

Katrin Niegelhell, BSc

Vorstudien
zur Entwicklung von Bio-Sensoren
mittels Oberflächensensitiver Methoden

MASTERARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieurin

Masterstudium Technische Chemie

eingereicht an der

Technischen Universität Graz

Betreuer

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Franz Stelzer

Institut für Chemische Technologie von Materialien

Ass.-Prof. Mag.rer.nat. Dr.rer.nat. Stefan Spirk

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

AFFIDAVIT

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources/resources, and that I have explicitly indicated all material which has been quoted either literally or by content from the sources used. The text document uploaded to TUGRAZonline is identical to the present master's thesis.

Datum / Date

Unterschrift / Signature

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die mir in den letzten Jahren beiseite gestanden haben und wesentlich zum erfolgreichen Abschluss meines Studium beigetragen haben.

Großer Dank für das interessante Thema meiner Masterarbeit und die ausgezeichnete Betreuung geht an Dr. Franz Stelzer und Dr. Stefan Spirk, insbesondere für die vielen Ideen und motivierenden Gespräche, aber auch für alles, was ich im letzten halben Jahr von ihnen lernen durfte.

Des Weiteren möchte ich mich sehr bei Dr. Tamilselvan Mohan für die Bereitstellung seiner Daten aus einer gemeinsamen Publikation bedanken. Sowie bei Dr. Thomas Grießer, der viel Zeit in XPS-Messungen und Diskussionen gesteckt hat. Ansonsten möchte ich auch Dr. Gregor Trimmel und Simon Leimgruber für die tatkräftige Unterstützung beim Aussuchen der Phosphonate danken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegen am ICTM für die nette Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft bedanken. Insbesondere möchte ich meine Schreibraumkollegen hervorheben, die mir richtig ans Herz gewachsen sind. Ohne sie hätte ich nur halb so viel Freude an der Arbeit gehabt.

Weiters möchte allen meinen Studienkollegen für die tolle gemeinsame Zeit, sowohl die, die wir mit Lernen, als auch die, die wir mit Feiern verbracht haben, danken.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben und mir, wenn nötig, meine Selbstzweifel genommen haben.

Kurzfassung

Biosensoren sind heutzutage nicht wegzudenkende Hilfsmittel in der Untersuchung von biologischen Systemen. Sie sind spezifisch, klein, tragbar, günstig und für *in situ* Analysen und Echt-Zeit-Beobachtungen geeignet. In dieser Arbeit werden Vorstudien zur Entwicklung von Biosensoren basierend auf Multi-Parametrischer Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (MP-SPRS) vorgestellt. MP-SPRS wird aufgrund ihrer Detektionsfähigkeit von verschiedenen Biomolekülinteraktionen verwendet. Besonderes Augenmerk wurde auf die Immobilisation der Biomoleküle auf den für die Methode notwendigen Goldoberflächen gelegt. Zum einen wurde die Adsorption von Phosphonat Monolayern untersucht, welche durch Funktionalisierung eine Anbindung von Proteinen ermöglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Phosphonate auf den Goldoberflächen adsorbieren und eine Korrelation zwischen theoretischen Moleküllängen und Schichtdicken der adsorbierten Schichten besteht. Zudem wurde der Bindungsmechanismus der Phosphonate mittels XPS studiert. Ein weiteres Immobilisationskonzept stellt die Adsorption von Biomolekülen auf modifizierten Cellulosefilmen, die auf Goldsubstraten aufgebracht wurden, dar. Die Experimente wurden mit Fluoresceinisothiocyanat-Rinderserumalbumin (FITC-BSA), einem Marker für unspezifische Proteinadsorption, durchgeführt. Das adsorbierte FITC-BSA kann als *Blocking Agent* eingesetzt werden, um eine selektive Funktionalisierung mit funktionellen Proteinen, wie Antikörpern, zu realisieren. Es stellte sich heraus, dass die Proteinadsorption über einen weiten Bereich durch externe Parameter, wie pH-Wert und die Ladungsdichte der Oberfläche, eingestellt werden kann. Zusätzlich wurden Adsorptionsversuche mit Quartz Crystal Microbalance – Dissipation (QCM-D) ausgeführt, die in Kombination mit Daten aus den MP-SPRS Messungen die Ermittlung des Wassergehalts der adsorbierten Schicht erlauben. Weiterführende Studien zu den behandelten Themen sind bereits in Arbeit.

Abstract

Biosensors are an irreplaceable tool for the investigation of biological systems. Small size, specificity, portability, low costs and the ability to analyze *in situ* and monitor in real-time are convincing advantages of such devices. Herein, we present pre-studies for the development of biosensors based on Multiple-Parametric Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (MP-SPRS). This technique was chosen, because of its capability to detect a variety of interactions between different biomolecules. Special emphasis was laid on the immobilization of the biomolecular analyte on gold surfaces, which are required for the generation of the MP-SPR signal. On the one hand, adsorption of phosphonate monolayers was investigated for the purpose of functionalization and crosslinking with proteins. The used phosphonates adsorbed on the gold surfaces and a correlation between theoretical molecule lengths and thicknesses of adsorbed layers could be established. Furthermore, the binding mechanism of phosphonates on the surfaces was examined by X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). Another immobilization method is the adsorption of biomolecules on modified cellulosic films that are attached to gold surfaces. Experiments were performed at the example of Fluorescein Isothiocyanate – Bovine Serum Albumin (FITC-BSA), a widely accepted marker for unspecific protein adsorption. In this work, the tuning of protein adsorption over a wide range was reached by variation of external parameters, *e.g.* pH-value and charge density of the cellulosic surface. Combination of MP-SPRS data and additional data from QCM-D adsorption studies yields the water content of the adsorbed species. The final aim is to use FITC-BSA as a blocking agent in order to achieve selective functionalization of cellulosic surfaces with functional proteins, like antibodies. Further studies concerning the discussed topics are underway.

Inhalt

1 Einleitung und Motivation	1
2 Theoretischer Hintergrund	3
2.1 Adsorption	3
2.1.1 Adsorption von Proteinen	5
2.1.2 Adsorption von Polyelektrolyten	8
2.2 Oberflächensensitive Charakterisierungsmethoden	10
2.2.1 Physikalische Grundlagen.....	10
2.2.2 Multi-Parametric Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (MP-SPRS)	14
2.2.3 Quartz Crystal Microbalance – Dissipation (QCM-D).....	22
2.2.4 Kombination von MP-SPRS und QCM-D Daten.....	26
3 Ergebnisse und Diskussion	27
3.1 Phosphonat Monolayer auf Gold	27
3.1.1 Adsorptionsstudie Phosphonat auf Gold	27
3.1.2 Charakterisierung Phosphonat Monolayer	33
3.1.3 Untersuchung Adsorptionsmechanismus Phosphonate an Goldoberflächen.....	34
3.2 Protein Adsorption an kationischen Cellulose-Oberflächen.....	45
3.2.1 Adsorptionsstudie kationisch modifizierte Cellulose auf Cellulose	45
3.2.2 Adsorptionsstudie FITC-BSA auf kationisch modifizierten Celluloseoberflächen...	48
3.2.3 Proteinadsorption und Quantifizierung auf strukturierten kationischen Celluloseoberflächen.....	55
4 Zusammenfassung und Ausblick	58
5 Problemdiskussion Messungen MP-SPR-Spektrometer	59
6 Experimentelles	62
6.1 Geräte.....	62
6.2 Chemikalien	63
6.3 Probenvorbereitung und Messung	64
6.3.1 Reinigung Gold-Sensor-Slides	64
6.3.2 Herstellung Cellulose-Filme.....	64
6.3.3 Herstellung Arbeitslösungen	65

6.3.4 Adsorption von Phosphonaten auf Gold.....	65
6.3.5 Bedampfen von Glassubstraten	65
6.3.6 Beschichtung bedampfter Substrate mit Phosphonaten.....	66
6.3.7 Probenvorbereitung Kontaktwinkelmessung Phosphonate	66
6.3.8 Adsorption von CMABC auf Cellulose-Filmen	66
6.3.9 Adsorption von FITC-BSA auf CMABC	66
6.3.10 Herstellung strukturierter kationischer Celluloseoberflächen	67
6.3.11 Adsorption kationischer Cellulosen und TRITC-BSA auf strukturierten Celluloseoberflächen.....	67
7 Appendix	68
7.1 Abkürzungsverzeichnis	68
7.2 Tabellenverzeichnis	69
7.3 Abbildungsverzeichnis.....	70
7.4 Referenzen	73
7.5 Curriculum Vitae.....	77

1 Einleitung und Motivation

Seit Jahren steigt das Interesse an der Entwicklung von Biosensoren aufgrund der ständig wachsenden Ansprüche an chemischen Daten zur Charakterisierung von unterschiedlichsten biologischen Systemen. Biosensoren sind analytische Messelemente zur Detektion von bestimmten Molekülen, die mit einem Sensormaterial in Wechselwirkung treten und damit ein chemisches Signal hervorrufen, das mittels eines Signalwandlers und elektrischen Detektors aufgenommen wird. Normalerweise genügen analytische Standard-Methoden aus, um dieselbe Information wie mit Biosensoren zu erhalten, jedoch haben Biosensoren ausschlaggebende Vorteile. Sie sind spezifisch, klein, tragbar, günstig und für *in-situ*-Analysen und Echt-Zeit-Beobachtungen von chemischen Parametern geeignet.^[1]

Der Einsatz von Multi-Parameter Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (MP-SPRS) in Biosensoren ist aufgrund der Detektionsfähigkeit von Antigen-Antikörper, Rezeptor-Ligand und Hormon-Rezeptor Wechselwirkungen möglich. Generell erlaubt die optische Anregung von Plasmonen an einer metallischen Oberfläche die Untersuchung von adsorbierten Filmen mit einer Dicke im sub-Nanometerbereich und einer lateralen Auflösung von einem Zehntel Mikrometer oder besser.^[2]

Ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung von Biosensoren ist die Immobilisierung von Biomolekülen auf der Metalloberfläche. Direkte Immobilisation führt zu konformellen Umordnungen oder sogar zu Denaturierung des Proteins, sowie geringer Oberflächenbelegung und damit einhergehender Verminderung der Aktivität und nicht-spezifischer Adsorption.^[3] Die Oberfläche muss daher bestimmte chemische Eigenschaften aufweisen um eine stabile und definierte Anbindung von Liganden zu ermöglichen. Beispielsweise wurden Goldoberflächen durch Verteilung von Liposomen, möglich durch die Hydrophobizität der Oberfläche, modifiziert. Eine weitere Vorgehensweise ist die Ausbildung von Self-Assembled-Monolayers (SAMs) mit Thiol-Molekülen auf Goldoberflächen und anschließender Bindung von Liganden an diesem Monolayer.^[2]

Im Zuge dieser Arbeit soll die Ausbildung von Phosphonat-Monolayer auf Gold durchgeführt werden. Eine Modifikation des Monolayers soll über Carbonsäureester-Gruppen am Ende des organischen Rests des Phosphonats, die basisch zur Carbonsäure umgewandelt werden, durch Funktionalisierung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) erfolgen. Dazu sollen Vorstudien mit kommerziell erhältlichen Phosphonaten durchgeführt werden um den Aufbau der SAMs zu überprüfen.

