuum, **2007**, 82, 248 - 251
- [30] U. Oran, S. Swaraj, J. F. Friedrich, E. S. Unger. *Plasma Process. Polym.* **2005**, 2, 563 - 571
- [31] E. Yegen, U. Zimmermann, W. E. S. Unger, T. Braun *Plasma Process. Polym.* **2009**, 6, 11 - 16
- [32] Q. Cheng, K. Komvopoulos *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 213 - 219
- [33] L. Bureau. Journal of Physics: Conference Series , **2007**, 89, 1 - 8
- [34] T.-M. Ko, J.-C. Lin, S. L. Coope *J. Colloid Interf. Sci.* **1993**, 156, 207 - 217
- [35] F. Fally, I. Virlet, J. Riga, J. J. Verbist. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, 59, 1569 - 1584
- [36] S. R. Holmes-Farley, R. H. Reamey, R. Nuzzo, T. J. McCarthy, G. M. Whitesides *Langmuir* **1987**, 3(5), 799 - 815
- [37] F. Pippig, A. Holländer *Appl. Surf. Sci.* **2007**, 253, 6817 - 6823
- [38] S. Flink, F. C. J. M. van Veggel, D. N. Reinhoudt *J. Phys. Org. Chem.* **2001**, 14, 407 - 415
- [39] N. Graf, A. Lippitz, T. Gross, F. Pippig, A. Holländer, W. Unger *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 725-738
- [40] F. Fixe, M. Dufva, P. Telleman, C. B. V. Christensen. *Nucl. Acids Res.* **2004**, 32, 9

-
- [41] C. A. Fail, S. A. Evenson, L. J. Ward, W. C. E. Scholfield, J. P. S. Badyal *Langmuir* **2002**, 18, 264 - 268
- [42] P. Gasteier , A. Reska , P. Schulte, J. Salber, A. Offenhäusser, M. Moeller, J. Groll *Macromol. Biosci.*, **2007**, 7(8), 1010 – 1023
- [43] R. G. Nuzzo, D. L. Allara. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 4481 - 4483
- [44] C. Boozer, S. Chen, S. Jiang. *Langmuir*, **2006**, 22, 4694-4698
- [45] K. L. Prime, G. M. Whitesides *Science* **1991**, 252, 1164 - 1167
- [46] L. D. Unsworth , H. Sheardown, J. L. Brash *Langmuir* , **2005**, 21, 1036 - 1041
- [47] N. Bunjes, E. K. Schmidt, A. Jonczyk, F. Rippmann, D. Beyer, H. Ringsdorf, P. Gräber, W. Knoll, R. Naumann *Langmuir* **1997**, 13, 6188 - 6194
- [48] S. Herrwerth, T. Rosendahl, C. Feng, J. Fick, W. Eck, M. Himmelhaus, R. Dahint, M. Grunze *Langmuir* **2003**, 19, 1880 - 1887
- [49] N. Xia , Y. Hu, D. W. Grainger, D. G. Castner *Langmuir*, **2002**, 18, 3255 - 3262
- [50] C. Siegers, M. Biesalski, R. Haag *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 2831 - 2838
- [51] N. H. Mack, R. Dong, R. G. Nuzzo *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7871 - 7881
- [52] Jacob Sagiv *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 92 - 98
- [53] M. S. Sanford, P. T. Charles, J. C. Robert, D. W. Conrad *Chem. Mater.* **1998**, 10, 1510 - 1520
- [54] A. Revizin, P. Rajagopalan, A. W. Tilles, F. Berthiaume, M. L. Yarmush, M. Toner *Langmuir* **2004**, 20, 2999 - 3005
- [55] G. Mao, D. G. Castner and D. W. Grainger *Chem. Mater.* **1997**, 9, 1741 - 1750
- [56] N.-P. Huang, J. Vörös, S. M. De Paul, M. Textor, N. D. Spencer *Langmuir* **2002**, 18, 220 - 230
- [57] K. Yu, H. Wang, L. Xue, Y. Han *Langmuir* **2007**, 23, 1443 - 1452 P220
- [58] G. Sakellariou, M. Park, R. Advincula, J. W. Mays, N. Hadjichristidis *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* **2006**, 40, 769 - 782
- [59] P. T. Charles, C. R. Taitt, E. R. Goldman, J. G. Rangasammy, D. A. Stenger *Langmuir* **2004**, 20, 270 - 272
- [60] G. C. M. Steffens, L. Nothdurft, G. Buse, H. Thissen, H. Höcker, D. Klee *Biomaterials* **2002**, 23 (16), 3523 - 3531
- [61] D. F. De Tar, R. Silverstein *J. Am. Chem Soc.* **1966**, 88 (5), 1020 – 1023
- [62] Y. Gao, I. Kyratzis *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19 (10), 1945 – 1950