Eine andere Variante der Immobilisation ist mittels Polyelektrolytfilmen. Die Adsorption von kationischen oder anionischen Polyelektrolytfilmen erlaubt eine kontrollierte Modifikation von Oberflächen, die eine große Vielfalt an Substanzen adsorbieren können. Studien zeigen, dass Proteine ihre Reaktivität in Bezug auf ihre Antigene beibehalten, wenn sie in einen

Polyelektrolytfilm eingelagert sind. Ein Beispiel für einen negativ geladenen Polyelektrolyten ist Cellulose, welche aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen wird. Diese kann als dünne Schicht auf Gold-Oberflächen aufgetragen werden und als Substrat für Biomoleküle dienen. In der Literatur wird berichtet, dass die Proteinadsorption auf nicht modifizierten Celluloseoberflächen gering ist.^[4] In dieser Arbeit soll zunächst die unspezifische Proteinadsorption am Beispiel von Rinderserumalbumin (BSA) auf Cellulose untersucht werden und durch Einführung von kationischen Gruppen durch Adsorption einer zusätzlichen Polyelektrolytschicht auf der Cellulose, kontrolliert werden. Zusätzlich soll der Einfluss des pH-Werts bestimmt werden. Weist eines der untersuchten Systeme die gewollten Eigenschaften auf, so kann dieses zur Weiterentwicklung mit dem endgültigen Ziel der Herstellung eines Biosensors eingesetzt werden. Dabei soll BSA als *blocking agent*, der nicht-spezifische Bindung vermindert und die Sensitivität erhöht, agieren und die Funktionalisierung mit Antigenen/Antikörpern ermöglichen.

Das mitunter wichtigste Ziel dieser Masterarbeit ist es jedoch, die an der TU Graz neuartige Methode MP-SPRS zu etablieren. Dazu ist es notwendig die theoretischen Hintergründe der Methode zu verstehen, als auch im praktischen Umgang mit dem Gerät und der Datenauswertung Erfahrung zu sammeln. Dies soll anhand der oben beschriebenen Aufgabenstellung passieren.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Adsorption

Adsorption ist die Anlagerung von Stoffen an Grenzflächen, wobei die Stoffe aus flüssiger oder gasförmiger Phase (Adsorbative) an einer Festkörperoberfläche adsorbiert werden. Eine Einteilung erfolgt nach Art der Bindung von adsorbierter Substanz, dem Adsorbat, zur Oberfläche, dem Adsorbens, in Physisorption und Chemisorption. Die Physisorption, sprich physikalische Adsorption, beschreibt den Gleichgewichtsprozess bei dem das Adsorbat keine chemische Bindung zum Adsorbens ausbildet. Die Anhaftung der Teilchen an der Oberfläche ist auf wesentlich schwächere Kräfte, wie van der Waals Kräfte, zurückzuführen. Als Chemisorption, chemische Adsorption, wird der Vorgang, bei dem das Adsorbat durch chemische Bindung an der Oberfläche haftet, bezeichnet.^[5]

Das Adsorptionsverhalten kann durch Adsorptionsisothermen beschrieben werden. Dabei wird die Menge der adsorbierten Spezies als Funktion von Partialdruck (bei gasförmigen Adsorbativ) oder der Konzentration (bei flüssigem Adsorbativ) bei konstanter Temperatur dargestellt. Folgende Arten von Adsorptionsisothermen für $A + S \rightarrow AS$, wobei A das Adsorbat und S das Sorbens bezeichnen, können beschrieben werden. Ein Vergleich der verschiedenen Adsorptionsisotherme ist in Abbildung 1 dargestellt.

- Lineare Adsorptionsisotherme

Lineare Adsorptionsisotherme werden durch das *Henry* Gesetz beschrieben;

$$\theta = K_H \times C \tag{1}$$

wobei θ die Menge an adsorbierter Spezies, K_H die *Henry*-Konstante und C die Konzentration ist. Sie kann nur herangezogen werden um den Anfangsschritt der Adsorption, sprich die Adsorption bei niedriger Oberflächenbelegung (Masse Adsorbat bezogen auf Masse Adsorbens) zu beschreiben.^[6]

- Adsorptionsisotherme nach *Freundlich*

Die Tatsache, dass bei stärkerer Beladung der Oberfläche weniger Moleküle aufgenommen werden können, wird durch folgende Gleichung nach *Freundlich* erklärt;

$$\theta = K \times C^n \tag{2}$$

wobei θ die Menge an adsorbierter Spezies, K der *Freundlich*-Koeffizient, C die Konzentration und n der *Freundlich*-Exponent ist. Wegen dem in der Gleichung dargestellten exponentiellen Wachstum, gilt die Gleichung nicht bei sehr hohen Konzentrationen, da die Sättigung der Oberfläche nicht berücksichtigt wird.

- Adsorptionsisotherme nach Langmuir

Das *Langmuir*-Adsorptionsmodell nimmt an, dass alle Sorptionsplätze gleichwertig sind, keine Wechselwirkungen zwischen benachbarten Sorptionsplätzen oder adsorbierten Teilchen herrschen und nur die Adsorption von einzelnen molekularen Schichten stattfindet. Das Modell ist in der Lage die Sättigung der Oberfläche darzustellen und wird nach folgender Gleichung beschrieben;

$$\theta = \frac{K_L \times \theta_{max} \times C}{1 + K_L \times C} \quad (3)$$

wobei θ die Menge an adsorbierter Spezies, θ_{max} die maximale Menge an adsorbierter Spezies, K_L der *Langmuir*-Koeffizient und C die Konzentration ist.

Das Modell ist eine Basis für weitere Konzepte, die eine genauere Beschreibung der Adsorption zulassen, wie beispielsweise das *BET*-Modell, welches zusätzlich berücksichtigt, dass mehrere Lagen an Molekülen adsorbieren können. [5]

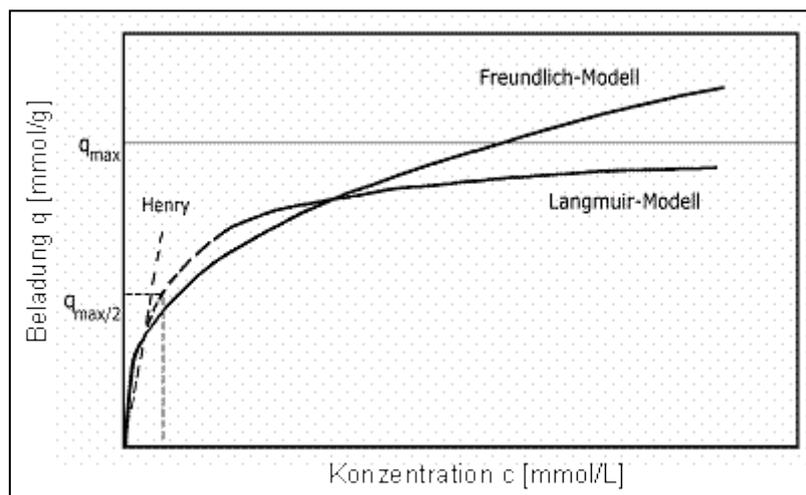


Abbildung 1 Vergleich von Adsorptionsisothermen nach *Henry*, *Freundlich* und *Langmuir*. [7]

Das Verständnis von Adsorptionsvorgängen ist für viele technische Anwendungen relevant. So wird sich der Chemisorption vor allem in der heterogenen Katalyse zur Nutzen gemacht. Typische Anwendungsgebiete der Physisorption sind beispielsweise Filter (Zeolithe, Aktivkohle, Silicagel), Trocknung (Adsorptionstrocknung) und Trennmethode (Adsorptionsschromatografie). Des Weiteren spielen Adsorptionsprozesse eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von medizinischen Instrumenten, Sensoren, sowie bei der Herstellung von Multilayer Dünnschichtfilmen. In diesen Forschungsgebieten stehen besonders Proteinadsorption und Polyelektrolytadsorption im Vordergrund.

2.1.1 Adsorption von Proteinen

Der Großteil an Proteinen ad- oder desorbiert nicht wie kleine, starre Moleküle mit einer bestimmten Ad- oder Desorptionswahrscheinlichkeit, denn durch deren komplexe Struktur und Zusammensetzung, hervorgerufen durch die Vielzahl an verschiedenen Grundbausteinen, treten bei der Proteinadsorption viele Phänomene gleichzeitig auf. Einige davon sind Aggregation, strukturelle Reorganisation, Änderungen der Oberflächenaffinität während der Adsorption und kooperative Effekte. Einflussfaktoren auf die Proteinadsorption können in externe Parameter, Proteineigenschaften und Oberflächeneigenschaften eingeteilt werden.^[8]

Zu den externen Parametern zählen pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur und Pufferzusammensetzung. Der pH-Wert bestimmt den elektrostatischen Zustand von Proteinen, der vor allem eine Rolle spielt, wenn das Adsorbens Ladungen trägt, weil dann elektrostatische Wechselwirkungen zu tragen kommen. Ist der pH-Wert während der Adsorption gleich dem isoelektrischen Punkt (IP) des Proteins, sind die negativen und positiven Ladungen ausgeglichen, was in einem gesamt gesehen neutralen Protein resultiert. Unter diesen Bedingungen wird ein Maximum an Protein adsorbiert, weil intramolekulare elektrostatische Repulsion minimiert wird und sich die Löslichkeit des Proteins vermindert, was eine Erhöhung der Packungsdichte des Proteins mit sich zieht. Aufgrund der assoziierbaren und dissoziierbaren Gruppen (Carbonsäure- und Aminofunktionalitäten) von Proteinen sind diese, wenn der pH-Wert unter dem des IPs liegt, positiv geladen. Liegt der pH-Wert über dem des IPs, sind sie negativ geladen. Durch die entgegengesetzte Ladung von Protein und Oberfläche wird die Adsorptionsgeschwindigkeit gesteigert, da die Migration vom Adsorbat hin zur Oberfläche durch die dann vorhandene elektrostatische Anziehung beschleunigt wird.^[9,10,11]

Ein weiterer externer Parameter ist die Temperatur, die sowohl einen Einfluss auf die Kinetik als auch auf den Gleichgewichtszustand vorweist. Verursacht durch steigende Adsorptionsgeschwindigkeit aufgrund von mit steigender Temperatur beschleunigter Diffusion des Adsorbens zur Oberfläche des Sorbens, erhöht sich die Masse, die an der Oberfläche adsorbiert wird. Zusätzlich werden strukturelle Umordnungen, die durch Freisetzung von auf der Oberfläche adsorbierten Wassermolekülen oder Elektrolyten eine Zunahme der Entropie verursachen, durch höhere Temperaturen begünstigt.^[12,13]

Die Ionenstärke (Maß für Konzentration an Ionen in Lösung) der Lösung aus der das Protein adsorbiert wird, ist ein nicht zu vernachlässigender externer Parameter. Sie beeinflusst die Wechselwirkung zwischen einzelnen Proteinen, Proteinen und der Oberfläche und intramolekulare Interaktionen. Bei Substraten mit entgegengesetzter Ladung nimmt die Proteinadsorption mit der Ionenstärke ab, weil die elektrostatische Affinität zwischen Adsorbens und Adsorbat abnimmt, wohingegen bei gleich geladenen Substraten der

gegenteilige Effekt eintritt. Umgebende Ionen können das elektrostatische Potential von Proteinen abschirmen und reduzieren somit laterale, elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einzelnen adsorbierten Teilchen, wodurch die Packungsdichte erhöht wird und die Wahrscheinlichkeit von Aggregation in der Lösung steigt. Das Ausfällen von Proteinen durch hohe Salzkonzentrationen, und damit verbundener Adsorption von Wasser oder Salzionen, wird Aussalzen genannt, und wird im Bereich der Biotechnologie häufig zur Proteinisolation genutzt.^[14]

Auch die Konzentration der Proteinlösung, aus der adsorbiert wird, hat Einfluss auf das Adsorptionsverhalten. Bei hohen Konzentrationen ist die Oberfläche schneller belegt als bei niedrigen, sodass die Zeit für *Spreading* (Ausbreitung) kürzer ist. Der *Footprint* (Teil des Proteins, der in Kontakt mit Oberfläche ist) ist dadurch generell kleiner, wodurch eine höhere Oberflächenkonzentration möglich ist.