-
- [63] A. Larsson, T. Ekblad, O. Andersson, B. Liedberg *Biomacromolecules* **2007**, 8, 287 - 295
- [64] S. Edmondson, V. L. Osborne, W. T. S. Huck *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 14 - 22
- [65] M. D. Lechner; *Makromolekulare Chemie*; Birkhäuser Verlag; dritte Auflage **2003**; 72
- [66] M. Ejaz, S. Yamamoto, K. Ohno, Y. Tsujii, T. Fukuda *Macromolecules* **1998**, 31, 5934 - 5936
- [67] W. Huang, G. L. Baker, M. L. Bruening. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 8, 1510 - 1512
- [68] E. Wischerhoff, K. Uhlig, A. Lankenau, H. G. Börner, A. Laschewsky, C. Duschl, J.-F. Lutz *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 30, 5666 - 5668
- [69] E. Rakhmatullina, T. Braun, T. Kaufmann, H. Spillmann, V. Malinova, W. Meier *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, 208, 1283 – 1293
- [70] N. Luo, S. M. Husson, D. E. Hirt, D. W. Schwark, *J. Appl. Polym. Sci.*, **2004**, 92, 1589 - 1595
- [71] J. Lindqvist, E. Malmström *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, 100, 4155 - 4162
- [72] J. Huang, H. Murata, R. R. Koepsel, A. J. Russell, K. Matyjaszewski, *Biomacromolecules* **2007**, A - D
- [73] F. Yao, G.-D. Fu, J. Zhao, E.-T. Kang, K. G. Neoh *J. Membr. Sci* **2008**, 319, 149 - 157
- [74] Y.-L. Liu, M.-T. Luo, J.-Y. Lai *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, 28, 329 - 333
- [75] M. Baum, W. J. Brittain *Macromolecules* **2002**, 35, 610 - 615
- [76] L. Barner, T. P. Davis, M. H. Stenzel, C. Barner-Kowolik *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, 28 (5), 539 - 559
- [77] Y. Lu, S. Chen, Y. Hu, T.C. Chung *Polymer Int.* **2004**, 52, 1963 - 1967
- [78] G. M. Harbers, K. Emoto, C. Greef, S. W. Metzger, H. N. Woodward, J. J. Mascali, D. W. Grainger, M. J. Lochhead. *Chem. Mater.* **2007**, 19, 4405–4414
- [79] K. Merrett, R. M. Cornelius, W. G. McClung, L. D. Unsworth, H. Sheardown. *Polym. Edn.* **2002**, 13, 593 - 621
- [80] D. Briggs, M. P. Seah; *Practical Surface Analysis*, John Wiley & Sons; Chichester; 2. Ausgabe 1990; 52
- [81] E. E. Johnston, B. D. Ratner. *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, **1996**, 81(3), 303 - 317