Proteine besitzen eine außergewöhnliche strukturelle und funktionelle Komplexität, was sich auf ihre Eigenschaften auswirkt. Sie können anhand ihrer Größe und strukturellen Stabilität in *harte* und *weiche* Proteine unterteilt werden, wobei *harte* Proteine interne Stabilität zeigen und eher klein und rigide sind, hingegen *weiche* Proteine zu strukturellen Veränderungen tendieren.^[12,15] Strukturelle Änderungen sind meist mit einem Zuwachs an Entropie verbunden, welcher als Treibkraft für die Adsorption fungiert. Die während des Adsorptionsvorgangs wichtige Diffusionsgeschwindigkeit wird durch die Größe der Proteine beeinflusst. Kleine Teilchen diffundieren und adsorbieren schneller als große, allerdings wechselwirken sie nicht so stark mit Oberflächen, weil sie kleinere Kontaktflächen haben.^[16]

Oberflächeneigenschaften wie Oberflächenenergie, Polarität, Ladung und Morphologie tragen auch einen Teil zum Adsorptionsprozess bei, und können durch Polymerbeschichtungen (Dip-/Spin-Coating)^[17], Self-Assembled-Monolayers oder Langmuir-Blodgett Filme mit passender Funktionalität gesteuert werden. Die Tendenz von Proteinen eher auf apolaren als auf polaren Oberflächen zu adsorbieren, liegt der Tatsache zugrunde, dass solche Oberflächen Proteine destabilisieren und Konformationsänderungen hervorrufen. Diese strukturellen Änderungen führen zu starken inter-Protein und Protein-Oberflächen Wechselwirkungen. Werden nicht-polare, der wässrigen Lösung ausgesetzte Bereiche von Adsorbens und Sorbens dehydriert, sinkt die *Gibb'sche* freie Energie, sprich die Entropie steigt durch Freiwerden von Wassermolekülen. Dazu muss sich bei den meisten Proteinen die Konformation stark ändern, sodass die hydrophoben Teile mit der hydrophoben Oberfläche interagieren können. Durch komplexe Strukturen können Affinitäten in verschiedene Richtungen ausgebildet werden. Je nach Hydrophobizität der Oberfläche richtet das Protein dazu passende Regionen hin zur Oberfläche, was eine Adsorption bei gleich geladenen Substraten ermöglicht.

Im Folgenden wird auf die Ausrichtung von Proteinen an Grenzflächen eingegangen. Die bevorzugte Orientierung von adsorbierten Proteinen wird durch das Minimum an freier Energie bestimmt, welches sich aus attraktiven Coulomb Kräften, van der Waals Wechselwirkungen, Wasserstoff-Brücken und Entropiegewinn (hervorgerufen durch Freilassen von Lösungsmittelmolekülen oder Gegenionen) zusammensetzt. Ist die Struktur eines Proteins stabil, so kann die Orientierung an der Oberfläche, ausgehend von ellipsoidisch geformten Teilchen, je nachdem ob es mit der langen oder der kurzen Achse an die Oberfläche adsorbiert, als *side-on* oder *end-on* benannt werden (siehe Abbildung 2). In der *end-on* Orientierung ist die Sättigung und Schichtdicke höher als in der *side-on*.^[8]

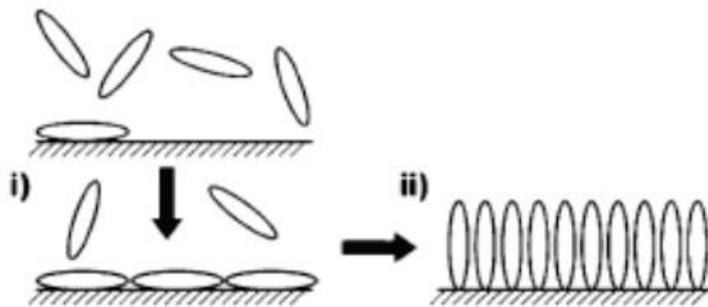


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Adsorption von ellipsoidisch geformten Proteinen an einer Oberfläche; i) *side-on* und ii) *end-on* Orientierung.^[18]

Bei kleinen Mengen Adsorbat ist die Abstoßung (beispielsweise durch aufeinander gerichtete, gleich geladene Gruppen) zwischen benachbarten Teilchen klein, weil der Abstand zwischen ihnen relativ groß ist. Dieser Abstand wird mit zunehmender Oberflächenbelegung kleiner und die anfängliche Orientierung wird ungünstig, sodass eine Änderung erfolgt, die repulsive Kräfte vermindert. Konformationsänderungen von Proteinen finden aufgrund des Unterschieds im freien Energieminimum von der Konformation in Lösung und der nach dem Kontakt mit dem Adsorbens statt. Die Kontaktfläche zwischen Protein und Oberfläche bringt Entropiezuwachs mit sich und daher maximieren Proteine ihren *Footprint*.^[8]

Proteine können als dicht oder nicht-dicht gepackte Monolayer und Multilayer auftreten. Monolayer entstehen bei geringen Protein-Protein Wechselwirkungen. Die Packungsdichte ist von den elektrostatischen Kräften zwischen den adsorbierten Molekülen abhängig und ist klein, wenn diese repulsiv sind, während bei ungeladenen Proteinen (pH=IP) oder hoher Ionenstärke (Abschirmung von gleich geladenen Gruppen) dicht gepackte Schichten aufgebaut werden.^[19,20,21]

Wechselwirkungen zwischen den adsorbierten Molekülen werden als laterale Wechselwirkungen bezeichnet^[9,10,11] und kommen ab einer gewissen Oberflächenbelegung zu tragen. Beispielsweise kann die Desorptionsrate aufgrund repulsiver lateraler Kräfte bei

sehr hohen Oberflächenbelegungen steigen.^[22] Das Gegenteil dieser gesteigerten Desorption wird als kooperativer Effekt bezeichnet, wobei die Proteinadsorption durch bereits adsorbierte Spezies erhöht wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein sich in der Nähe der Oberfläche befindliches Teilchen adsorbiert wird, ist höher wenn prä-adsorbierte Partikel vorhanden sind. Dies basiert auf einem Lenk-Mechanismus, bei dem Proteine gleichzeitig vertikal von der Oberfläche angezogen und lateral (horizontal) von anderen Proteinen abgestoßen werden (siehe Abbildung 3).

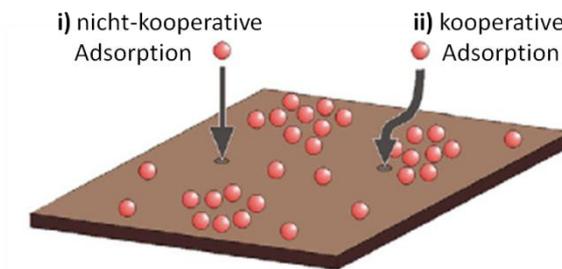


Abbildung 3 Schematischer Vergleich von kooperativem und nicht-kooperativem Effekt während der Adsorption von Proteinen an Oberflächen.^[8]

Der Effekt des *Overshooting* bezeichnet ein globales Maximum in der Adsorptionsisotherme bevor Sättigung der Oberfläche, also ein Gleichgewicht von Ad- und Desorption, eintritt. Dieses Maximum ist auf eine zeitverzögerte Desorption aufgrund von Konformationsänderungen zurückzuführen.

Aggregation von Proteinen kann in Lösung passieren oder an der Oberfläche induziert werden, und beeinflusst die Kinetik der Adsorption und die Struktur der Schicht.^[23]

2.1.2 Adsorption von Polyelektrolyten

Polyelektrolyte sind Polymere, die viele dissoziierbare Gruppen tragen. Je nach Art der dissoziierbaren Gruppe werden sie in Polykationen/Polybasen und Polyanionen/Polysäuren eingeteilt. Ist die Ladung des Polyelektrolyten bei pH-Wert Änderungen stabil, so spricht man von harten Polyelektrolyten, ist dies nicht der Fall von weichen. Polysaccharide, Ligninsulfonate, Polypeptide, DNA, Poly(Ethylenimin), oder Poly(Vinylamin) sind nur einige Beispiele für polyelektrolytische Substanzen.^[24]

Um die Einflussparameter auf die Adsorption von Polyelektrolyten zu verstehen, ist es notwendig, das Verhalten von diesen in Lösung zu kennen. In verdünnter Lösung verhalten sich Polyelektrolyte mit geringem Anteil an geladenen Monomeren wie statistische Knäuel mit einem Kettenendenabstand R von $R = N^{1/2} \cdot a$, wobei N die Anzahl der Monomere und a die Größe des Monomers ist. In diesem Fall spielen elektrostatische Wechselwirkungen

zwischen den einzelnen geladenen Gruppen keine Rolle. Ist die Ladung des Polyelektrolyten höher, tritt zwischen den geladenen Gruppen elektrostatische Repulsion auf und das Molekül wird gestreckt. Der Kettenendenabstand R kann nun durch folgende Gleichung beschrieben werden.

$$R \sim N \cdot a \cdot \left(\frac{f^2}{a}\right)^{1/3}$$

(4)

wobei f die Fraktion der geladenen Monomere an der gesamten Monomeranzahl ist (N und a wie oben definiert). Durch Zugabe von Elektrolyt kann eine Knäuelung des gestreckten Moleküls induziert werden, da intramolekulare Repulsion verkleinert wird. Das Molekül kann als lang gezogene Kette bestehend aus statistisch verteilten Knäueln mit bestimmter Größe angesehen werden. Tritt es mit Salzionen in Kontakt, verbiegt und verkürzt sich ein Teil der Kette, die einzelnen Knäuel bleiben jedoch bestehen. Der Abstand über den das Molekül gestreckt bleibt wird Persistenzlänge genannt und nimmt mit höherer Salzkonzentration ab.

Die Adsorption von Polyelektrolyten wird durch verschiedene Faktoren, wie Konzentration des Polyelektrolyten, Beschaffenheit des Lösungsmittels, pH-Wert oder die Ionenstärke des Adsorbativs beeinflusst. Eine Erhöhung der Konzentration hat eine Beschleunigung der Adsorption zur Folge und steigert die Menge, die adsorbiert wird, was auf Konformationsänderungen zurückzuführen ist. Hauptsächliche Treibkräfte für die Polyelektrolytadsorption sind die Ausbildung von Wasserstoff-Brücken zwischen Adsorbat und Adsorbens und elektrostatische Wechselwirkungen. Die geladene Oberfläche erzeugt ein elektrisches Feld, das durch Abschirmung von Gegenionen oder Salzionen mit zunehmender Distanz davon abklingt. Bei sehr geringer Ionenstärke wird die Polyelektrolyt-Kette vom elektrischen Feld der Oberfläche (wenn dieses entgegengesetzte Ladungen aufweist) angezogen, wohingegen bei sehr hoher Ionenstärke sich der Polyelektrolyt wie ein neutrales Polymer verhält und nur adsorbiert, wenn starke Anziehungskräfte wirken. Hohe Ionenstärke und zugleich niedrige Ladungsdichte (bei schwachen Polyelektrolyten durch pH-Wert beeinflusst) begünstigen die Adsorption durch Agglomeration beziehungsweise schlechte Löslichkeit des Polyelektrolyten. Hohe Elektrolytkonzentrationen reduzieren jedoch die Wechselwirkung zwischen gegensätzlich geladenem Polymer und Oberfläche durch eine Abschirmung der Ladung.

Ein adsorbiertes Polyelektrolyt-Molekül kann in drei Bereiche unterteilt werden; *Trains*, *Loops* und *Tails*. Als *Tails* werden die Kettenenden bezeichnet, die hin zum Lösungsmittel ausgerichtet sind. *Trains* sind die Teile der Kette, die an der Oberfläche anhaften. *Loops* verbinden die einzelnen *Trains*, sind aber nicht in Berührung mit dem Sorbens und entscheiden über die Dicke der adsorbierten Schicht. Zudem wird die Schichtdicke von der Beschaffenheit des Sorbens und den Wechselwirkungen, die es zum Polyelektrolyten

ausbilden kann bestimmt. Die Ladungsdichte und Rauigkeit der Oberfläche sind wichtige Faktoren. Starke Rauigkeit bringt eine größere Oberfläche mit sich und dadurch befindet sich auch eine höhere Anzahl an Ladungen an der Oberfläche, was wiederum elektrostatische Wechselwirkungen steigert.^[25]

2.2 Oberflächensensitive Charakterisierungsmethoden

Die bereits beschriebenen Adsorptionsphänomene können mittels verschiedenster Methoden charakterisiert werden, wie MP-SPRS (Oberflächenkonzentration adsorbierter Spezies, Schichtdicke, Brechungsindex), Quarzkristallmikrowaage mit Dissipation (QCM-D) (Oberflächenkonzentration adsorbierter Spezies, Schichtdicke), AFM (3D-Struktur adsorbierter Spezies), Infrarot-Reflexions-Adsorptions-Spektroskopie (IRRAS) (Konformationsänderungen adsorbierter Spezies), Ellipsometrie (Schichtdicke oder Brechungsindex), XPS (Elementanalyse der Oberfläche) und Neutronen-Reflexion (Schichtdicke). Von den erwähnten Methoden bieten MP-SPRS und QCM-D den großen Vorteil von Echt-Zeit Adsorptionsstudien, die es erlauben zusätzlich Adsorptionskinetik zu bestimmen.^[26]

2.2.1 Physikalische Grundlagen

Im Nachfolgenden werden einige physikalische Grundlagen, die für die folgenden Kapitel vorauszusetzen sind, behandelt.^[27,28,29]

2.2.1.1 Reflexion und Brechung

Reflexion und Brechung können auftreten, wenn eine elektromagnetische Welle beziehungsweise ein Strahl (rechnerisches Hilfsmittel) auf eine ideal glatte Grenzfläche zweier Medien trifft. Generell treten beide Vorgänge gleichzeitig auf (siehe Abbildung 4). Ein Teil des einfallenden Strahls wird an der Fläche reflektiert und bewegt sich so weiter, als würde von der Fläche abprallen. Der andere Teil des Strahls wird gebrochen. Als Brechung wird der Durchgang von Licht durch eine Oberfläche bezeichnet. Trifft der Lichtstrahl nicht senkrecht auf die Grenzfläche, wird seine Richtung durch die Brechung verändert. Der Strahl knickt ab und bewegt sich innerhalb des neuen Mediums geradlinig ohne Veränderung von Phase und Frequenz weiter. Bei nicht ideal glatten Oberflächen tritt anstatt der regulären die diffuse Reflexion auf. Es kommt zur Streuung des einfallenden Strahls in viele Richtungen, wenn die Erhebungen und Vertiefungen der Oberfläche in der Größenordnung der Wellenlänge sind.

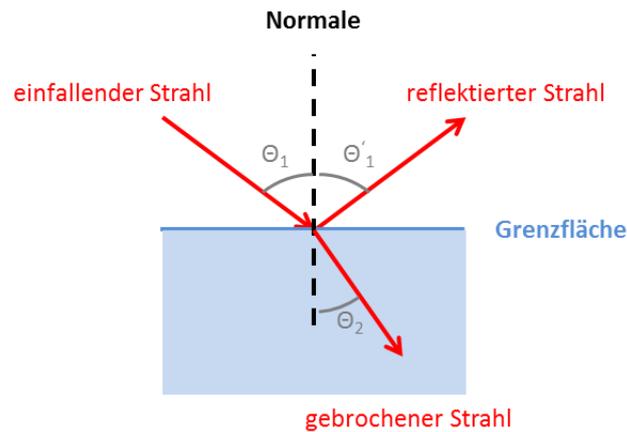


Abbildung 4 Schematische Darstellung von Reflexion und Brechung an einer Grenzfläche.

Aus Experimenten lassen sich zwei Gesetze, die für die Reflexion und Brechung gelten, herleiten. Das Reflexionsgesetz, das besagt, dass der reflektierte Strahl in der Einfallsebene (Ebene, die den einfallende Strahl und die Normale enthält) liegt und der Reflexionswinkel θ'_1 gleich dem Einfallswinkel θ_1 ist.

$$\theta'_1 = \theta_1 \tag{5}$$

Das Brechungsgesetz (*Snelliussches Gesetz*), das besagt, dass der gebrochene Strahl in der Einfallsebene liegt und der Brechungswinkel θ_2 wie folgt mit dem Einfallswinkel θ_1 zusammenhängt;

$$n_2 \sin(\theta_2) = n_1 \sin(\theta_1) \tag{6}$$

wobei n_1 und n_2 die Brechungsindices der beiden Medien bezeichnen. Der Brechungsindex wird über das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit im Vakuum zur Lichtgeschwindigkeit im betreffenden Medium beschrieben.

Der Brechungswinkel lässt sich über das Verhältnis der Brechungsindices mit dem Einfallswinkel vergleichen. Hierbei können drei Fälle, die in Abbildung 5 gezeigt werden, auftreten.

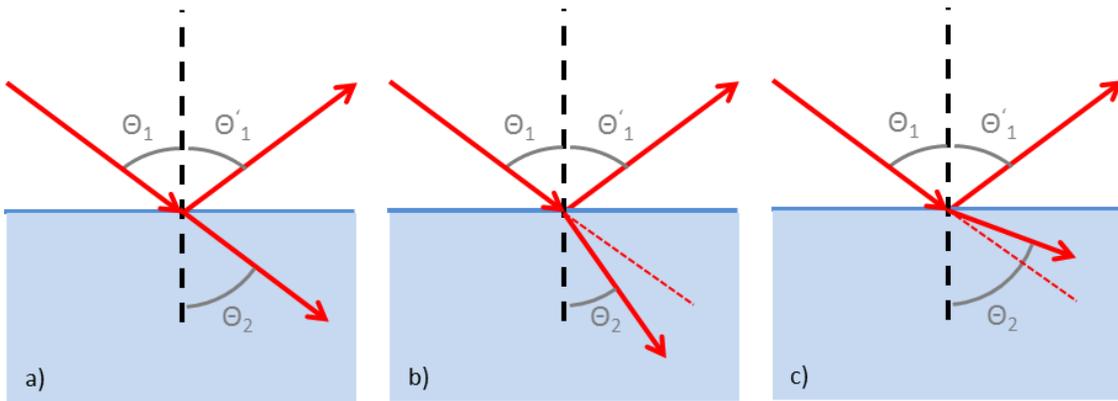


Abbildung 5 Darstellung der Brechung in Abhängigkeit der Brechungsindices; a) $n_1 = n_2$, b) $n_1 < n_2$, c) $n_1 > n_2$.

- a) $n_1 = n_2$: Dann ist $\theta_1 = \theta_2$. Der einfallende Strahl knickt durch die Brechung nicht ab.
- b) $n_1 < n_2$: Dann ist $\theta_1 > \theta_2$. Der gebrochene Strahl knickt von der Richtung des einfallenden Strahls weg, zur Normalen hin ab.
- c) $n_1 > n_2$: Dann ist $\theta_1 < \theta_2$. Der gebrochene Strahl knickt von der Richtung des einfallenden Strahls und von der Normalen weg.

Zur Beschreibung der Reflexion und Brechung in absorbierenden Medien wird der komplexe Brechungsindex \hat{n} eingeführt;

$$\hat{n} = n (1 - ik)$$

(7)

wobei k der Absorptionskoeffizient und i die Wurzel aus -1 ist ($n = \text{Realteil}$, $k = \text{Imaginärteil}$ des Brechungsindex). Es gelten dieselben Gesetzmäßigkeiten, jedoch muss anstatt des reellen Brechungsindex der entsprechende komplexe eingesetzt werden.

Die Aufteilung der Intensität des einfallendes Lichtes auf gebrochenen und reflektierten Strahl wird durch die *Fresnell'schen* Formeln beschrieben. Diese ermöglichen die Berechnung der Amplituden von gebrochener und reflektierter Welle bei bekannter Amplitude und Einfallswinkel der einfallenden Welle und bei vorgegebenen Brechungsindices beider Medien.

Die Aufteilung der Energie der auf eine ideal glatte Oberfläche treffenden Welle erfolgt in einen reflektierten, einen transmittierten und einen absorbierten Teil. Diese Aufteilung kann mittels *Beer'schem* Gesetz dargestellt werden, welches den Reflexions- und den Absorptionsgrad beschreibt. Der Reflexionsgrad ist das Verhältnis der von einem Körper reflektierten Intensität zu der auf ihn auftreffenden Intensität. Der Absorptionsgrad ist das Verhältnis der von einem Körper absorbierten Intensität zu der auf ihn auftreffenden Intensität.

2.2.1.2 Dispersion

Der Brechungsindex n von Licht in einem Medium hängt von der Wellenlänge des Lichts ab. Je nach Wellenlänge wird das Licht unter einem anderem Winkel gebrochen. Dieses Phänomen wird chromatische Dispersion genannt. Im sichtbaren Spektralbereich nimmt der Brechungsindex für die meisten Medien mit zunehmender Wellenlänge ab. Solches Verhalten wird als normale Dispersion bezeichnet. Zur mathematischen Beschreibung der normalen Dispersion von elektromagnetischen Wellen kann die *Cauchy-Gleichung* (vereinfachte Form, die für die meisten Materialien gültig ist) herangezogen werden;

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad (8)$$

wobei A , B und C Anpassungsparameter für das jeweilige Material sind und λ die Wellenlänge des Lichts ist. Zusätzlich gibt es eine *Cauchy-Gleichung*, die die Anhängigkeit des Absorptionskoeffizienten k von der Wellenlänge beschreibt;

$$k(\lambda) = \alpha e^{12400\beta\left(\frac{1}{\lambda} - \frac{1}{\gamma}\right)} \quad (9)$$

wobei α , β und γ die jeweiligen Anpassungsparameter des Materials sind.