-
- [82] B. D. Ratner, B. J. Tyler, A. Chilkoti *Clinical Materials* **1993**, 13, 71 - 84
- [83] F. Garbessi, M. Morra, E. Occhiello, *Polymer Surfaces – From Physics to Technology*, John Wiley & Sons; Chichester, 1998, 118
- [84] D. Léonard, H. J. Mathieu *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 365, 3 - 11
- [85] H. Fujiwara, *Spectroscopic Ellipsometry – Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester, 2007
- [86] R. Steinhardt, E. Serfass *Anal. Chem.* **1951**, 23 (11), 1585 - 1590
- [87] K. Siegbahn, C. N. Nordling, A. Fahlman, R. Nordberg, K. Hamrin, J. Hedman, G. Johansson, T. Bermark, S. E. Karlsson, I. Lindgren, B. Lindberg; *ESCA; Atomic, Molecular and Solid State Structure Studied by Means of Electron Spectroscopy*; Almquist and Wiksells; Uppsala; 1967
- [88] C. Nordling, E. Sokolowski, K. Siegbahn *Physical Review*, **1957**, 105, 1676 - 1677
- [89] J. Jenkin, R. Leckey, J. Liesegang *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, **1977**, 12, 1 - 35
- [90] D. T. Clark, D. Kilcast, W. K. R. Musgrave *J. Chem. Soc. D*, 1971, 516b
- [91] D. T. Clark, R. D. Chambers, D. Kilcast and W. K. R. Musgrave *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1972**, 68, 309 - 319
- [92] D. T. Clark, D. Kilcast, W. J. Feast, W. K. R. Musgrave. *J. Polym. Sci. A-1: Polym. Chem.*, **1972**, 10(6), 1637 - 1654
- [93] D. T. Clark *Phys. Scr* **1977**, 16, 307 - 328
- [94] D. R. Miller, N. A. Peppas *Jms-Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1986**, 26, 33 - 66
- [95] G. Beamson, D. Briggs; *High Resolution of Organic Polymers – The Scienta ESCA300 Database*; Jon Wiley & Sons, 1992
- [96] M. P. Seah, W. A. Dench *Surf. Interface Anal.* **1979**, 1, 2 - 11
- [97] J. C. Shelton *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1974**, 3 (6), 417 - 425
- [98] S. Tanuma, C. J. Powell, D. R. Penn *Surf. Interface Anal.* **1993**, 21, 165 - 176
- [99] P. Cadman, G. Gossedge, J. D. Scot. *J. Electron Spectrosc. Relat. Phenom.* **1978**, 13 (1), 1 - 6
- [100] Christopher D. Batich. *Appl. Surf. Sci.* **1988**, 32 (1-2), 57 - 73
- [101] L.J. Gerense, J.F. Elman, M.G. Mason, J.M. Pochan *Polymer* **1985**, 26 (8), 1162 - 1166