In Frequenzbereichen starker Absorption einer elektromagnetischen Welle tritt das Phänomen der anomalen Dispersion auf, wobei der Brechungsindex mit steigender Wellenlänge zunimmt. Der Zusammenhang zwischen Brechungsindex und Absorption kann durch die *Kramers-Kronig-Beziehung* beschrieben werden.^[30] Das Dispersionsverhalten einer Substanz weist im gesamten elektromagnetischen Spektrum normale und anomale Bereiche auf (siehe Abbildung 6).

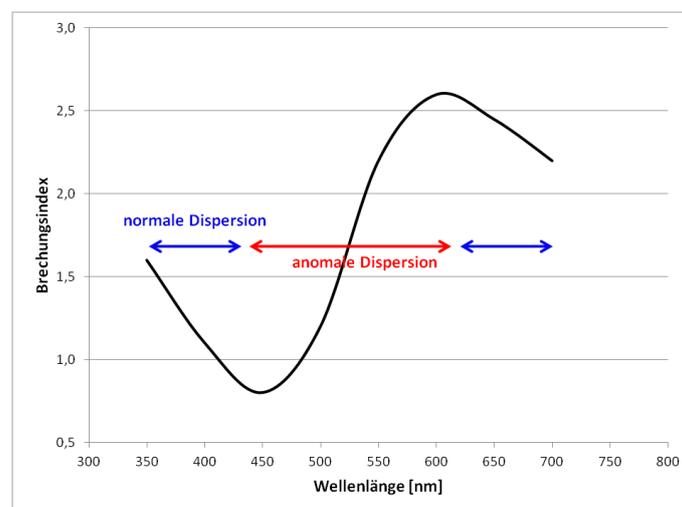


Abbildung 6 Darstellung des Brechungsindexverlaufs bei Veränderung der Wellenlänge für normale und anomale Dispersion.

2.2.1.3 Totalreflexion

Die Brechung eines Strahls ist beim Übergang von einem optisch dichteren Medium (mit höherem Brechungsindex) in ein optisch dünneres Medium bei einem Einfallswinkel der kleiner als der Grenzwinkel der Totalreflexion θ_{krit} nicht möglich. Aus Umformung des Brechungsgesetzes kann der Grenzwinkel berechnet werden. Für den Brechungswinkel θ_2 wird 90° eingesetzt, sodass der Term der Brechung wegfällt.

$$\theta_{krit} = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (10)$$

Der Sinus eines Winkels kann nicht größer als 1 werden, daher muss n_2 in dieser Gleichung immer kleiner als n_1 sein. Dies zieht die Einschränkung mit sich, dass Totalreflexion nur auftritt, wenn das Licht von einem Medium mit höherem Brechungsindex in ein Medium mit niedrigerem übergeht.

2.2.2 Multi-Parametric Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (MP-SPRS)

In den 1960ern wurde erstmals die optische Anregung von Oberflächenplasmonen durch abgeschwächte Totalreflexion von *Kretschmann* und *Otto* gezeigt.^[31,32] Die beiden möglichen Konfigurationen werden in Abbildung 7 gezeigt. In der Kretschmann-Konfiguration, der heutzutage am meisten eingesetzten Geometrie^[33], werden die Oberflächenplasmonen in einem dünnen Metallfilm mit einem semi-unendlichen dielektrischen Medium auf gegenüberliegender Seite generiert. In der *Otto*-Konfiguration werden die Plasmonen über eine dünne Schicht eines dielektrischen Materials generiert und das evaneszente Feld des einfallenden Lichts wird von einem semi-infiniten Metallfilm absorbiert. Seither wurde das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz intensiv untersucht.^[34]

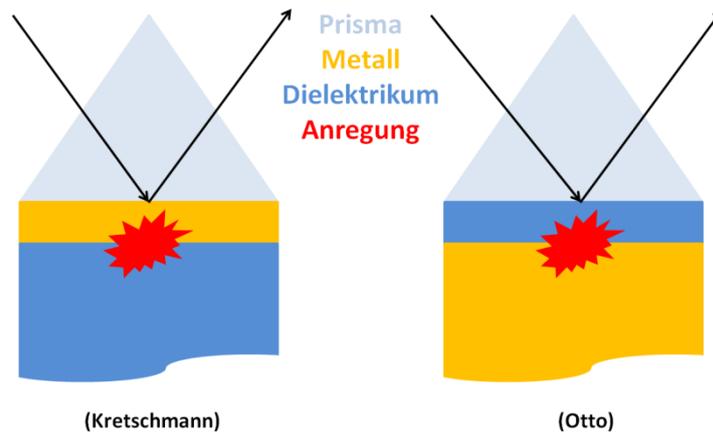


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Konfigurationen zur optischen Anregung von Oberflächenplasmonen nach Kretschmann und Otto.

Oberflächenplasmonen sind Quasipartikel/Wellen, die aus der kollektiven Oszillation von freiem Elektronengas eines Metalls resultieren. Sie können an der Grenzfläche zwischen einem Metall und einem dielektrischen Material durch Photonen eines polarisierten Lichtstrahls angeregt werden. Trifft ein Lichtstrahl unter Bedingungen der totalen Reflexion auf ein Medium, so ändert sich nicht schlagartig seine Ausbreitungsrichtung sondern es entsteht eine stehende Welle, die exponentiell mit dem Abstand zur Oberfläche abklingt, eine evaneszente Welle. Diese evaneszente Welle kann unter bestimmten Bedingungen in die Oberflächenplasmonenwelle einkoppeln und diese anregen. Die Oberflächenplasmonenwelle ist eine p-polarisierte Welle, was bedeutet, dass die elektrische Komponente in der Einfallsebene (von Einfallsvektor und Flächennormale aufgespannte Ebene) schwingt. Daher muss auch das anregende Licht p-polarisiert sein. Dieser Vorgang resultiert in einer verringerten Intensität des reflektierten Lichts.^[35]

Die Anregung der Oberflächenplasmonen bei *Kretschmann*-Konfiguration erfolgt wenn folgende Resonanzbedingung erfüllt ist;

$$\frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_0} \sin(\theta_c) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad (11)$$

wobei ω die Kreisfrequenz von Licht im Vakuum, c die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante des Prismas, ϵ_1 die Dielektrizitätskonstante des Metalls, ϵ_2 die Dielektrizitätskonstante des umgebenden Mediums und θ_c der Winkel des einfallenden Lichts ist. Die Resonanzbedingung besagt, dass eine Anregung nur dann geschieht, wenn der Propagationsvektor der evaneszenten Welle entstehend durch den einfallenden Lichtstrahl (linker Term) gleich dem Propagationsvektor der Oberflächenplasmonenwelle (rechter Term)

ist. Aus der Resonanzbedingung lässt sich ableiten, dass die Anregung bei einem bestimmten Einfallswinkel, dem Resonanzwinkel erfolgt. Zudem ist die Oberflächenplasmonenresonanz sensitiv auf Änderungen der Dielektrizitätskonstante (beziehungsweise des Brechungsindex) des Metalls und seiner chemischen Umgebung. Die Dielektrizitätskonstante ϵ kann über die relative Permittivität μ mit dem Brechungsindex n in Bezug gebracht werden.

$$n = \sqrt{\epsilon \mu} \tag{12}$$

Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (Oberflächenplasmonenresonanz Spektroskopie) ist eine optische Methode, die es, durch Ausnutzung des eben erwähnten Phänomens, möglich macht *in situ* chemische und physikalische Vorgänge an Metalloberflächen zu beobachten.^[31] Als multi-parametrische Instrumente werden Geräte bezeichnet, die im Gegensatz zu einfach-parametrischen, über einen weiten Winkelbereich und mit mehreren Wellenlängen messen können.

Die *Kretschmann*-Konfiguration lässt den in Abbildung 8 dargestellten Aufbau zu. Eine Laserquelle, die ihre Position und somit den Einfallswinkel variieren kann, strahlt Licht auf ein Prisma, das das Licht auf die Oberfläche leitet, an der die Anregung der Plasmonen erfolgt und ein Teil des Lichtes reflektiert wird. Das reflektierte Licht wird von einem Photodetektor detektiert. Auf dem Prisma befindet sich ein Elastomer, das ein Anpressen des Sensor-Slides ohne Luftpfeinschlüsse ermöglicht. Der Sensor-Slide besteht aus einem mit 2 nm Chrom (Haftvermittler) und Gold beschichtetem Glassubstrat. Im Falle des Goldes wurde eine Schichtdicke von 50 nm gewählt, weil diese die optimalen Eigenschaften für die Plasmonenresonanz mit sich bringt. Es ist auch möglich andere Metalle, wie Kupfer, Silber oder Aluminium einzusetzen. Gold bietet jedoch den Vorteil von sehr stabilen optischen Konstanten.^[36] Zusätzlich kann der Sensor mit verschiedensten Substraten beschichtet werden, beispielsweise durch Spin-Coating. Die Glasseite ist dem Elastomer zugewendet. Prisma, Elastomer und Glas besitzen den gleichen Brechungsindex. Auf der Metallseite des Sensor-Slides befindet sich eine Flusszelle, durch die Flüssigkeiten oder Gase gepumpt werden können.

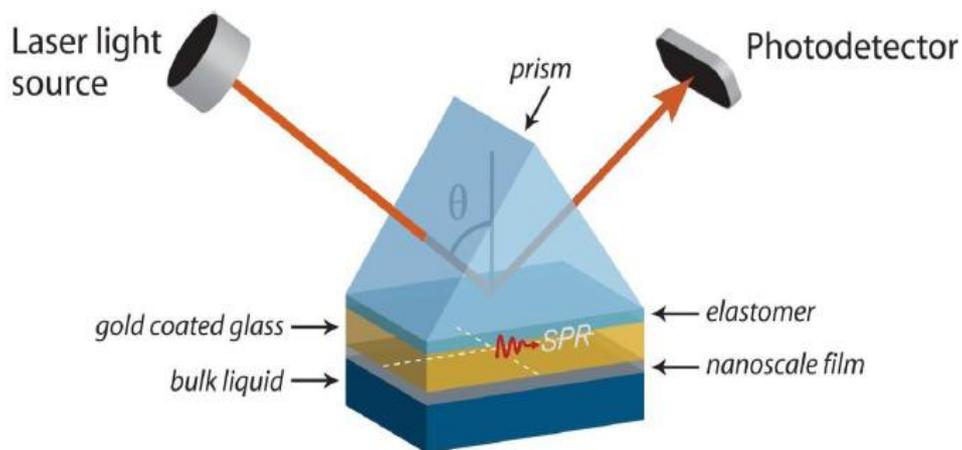


Abbildung 8 Aufbau eines MP-SPR-Spektrometers nach Kretschmann-Konfiguration.^[37]

Gemessen wird die Intensität des reflektierten Lichtes als Funktion des Einfallswinkels. Diese Auftragung wird als SPR-Kurve bezeichnet. Am Minimum dieser Kurve tritt die Plasmonenresonanz auf. Der Winkel am Minimum der SPR-Kurve ist der Resonanzwinkel. Dieser verschiebt sich bei Veränderung der chemischen Umgebung des Metalls (siehe Abbildung 9).

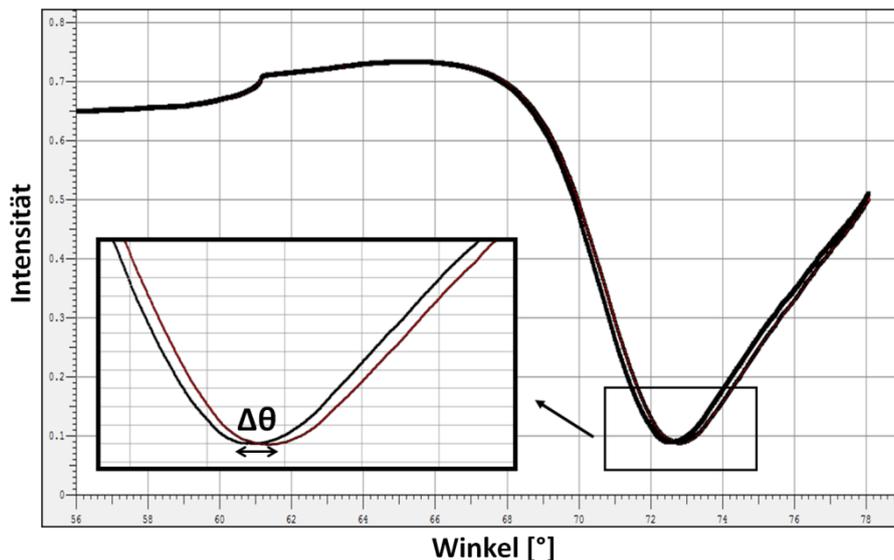


Abbildung 9 SPR-Kurve und Verschiebung des Resonanzwinkels $\Delta\theta$ bei veränderter chemischer Umgebung.

Die Kalibration des Instruments wird mit Lösungen mit unterschiedlichen Brechungsindices durchgeführt. Nach Vermessung der Lösungen wird eine Kalibrationskurve erstellt. Dabei wird das SPR-Signal (Resonanzwinkel) als Funktion des Brechungsindex dargestellt. Die Steigung der erhaltenen Kurve kann als Sensitivitätsfaktor bezeichnet werden. Die Steigung hängt vom Metall, der Schichtdicke des Metalls, der Wellenlänge und anderen

Systemparametern ab. Die Kalibration sollte regelmäßig durchgeführt werden um die Intaktheit des Instruments zu gewährleisten. ^[38]

Der Aufbau eines Adsorptionsexperiments ist in Abbildung 10 beschrieben. Das Sensogramm ist die Auftragung des Resonanzwinkels gegen die Zeit. Am Anfang eines Adsorptionsexperimentes wird das System equilibriert. Das heißt, die Flusszelle wird mit dem Lösungsmittel, aus dem später adsorbiert wird, solange gespült bis sich ein konstanter Resonanzwinkel einstellt ($\pm 0,005^\circ$ auf 10 min). Danach kann das Adsorbativ injiziert werden und durch die Änderung der dielektrischen Konstante, ändert sich der Resonanzwinkel. Hat sich nach gewisser Zeit eine Sättigung eingestellt, wird mit dem gleichen Lösungsmittel wie bei der Equilibrierung gespült, um lose oder nur leicht adsorbierte Teilchen zu entfernen. Der Vorgang wird gestoppt, sobald sich der Drift des Resonanzwinkels ($< 0,005 / 10$ min) eingestellt hat. Aus dem Sensogramm kann die Verschiebung des Resonanzwinkels $\Delta\theta$ abgelesen werden.

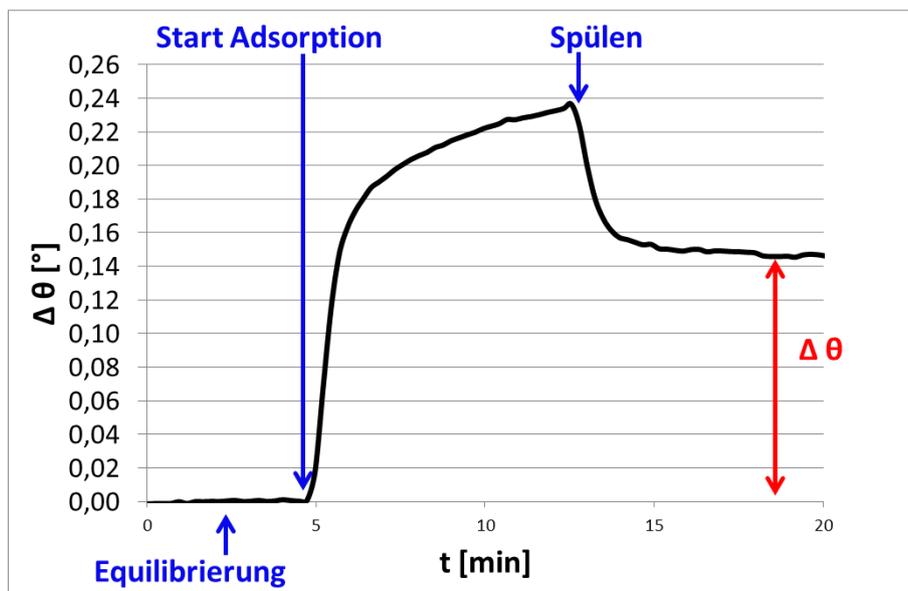


Abbildung 10 Schematischer Aufbau eines Adsorptionsexperimentes – Sensogramm.

Die Auswertung eines solchen Adsorptionsexperiments erfolgt mittels Multilayer Modelling. ^[39] Hierbei wird ein Ausdruck für die Verknüpfung von Reflexion mit der Wellenlänge und dem Einfallswinkel benötigt. Als Parameter fungieren die Schichtdicken d , Brechungsindices n und Extinktionskoeffizienten k (Imaginärteile des Brechungsindex) jeder bei der Messung vorhandenen Schicht. Es wird die sogenannte *Jones* Rechnung eingesetzt, bei der optische Elemente, also Schichten und Grenzflächen, als 2×2 Streu-Matrizes und polarisierte Lichtstrahlen als 2×1 Vektoren dargestellt werden. Der Reflexionsgrad

(Quotient aus reflektierter und einfallender Leistung) des Multilayer-Systems kann durch folgende Matrix S berechnet werden.

$$S = \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{21} & S_{22} \end{pmatrix} = \prod_{i=1}^{m-2} (I_i L_{i+1}) I_{m-1} \quad (13)$$

Hierbei beschreibt m die Anzahl an Medien, wobei das erste Medium und das m -te Medium semi-infinit sein müssen und nicht absorbieren dürfen ($k = 0$). I_i ist die Streumatrix für die Reflexion an der Grenzfläche des Medium i und Medium $i + 1$. L_{i+1} ist die Jones Matrix für Absorption in der Schicht $i + 1$.

Die Matrix I_i basiert auf den *Fresnell'schen* Reflexions- und Transmissionskoeffizienten r_i und t_i . Diese geben das Verhältnis der Amplituden der reflektierten bzw. transmittierten Welle zur anfänglichen Welle an. Entscheidend dafür sind die optische Dichte der Medien, sowie Polarisation und Einfallswinkel der ursprünglichen Welle.

$$I_i = \begin{pmatrix} 1 \\ \frac{1}{t_i} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & r_i \\ r_i & 1 \end{pmatrix} \quad (14)$$

Koeffizienten für p-polarisiertes Licht;

$$r_i = \frac{\hat{n}_{i+1} c_i - \hat{n}_i c_{i+1}}{\hat{n}_{i+1} c_i + \hat{n}_i c_{i+1}} \quad (15)$$

$$t_i = \frac{2 \hat{n}_i c_i}{\hat{n}_{i+1} c_i + \hat{n}_i c_{i+1}} \quad (16)$$

Wobei \hat{n} den Brechungsindex zusammengesetzt aus Real- und Imaginärteil beschreibt ($\hat{n} = n + ik$) und c_i dem Kosinus des Einfallswinkels $\cos(\theta_i)$ entspricht.

Die Matrix L_i basiert auf dem *Beer'schen* Gesetz und ist wie folgt definiert;

$$L_i = \begin{pmatrix} e^{-i\beta_i} & 0 \\ 0 & e^{i\beta_i} \end{pmatrix} \quad (17)$$

mit

$$\beta_i = \frac{2\pi}{\lambda} d_i \hat{n}_i c_i \quad (18)$$

wobei d_i der Schichtdicke entspricht.

Die Reflexion R kann nun wie folgt berechnet werden;

$$R = |S_{21}/S_{11}|^2 \quad (19)$$

Durch eben erklärten Formalismus kann für viele Typen an Multilayer-Systemen präzises Modelling der SPR-Kurve erfolgen.^[40] Es wird eine SPR-Kurve aus dem equilibrierten Bereich der Messung vor der Adsorption entnommen und mittels Multilayer-Modell gefittet. Dieser Fit enthält alle Schichtdicken und Brechungsindices der vorliegenden Schichten. Nun muss eine Kurve, die nach der Adsorption gemessen wurde, gefittet werden. Dazu werden die Parameter der ersten Kurve verwendet und eine zusätzliche Schicht, die der adsorbierten Schicht entspricht, im Modell eingefügt. Anhand des Modellings werden zusammengehörige Paare an Schichtdicken und Brechungsindices, die sogenannten Kontinuumslösungen, für die adsorbierte Schicht erhalten. Durch Modelling von nur einer SPR-Kurve kann keine exakte Aussage über Schichtdicke und adsorbierte Schicht getroffen werden.^[40] Um dieses Problem zu lösen, gibt es zwei Möglichkeiten: die Messung des Adsorptionsexperimentes in zwei verschiedenen Medien oder mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen.^[41]

Die Messung in zwei Medien erfolgt in den Schritten; Equilibrierung in Medium 1, Equilibrierung in Medium 2, Adsorption, Spülung mit Medium 1, Spülung mit Medium 2. Das Modelling der SPR-Kurven wird für beide Medien durchgeführt. Durch diese Vorgehensweise erhält man Kontinuumslösungen für beide Medien. Diese können in einem Diagramm aufgetragen (Schichtdicke gegen Brechungsindex) und deren Schnittpunkt ermittelt werden. Die Schichtdicke und der Brechungsindex an diesem Schnittpunkt sind die exakten Werte für die adsorbierte Schicht. Die *2-Medien-Methode* kann nur angewandt werden, für stabile, impermeable Filme, deren Struktur nicht lösungsmittelabhängig ist. Des Weiteren müssen sich die zwei Medien in ihren Dielektrizitätskonstanten unterscheiden. Ist der Unterschied zu klein, fällt die Ermittlung des Schnittpunktes der zwei Schichtdicke-Brechungsindex Kurven schwer, da sie zu ähnlich sind.^[41]