-
- [102] J. R. Rasmussen, D. E. Bergbreiter, G. M. Whitesides *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99 (14), 4746 - 4756
- [103] S. R. Holmes-Farley, G. M. Whitesides *Langmuir* **1986**, 2(3), 266 - 281
- [104] R. Wilson, D. J. Schiffrin *Analyst* **1995**, 120, 175 - 178
- [105] M. Weigele, S. L. DeBernardo, J. P. Teng, W. Leimgruber. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94(16), 5927 - 5928
- [106] S. Stein, P. Böhlen, J. Stone, W. Dairman, S. Udenfriend *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, 155 (1), 203 - 212
- [107] P. Böhlen, S. Stein, W. Dairman, S. Udenfriend *Arch. Biochem. Biophys.* **1973**, 155 (1) – 213 - 220
- [108] S. De Bernardo, M. Weigele, V. Toome, K. Manhart, W. Leimgruber, P. Böhlen, S. Stein, S. Udenfriend. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, 163 (1), 390 - 399
- [109] A. M. Felix, V. Toome, S. De Bernardo, M. Weigele. *Arch. Biochem. Biophys.* **1975**, 168 (2), 601 - 608
- [110] S. Stein, P. Böhlen, S. Udenfriend *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, 163(1), 400 - 403
- [111] K. R. Love, P. H. Seeberger *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3583 - 3586
- [112] M. Wilchek, E. A. Bayer *Biomol. Eng.* **1999**, 16, 1 - 4
- [113] C. Rosano, P. Arosio, M. Bolognesi *Biomolecular Engineering* **1999**, 16, 5 - 12
- [114] D. K. Goyal, G. K. Pribil, J. A. Woollam, A. Subramanian *Mater. Sci. Eng.: B*, **2008**, 149, 26 - 33
- [115] K. Hinrichs, M. Gensch, N. Nikonenko, J. Pionteck, K.-J. Eichhorn *Macromol. Symp.* **2005**, 230, 26 - 32
- [116] C. Himcinschi, N. Meyer, S. Hartmann, M. Gersdorff, M. Friedrich, H. H. Johannes, W. Kowalsky, M. Schwamberger, G. Strauch, M. Heuken, D. R. T. Zahn *Appl. Phys. A: Mater. Sci. & Process.* **2005**, 80 (3), 551 - 555
- [117] A. L. Cauchy *Bulletin de Férussac* **1830**, 14, 6 - 10
- [118] J. L. Dalsin, L. Lin, S. Tosatti, J. Vörös, M. Textor, P. B. Messersmith *Langmuir*, **2005**, 21, 640 – 646
- [119] S. Sharma, R. W. Johnson, T. A. Desai *Appl. Surf. Sci.* **2003**, 206, 218 - 229
- [120] B. Bilen, Y. Skarlatos, G. Aktas, M. N. Inci, T. Dispinar, M. M. Kose, A. Sanyal *J. Appl. Phys.* **2007**, 102

-
- [121] N. Tillman, A. Ulman, J. S. Schildkraut, T. L. Penner *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 10, 6136 - 6144
- [122] M. D. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara, C. E. D. Chidsey., *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3559 - 3568
- [123] A. Perentes, I. Utke, B. Dwir, M. Leutenegger, T. Lasser, P. Hoffmann, F. Baida, M.-P. Bernal, M. Russey, J. Salvi, D. Van Labeke *Nanotechnology* **2005**, 16, 273 - 277
- [124] M. Wanunu, A. Vaskevich, I. Rubinstein *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5569 - 5576
- [125] C. Betty *Rev. Sci. Instrument.* **1978**, 49 (2), 264 - 265
- [126] R. Wiken; Dissertation: Untersuchung zur Oberflächenmodifizierung ausgewählter Modellpolymere durch VUV-Photolyse; Universität Potsdam **1998**; 25
- [127] J. Stöhr; NEXAFS Spectroscopy, Springer Verlag; Heidelberg; 1992
- [128] P. E. Batson *Physical Review B* **1993**, 48, 2008-2610
- [129] M. Shtein, P. Peumans, J. B. Benziger, S. R. Forrest, *J. Appl. Phys.* **2003**, 93 (7), 4005 - 4016
- [130] T. X. Zhou, T. Ngo, J. J. Brown, M. Shtein, S. R. Forrest *Appl. Phys. Lett.* **2005**, 86 (2), 2005, 021107
- [131] M. A. Baldo, V. G. Kozlov, P. E. Burrows, S. R. Forrest, V. S. Ban, B. Koene, M. E. Thompson *Appl. Phys. Lett.* **1997**, 71 (21), 3033 - 3035
- [132] C. Rolin, S. Steudel, K. Myny, D. Cheyns, S. Verlaak, J. Genoe, P. Heremans *Appl. Phys. Lett.* **2006**, 89, 203502
- [133] M. Shtein, H. F. Gossenberger, J. B. Benziger, S. R. Forrest *J. Appl. Phys.* **2001**, 89 (2), 1470 - 1476
- [134] K. Schwetlick, Organikum, 21. Auflage, 2000, Wiley-VCH Weinheim, 498
- [135] O. Andersson, A. Larsson, T. Ekblad, B. Liedberg *Biomacromolecules* **2009**, 10, 142 - 148
- [136] D. W. Branch, B. C. Wheeler, G. J. Brewer, D. E. Leckband. *Biomaterials* **2001**, 22, 1035 - 1047
- [137] W.-C. Lai, W.-B. Liao *Polymer* **2003**, 44 (26), 8103 – 8109
- [138] F. Pippig, S. Sarghini, A. Holländer, S. Paulussen, H. Terryn *Surf. Interface Anal.* **2009**, 41, 421 - 429

-
- [139] A. Chilkoti, B. D. Ratner, *Surf. Interface Anal.* **1991**, 17, 567 - 574
- [140] L.J. Crawford, N.R. Edmonds *Thin Solid Films* **2006**, 515(3), 907 - 910
- [141] Y. Hong, P. Krsko, M. Libera. *Langmuir* **2004**, 20, 11123 - 11126
- [142] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang *Org. Lett.* **2004**, 24 (6), 4603 - 4606
- [143] J. Kikuma, B.P. Tonner. *J. Electron Spectros. Relat. Phenom.* **1996**, 82, 53 - 60
- [144] O. Dhez, H. Ade, S. G. Urquhart. *J. Electron Spectros. Relat. Phenom.* **2003**, 128, 85 - 96
- [145] D.A. Outka, J. Stöhr, R.J. Madix, H.H. Rotermund, B. Hermsmeier, J. Solomon. *Surf. Sci.* **1987**, 185, 53 - 74
- [146] N. Graf, E. Yegen, T. Gross, A. Lippitz, W. Weigel, S. Krakert, A. Terfort, W. E.S. Unger *Surface Science* **2009**, 603, 2849-2860
- [147] M. Albrecht *Naturwissenschaften* 2007, 94 (12), 951 - 966
- [148] M. Wilcheka *Immunol. Lett.* **2005**, 103, 27 - 32
- [149] A. Arakaki, S. Hideshima, T. Nakagawa, D. Niwa, T. Tanaka, T. Matsunaga *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 88 (4), 543 - 546
- [150] D. A. Zubtsov, S. M. Ivanov, A. Y. Rubina, E. I. Dementieva, V. R. Chechetkin, A. S. Zasedatelev *J. Biotechn.* **2006**, 122 (1), 16 - 27
- [151] S. Ohnishi, M. Murata, M. Hato *Biophys. J.* **1998**, 74, 455 - 465 P431
- [152] Brookhaven Database of Proteins
- [153] J. Sjö Dahl. *FEBS Lett.* **1976**, 67, 62 - 67
- [154] T. Jøssang, J. Feder, E. Rosenqvist *J. Prot. Chem.* **1988**, 7, 165 - 171
- [155] C. E. Argarana, I. D. Kuntz, S. Birken, R. Axel, C. R. Cantor *Nucl. Acids Res.* **1986**, 14, 1871 - 1882
- [156] R. Murthy, C. E. Shell, M. A. Grunlan *Biomaterials*, **2009**, 13, 2433 - 2439
- [157] S. Herrwerth, W. Eck, S. Rheinhardt, M. Grunze *J. Am. Chem Soc.* **2003**, 125, 9359-9366
- [158] P. W. Atkins; Lehrbuch der Physikalischen Chemie; WILEY-VCH; Weinheim; 3. Auflage 2001; 938
- [159] P. W. Atkins; Lehrbuch der Physikalischen Chemie; WILEY-VCH; Weinheim; 3. Auflage 2001; 806
- [160] P. W. Atkins; Lehrbuch der Physikalischen Chemie; WILEY-VCH; Weinheim; 3. Auflage 2001; 802

[161] Datenblatt Glycidyl Glycerolether von Raschig Polymere GmbH

[162] P. W. Atkins; Lehrbuch der Physikalischen Chemie; WILEY-VCH; Weinheim; 3. Auflage 2001; 825