Die Auswertungsmethode mittels Messungen bei zwei Wellenlängen erfordert Kenntnis von der chromatischen Dispersion der adsorbierten Spezies. Die Messungen werden wie oben beschrieben vorgenommen. Durch Multilayer Modelling werden Kontinuumslösungen für beide Messkurven bestimmt und in einem Diagramm geplottet. Eine der beiden Kurven muss nun um den Wert der chromatischen Dispersion verschoben werden, sodass ein Schnittpunkt, der die "wahre" Lösung liefert, entsteht. Ist die chromatische Dispersion nicht aus der Literatur bekannt, kann diese aus der *2-Medien-Methode* ermittelt werden, wenn diese auch bei zwei Wellenlängen durchgeführt wird. Sie ergibt sich aus der Differenz der erhaltenen Brechungsindices bei den unterschiedlichen Wellenlängen.^[41]

Eine weitere Methode der Datenevaluation ist die *deFeijter* Gleichung, mit der die Oberflächenkonzentration an adsorbierter Spezies berechnet werden kann.^[42]

$$\Gamma = \frac{(n_p - n_0) d_p}{dn/dc} \quad (20)$$

$$(n_p - n_0) = \Delta\theta \times k \quad (21)$$

$$\Gamma = \frac{\Delta\theta \times k \times d_p}{dn/dc} \quad (22)$$

wobei Γ die Oberflächenkonzentration, n_p der Brechungsindex der Lösung aus der adsorbiert wird, n_0 der Brechungsindex des Lösungsmittels, d_p die Schichtdicke der Probe, dn/dc das Brechungsindexinkrement, $\Delta\theta$ die Resonanzwinkelverschiebung und k ein Sensitivitätsfaktor, der spezifisch für den verwendeten Sensor-Slide und die Wellenlänge bei der gemessen wurde ist, ist.

Der Vorteil des Einsatzes der *deFeijter* Gleichung, ist das Wegfallen des Multilayer Modellings. Der Term $k \times d_p$ kann bis zu einem d_p von 100 nm als konstant angenommen werden und sind durch Kalibration des Gerätes ermittelbar. Die Verschiebung des Resonanzwinkels kann einfach aus einem Sensogramm abgelesen werden. Das Brechungsindexinkrement ist für einige Stoffe, wie Proteine, bekannt oder kann zum Beispiel durch Gelpermeationschromatographie mit geeigneten Detektoren (Brechungsindexdetektor) bestimmt werden.

Die Bestimmung der Schichtdicke der adsorbierten Schicht kann auch durch folgende Gleichung erfolgen;^[38]

$$d = \frac{l_d}{2} \times \frac{\Delta\theta}{m(n_a - n_0)} \quad (23)$$

wobei d die Dicke der adsorbierten Schicht ist, und l_d die charakteristische Abklinglänge des evaneszenten elektromagnetischen Feldes, die auf 0,37 der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts geschätzt wird. Bei m handelt es sich um den Sensitivitätsfaktor des Sensors, der durch Kalibration des SPR-Spektrometers erhalten wird. n_0 bezeichnet den Brechungsindex des Lösungsmittels, aus dem die Spezies adsorbiert wird und n_a den Brechungsindex der adsorbierten Spezies.

Ebenso wie bei der *deFeijter* Gleichung fällt das Multilayer Modelling beim Auswerten mit dieser Methode weg. Ein entscheidender Nachteil ist die jedoch die Ungenauigkeit der Abklinglänge, da diese vom Brechungsindex des vorliegenden Mediums abhängt. Für mehrlagige Systeme ist der Gebrauch von nur einem Wert für die Abklinglänge nur eine Näherung. Diese ist nur zulässig, wenn die adsorbierten Schichtdicken klein im Vergleich zur

Abklinglänge sind. Vergleicht man Ergebnisse die durch die Näherung erlangt wurden mit Ergebnissen, bei deren Berechnung die exakte Abklinglänge verwendet wurde, so gibt es eine maximale Abweichung von 15%.

Anhand folgenden Zusammenhangs können die erhaltenen Schichtdicken d oder Oberflächenkonzentrationen Γ ineinander umgerechnet werden;

$$\Gamma = d \times \rho \quad (24)$$

wobei ρ dem spezifischen Volumen des Adsorbats entspricht.

Mittels MP-SPR können die Oberflächenkonzentration adsorbierter Spezies, die Schichtdicke und der Brechungsindex adsorbierter Filme, sowie die Adsorptionskinetik und Adsorptionskonstanten bestimmt werden.

2.2.3 Quartz Crystal Microbalance – Dissipation (QCM-D)

QCM-D ist eine Methode mit der die Änderung von Frequenz Δf und Dissipation ΔD bei Zu/Abnahme von Masse an der Oberfläche eines oszillierenden piezoelektrischen Kristalls gemessen wird. Ein QCM-D Kristall besteht aus einem sehr dünnen, runden Träger (Dicke circa 300 μm) aus Quarz, der zwischen zwei Goldelektroden eingeschlossen ist. (Abbildung 11)

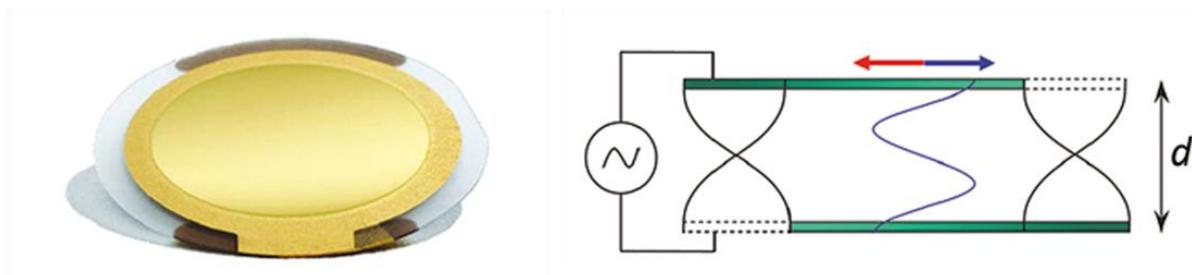


Abbildung 11 QCM-D Sensor (links) und schematische Darstellung des zur Schwingung angeregten Quarzkristalls.^[43]

Durch Anlegen einer Wechselspannung an den Elektroden ist eine Anregung des Kristalls zur Schwingung aufgrund der piezoelektrischen Eigenschaften des Quarzes möglich.^[44] Je nach Schnitt des Kristalls relativ zu seinen kristallografischen Achsen treten unterschiedliche Arten von Oszillation auf.^[45] Bei QCM-D Messungen werden Kristalle mit AT-Schnitt verwendet, die im sogenannten *Thickness-Shear-Modus* schwingen. In diesem Modus, der in Abbildung 11 ersichtlich gemacht ist, bewegen sich die beiden Oberflächen tangential und antiparallel

zueinander. In Resonanz befinden sich die Kristalloberflächen an den Bäuchen einer stehenden Welle mit einer Wellenlänge von $2d/n$, wobei d die Dicke des Kristalls und n die Ordnung (ungerade) des Obertons ist. Obertöne sind Vielfache der Resonanzfrequenz des Kristalls. Die schwarzen Wellen in Abbildung 11 repräsentieren die Grundfrequenz, die blaue Welle den dritten Oberton. Dies führt zu der Resonanzfrequenz $f_n = nc/2d$, wobei c die Schallgeschwindigkeit in Quarz ist.

Lange Zeit wurden Quarzkristallmikrowaagen für die Charakterisierung von Adsorptionsvorgängen aus der Gasphase eingesetzt. Die Methode ist jedoch nur bedingt für die Untersuchung von Adsorptionsprozessen in flüssiger Phase geeignet. Daher wurde die Messung der Dissipation, auch *ring-down* Methode genannt, von *Rodal et al.* eingeführt.^[46] Dabei wird die extern angelegte Wechselspannung in periodischen Zeitabständen ausgeschaltet und die Oszillation des Kristalls kann abklingen. Gemessen wird die Spannung, die während des Abklingens der mechanischen Oszillation, generiert wird. Daraus ergeben sich pro Oberton zwei Parameter, die Resonanzfrequenz f_n und die Dissipation D_n . Die Dissipation ist wie folgt definiert.

$$D = \frac{E_{diss}}{2\pi E_{gesp}} \quad (25)$$

Wobei E_{diss} die verlorene Energie und E_{gesp} die totale gespeicherte Energie während eines Oszillationszyklus bezeichnet. Die Dissipation nimmt für rigide Filme kleine und für weiche Filme große Werte an (siehe Abbildung 12).

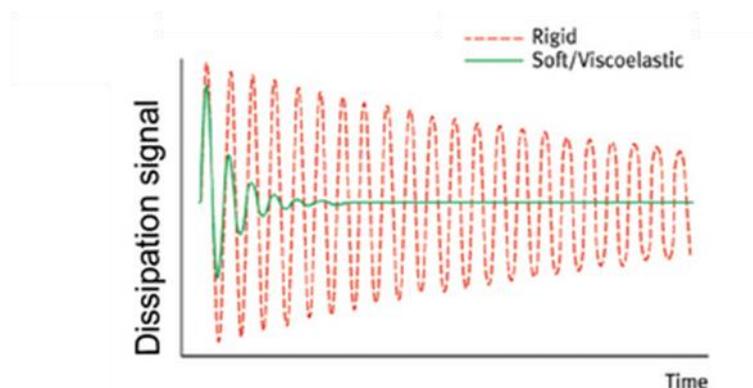


Abbildung 12 Gegenüberstellung des Dissipationsverhaltens von rigiden und weichen Schichten.^[47]

Anhand der Auftragung von ΔD gegen Δf können Aussagen über die Konformation der adsorbierten Schicht getroffen werden. Eine konstante Steigung im $\Delta D - \Delta f$ -Plot weist auf einen rigiden Film hin, hingegen Wendepunkte in der Kurve, deuten auf Änderungen der

viskoelastischen Eigenschaften und der Konformation des Materials während des Adsorptionsprozesses.^[48]

Bei Adsorptionsstudien aus flüssiger Phase muss immer eine Referenzmessung in derselben Flüssigkeit, aus der adsorbiert wird, erfolgen, um den Einfluss der Flüssigkeit auf die Messung von den Eigenschaften des Films zu trennen.

Die Evaluation der aus der Messung erhaltenen Daten hängt von der Beschaffenheit der adsorbierten Schicht ab. Verschiedene Arten von Filmen können nach ihrer Morphologie eingeteilt werden; lateral homogene Filme und lateral heterogene Filme, wie Monolayer von diskreten Partikeln oder anderen Objekten in Nanometergröße.

Im Folgenden wird von lateral homogenen Filmen gesprochen. Für starre, unelastische Schichten, die komplett mit der Oszillation des Kristalls gekoppelt sind, erfolgt die Bestimmung der flächenbezogenen Masse über die *Sauerbrey* Gleichung;^[49]

$$\Delta m = C \frac{\Delta f_n}{n} \tag{26}$$

wobei Δm der Massenänderung des Kristalls durch die adsorbierte Schicht (inklusive eingelagertes Wasser), n der Ordnung des Obertons und C der *Sauerbrey*-Konstante ($-0,177 \text{ mg Hz}^{-1} \text{ m}^{-2}$ für 5 MHz Kristalle) entspricht.