8 Anhang

8.1 Abkürzungen und Formelzeichen

Abkürzungen

AFM	Atom-Kraft-Mikroskopie
ATRP	Atom-Transfer-Radikal-Polymerisation
APPG-230	O,O'-Bis(2-aminopropyl)polypropylenglykol 230
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
BE	Bindungsenergie
BTC	1,3,5-Benzentricarbonsäurechlorid
COC	Cyclic Olefin Copolymer
DAE	1,2-Diaminoethan
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMAEMA	2-Dimethylaminoethylmethacrylat
DNA	Deoxyribonucleic acid (engl.) – Desoxyribonukleinsäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GE	Glycidyl Glycerolether
GPC	Gel-Permutations-Chromatographie
IGG	Immunglobulin
IR	Infrarot
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
NEXAFS	Near-Edge-X-ray-Finestructure Spectroscopy
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMP	Nitroxid-Mediated-Polymerisation
OWLS	Optische-Wellenleiter-Spektroskopie
PAA	Polyacrylsäure
PAMAM	Poly(amidoamin)-Dendrimer
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PET	Poly(ethylenterephthalat)
PTFE	Poly(tetrafluorethen)
PTC	Propansäuretrichlorid
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PEG-Diamin	O,O'-Bis(2-aminoethyl)ethylenglykol
PEG-DMA	Polyethylenglykol-dimethacrylat
PEG-MA	Polyethylenglykol-methacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskopie
PEO	Polyethylenoxid
PDMAEMA	Poly(2-dimethylaminoethylmethacrylat)
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
PG	Polyglycerol
PP	Polypropylen
PTFE	Poly(tetrafluorethylen)
RAFT	Reversibler-Additions-Fragmentierung-Kettenttransfer
ROP	Ringöffnungpolymerisation
RT	Raumtemperatur
SIMS	Sekundär-Ionen-Massen-Spektroskopie

Formelzeichen und Naturkonstanten

A,B,C	Cauchy-Parameter
c_V	Volumenkonzentration (mol m^{-3})
c_A	Flächenkonzentration (mol m^{-2})
c_L	Lösungskonzentration (mol m^{-3})
D	Diffusionskonstante ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
d	Schichtdicke (m)
E	elektrische Feldstärke (V m^{-1})
E_e	kinetische Energie (eV)
E_b ; BE	Bindungsenergie (eV)
g	Fallbeschleunigung ($9,81 \text{ m s}^{-2}$)
h	Plancksches Wirkungsquantum ($6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$)
h_C	Höhe eines Flüssigkeitsfilmes (m)
k	Boltzmann-Konstante ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)
M	Molare Masse
R	Universelle Gaskonstante ($8,315 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
r_p	Reflektionskoeffizient von p polarisiertem Licht
r_s	Reflektionskoeffizient von s polarisiertem Licht
T	Temperatur (K)
t	Zeit (s)
v	Geschwindigkeit (m s^{-1})
x	Wegstrecke (m)
η_L	Dynamische Viskosität ($\text{kg m}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
Δ, ψ	ellipsometrische Parameter
λ	Wellenlänge (m)
ρ_s	Dichte Feststoff (g m^{-3})
ρ_L	Dichte Flüssigkeit (g m^{-3})
π	ludolfsche Zahl (3,142)
ν	Frequenz (s^{-1})

8.2 Veröffentlichungen

Publikationen

- [1] F. Pippig, A. Holländer *Appl. Surf. Sci.* **2007**, 253, 6817-6823
- [2] A. Holländer, S. Kröpke, F. Pippig *Appl. Surf. Sci.* **2008**, 40, 379-385
- [3] A. Holländer, F. Pippig, M. Dubreuil, D. Vangeneugden *Plasma Process. Polym.* **2008**, 5, 345-349
- [4] F. Pippig, S. Sarghini, A. Holländer, S. Paulussen, H. Terryn *Surf. Interface Anal.* **2009**, 41, 421-429
- [5] J. Matousek, J. Pavlik, Z. Stryal, F. Pippig, Lubomir Kovacik, V. Stary, *Vacuum* **2009**, 84, 86-89
- [6] T. Gross, F. Pippig, B. Merz, R. Merz, U. Vohrer, M. Renate, H. Steffen, W. Bremser, W. Unger *Plasma Process. Polym.* **2010**, im Druck
- [7] N. Graf, A. Lippitz, T. Gross, F. Pippig, A. Holländer, W. Unger, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 725-738
- [8] F. Pippig, A. Holländer *Macromol. Biosci.* **2010**, im Druck

Patente

- [1] A. Holländer, F. Pippig; Verfahren zur Herstellung von nanoskaligen Netzwerken auf Oberflächen; DE 10 2008 045 982; **2010**

Vorträge

- [1] F. Pippig, A. Holländer; Fluoreszenzmarkierung mit Fluram bei hoher Funktionalgruppendichte; Workshop „Oberflächentechnologien mit Plasma und Ionenstrahlprozessen; Mühlleithen; 14.03.**2006** – 16.03.2006
- [2] F. Pippig, A. Holländer; Chemie und Analytik von 3D-funktionalisierten Polymeroberflächen; 14. Neues Dresdner Vakuumtechnisches Kolloquium; Dresden; 9.10.2006 – 20.10.**2006**
- [3] A. Holländer, St. Kröpke, F. Pippig; Chemical Analysis of Functionalized Polymer Surfaces, 12th European Conference on Applications of Surface and Interface Analysis (ECASIA); Brüssel (Belgien); 09.09.2007 – 14.09.**2007**

- [4] A. Holländer, F. Pippig, J.-F. Lutz; Hydrogelsynthese an Polymeroberflächen; Statusseminar Nanochem; Bonn; 18.06.**2008**
- [5] F. Pippig, A. Holländer; Derivatisierung mit TFAA zum Nachweis von OH und NH_x-Gruppen auf Oberflächen; Workshop „Oberflächentechnologien mit Plasma und Ionenstrahlprozessen; Mühlleithen; 10.03.2009 – 12.03.**2009**
- [6] F. Pippig, A. Holländer; Hydrogel Nanolayers for Biomedical Applications; 5. Jahrestagung BioMST; München; 23.06.2009 – 24.06.**2009**
- [7] F. Pippig, A. Holländer; Hydrogel Nanofilms on Surfaces; PolySurf 2009/07; Potsdam, 30.07.**2009**
- [8] F. Pippig, A. Holländer, S. Kröpke; OptoMat Technologietag; Molekulare Materialien und strukturierte Oberflächen; Potsdam; 05.11.**2009**

Poster

- [1] J. Matousek, J. Pavlik, Z. Stryhal, F. Pippig, L. Kovacik; RF magnetron sputtering of thin in Ar/n-Hexan working gas mixture; International Conference on Plasma Surface Engineering; Garmisch-Partenkirchen; 15.09.2008 – 19.09.**2008**
- [2] A. Holländer, F. Pippig; Determination of Functional Groups in Hydrogel Nanofilms, Polydays; Berlin; 01.10.2009 – 02.10.**2008**
- [3] A. Holländer, F. Pippig; Hydrogel Nanolayers for Biomedical Applications; 3rd European Conference on Chemistry in Life Sciences; Frankfurt (Main); 02.09.2009 – 05.09.**2009**
- [4] Th. Gross, F. Pippig, B. Merz, R. Merz, U. Vohren, R. Mix, H. Steffen, W. Bremser, W. Unger; Inter-laboratory comparison for chemical derivatization XPS: OH groups at plasma oxidized polypropylene; ECASIA 2009; Antalya (Türkei); 18.10.2009 – 23.10.**2009**

8.2 Lebenslauf

In der elektronischen Version wurde der Lebenslauf des Autors aus Datenschutzgründen entfernt.