Für weiche, viskoelastische Filme, deren Masse nicht völlig mit der Oszillation des Kristalls gekoppelt ist und die Energie während der Oszillation verlieren ($\Delta D > 0$), ist die *Sauerbrey* Gleichung nicht gültig. Zur Auswertung der Daten ist es notwendig, viskoelastisches Modelling anzuwenden. Die Eigenschaften solcher viskoelastischen Filme können durch den komplexen Schermodul $G = G' + iG''$ beschrieben werden. Der Zusammenhang zwischen angewandter Kraft und Ausmaß der Deformierung, die Elastizität des Materials, wird durch den Speichermodul G' ausgedrückt. Der Verlustmodul $G'' = \omega \cdot \eta$, wobei η die Viskosität und ω die Kreisfrequenz der Deformation bezeichnet, beschreibt den Verlust der Energie, hervorgerufen durch Deformation. Die Viskosität kann als Reibungskoeffizient angesehen werden, der die aufgebrachte Kraft mit der Frequenz der Deformation in Verbindung bringt. Wenn $G'' \gg G'$ verhält sich ein Material vorwiegend viskos, wenn $G' \gg G''$ hauptsächlich elastisch. Bei ähnlichen Werten von G' und G'' ist das Verhalten der Substanz viskoelastisch. Es ist anzumerken, dass G' und G'' abhängig von der Kreisfrequenz der Deformation sind. Diese Abhängigkeiten können in kleinen Frequenzbereichen durch Potenzgesetze mit den Exponenten α' und α'' abgeschätzt werden;

$$G'(\omega) = G'_0(\omega/\omega_0)^{\alpha'} \tag{27}$$

$$G''(\omega) = G_0''(\omega/\omega_0)^{\alpha''} \quad (28)$$

wobei ω_0 eine beliebig ausgesuchte Referenzfrequenz ist. Die Exponenten α' , α'' und dazugehörigen Frequenzen sind bezogen auf die Bewegungen im Material und die mikroskopischen Wechselwirkungen darin.^[50,5]

Frequenzänderungen, Oberflächenkonzentration und viskoelastische Eigenschaften können in Beziehung gesetzt werden, woraus sich Gleichungssysteme ergeben, die durch numerisches Fitten mit eigens konzipierten Softwareprogrammen gelöst werden können. Die Anwendung des viskoelastischen Modelling erfordert wegen der fünf unabhängigen Fitting Parameter (Oberflächenkonzentration Γ , Schermodule G' , G'' und Exponenten α' , α'') große Sorgfalt. Die Oberflächenkonzentration geht als Produkt der Dichte ρ und der Dicke h des Films in das Modelling ein, die Schermodule als Produkt mit der Dichte $\rho G'$, $\rho G''$. Um sinnvolle Ergebnisse zu generieren, ist es nicht essentiell einige der Eigenschaften des Films zu kennen, jedoch kann dies hilfreich sein. Die durch QCM-D bestimmten viskoelastischen Eigenschaften unterscheiden sich aufgrund der auftretenden Frequenzen, und der damit verbundenen Selektivität für mikroskopische Relaxationsprozesse im Film, um einige Größenordnungen von denen, die durch konventionelle Rheometer erhalten werden.

Lateral heterogene Filme können nicht nach demselben Schema wie lateral homogene interpretiert werden, da hydrodynamische Effekte und die Bewegung der Partikel an der Oberfläche eine große Rolle spielen. Für rigide Filme ist jedoch auch hier die *Sauerbrey* Gleichung anwendbar. Die so ermittelte Oberflächenkonzentration enthält Beiträge von Flüssigkeit, die sich zwischen den einzelnen Partikeln und im Inneren dieser befindet. Partikelgröße, Form, Anordnung und Oberflächenbelegung (Fraktion belegter Adsorptionsstellen) bestimmen das Ausmaß dieser Beiträge. Studien, die durch Kombination von QCM-D und anderen Methoden, wie optische Reflektometrie^[52], Ellipsometrie^[53], MP-SPRS^[54,55] oder AFM^[56,57,58,59], die Korrelation von Frequenzänderung und Oberflächenbedeckung untersuchen, zeigen keinen linearen Zusammenhang beider Größen. Mit steigender Oberflächenbelegung sinkt der Beitrag von umgebender Flüssigkeit am Frequenzsignal. Bei niedriger Oberflächenbelegung ist die Sensitivität für adsorbierte Partikel hoch, jedoch bei hoher Oberflächenbelegung ist sie gering. Heterogene Filme mit hoher Oberflächenbedeckung können ähnlich behandelt werden wie bereits besprochene homogene Filme, weil die gesamte Flüssigkeit zur Frequenzänderung beiträgt. Das bedeutet, dass die Oberflächenkonzentration mit der Gesamtmasse des Materials übereinstimmt und der Film bestehend aus Partikel und Flüssigkeit gleich hoch ist wie der Durchmesser eines Partikels.^[57,60] Eine einfache Näherung zur Beschreibung des Falls bei niedriger Oberflächenbelegung, bei dem komplexe, hydrodynamische Effekte wirken, ist die Einführung von Hüllen aus eingeschlossener Flüssigkeit, die jedes Partikel umgeben. Diese Hüllen dürfen nicht mit der Solvatationshülle verwechselt werden.

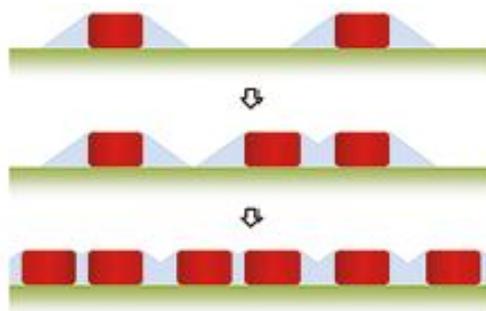


Abbildung 13 Schema zur Erklärung des Einflusses von Flüssigkeitshüllen der Proteine auf deren Adsorptionsverhalten. ^[43]

In Abbildung 13 sind Partikel und die beschriebenen Hüllen dargestellt. Ein Partikel, der an einer Lücke zwischen zwei bereits adsorbierten Teilchen adsorbiert, trägt durch die Überlappung der Flüssigkeitshüllen weniger Masse bei als wenn er auf eine leere Oberfläche adsorbieren würde. Empirische Modelle basierend auf dieser Näherung können zur Evaluation der gewonnenen Daten herangezogen werden. ^[52,5,61]

2.2.4 Kombination von MP-SPRS und QCM-D Daten

MP-SPRS und QCM-D; zwei Methoden, die auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien, optischen und elektromechanischen, beruhen, können in Kombination einen neuen Blickwinkel auf Adsorptionsphänomene geben. Die quantitative Interpretation von QCM-D Daten ist limitiert, da sie nur die Feuchtmasse des Adsorbats liefern. Mittels MP-SPRS wird die Trockenmasse pro Flächeneinheit erhalten. Aus den Ergebnissen beider Methoden kann der Wassergehalt der adsorbierten Schicht anhand nachfolgender Gleichung berechnet werden;

$$\text{Wassergehalt [\%]} = \frac{\Gamma_{\text{QCM-D}} - \Gamma_{\text{MP-SPRS}}}{\Gamma_{\text{QCM-D}}} \times 100 \%$$

(29)

wobei $\Gamma_{\text{QCM-D}}$ die durch QCM-D und $\Gamma_{\text{MP-SPRS}}$ die durch MP-SPRS ermittelte Oberflächenkonzentration darstellt. ^[44]

3 Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Adsorptionsverhalten von verschiedenen Phosphonaten auf Gold Oberflächen untersucht werden. Diese Versuche dienen als Vorstudien zur Entwicklung eines Biosensors basierend auf der Funktionalisierung des Monolayers durch Einsatz von am Endterminus des organischen Rests mit reaktiven Gruppen modifizierten Phosphonaten.

Des Weiteren sollte die unspezifische Proteinadsorption an kationisch modifizierten Cellulose-Filmen erforscht werden. Es sollte gezeigt werden, dass eine Kontrolle des Phänomens durch Veränderung externer Parameter, wie Ladungsdichte des Substrats und pH-Wert der Lösung aus der adsorbiert wird, erlangt werden kann.

Zur Lösung der gestellten Aufgaben wurden die oberflächenspezifische Charakterisierungsmethoden MP-SPRS und QCM-D gewählt.

3.1 Phosphonat Monolayer auf Gold

Phosphonate sind vielseitige Verbindungen, die beispielsweise als Chelatisierungsagenzien, Stabilisatoren für Peroxide, Haftvermittler oder in der Halbleitertechnik eingesetzt werden. Eine besondere Eigenschaft der Phosphonate ist die Ausbildung von SAMs. Bisher gibt es einige Studien zur Herstellung von Phosphonat SAMs auf Siliziumoxid, Kupferoxid und Aluminiumoxid, jedoch keine zu reinen Goldoberflächen. Dies liegt daran, dass nur von einer schwachen Wechselwirkung der polaren Kopfgruppe des Phosphonats mit Gold berichtet wird.^[2] Diese lässt nicht zu, dass stabile SAMs gebildet werden. Nichtsdestotrotz ist Gold als Material einzigartig. Es zeigt eine starke Plasmonenresonanz, ist inert, biokompatibel und eine Strukturierung des Materials durch verschiedene Methoden ist möglich. Die Verwendung von Gold als Substrat für einen Biosensor wäre zu bevorzugen, daher wurden die nachfolgend beschriebenen Vorstudien durchgeführt.^[62]

3.1.1 Adsorptionsstudie Phosphonat auf Gold

Um das Adsorptionsverhalten von Phosphonaten auf Gold-Oberflächen zu untersuchen, wurden die drei in Abbildung 14 dargestellten, kommerziell erhältliche Phosphonate, die sich in der Länge ihres organischen Rests unterscheiden, ausgewählt; Tetradecylphosphonat, Octylphosphonat und Vinylphosphonat. Infolgedessen sollten sich Monolayer mit unterschiedlicher Schichtdicke auf den Goldoberflächen bilden.

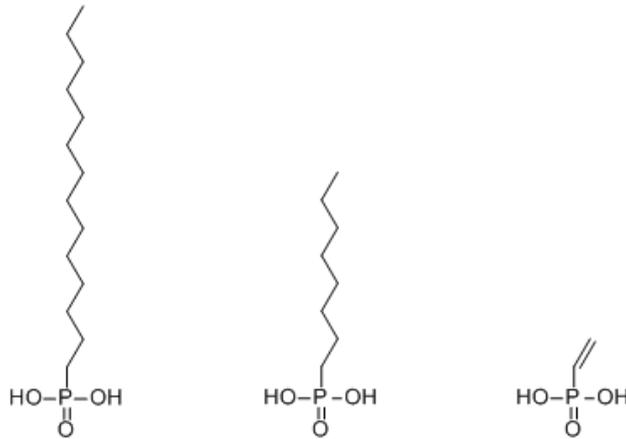


Abbildung 14 Struktur der mit MP-SPRS vermessenen Phosphonate; Tetracyclphosphonat, Octylphosphonat, Vinylphosphonat (von links nach rechts).

Die Wechselwirkung der einzelnen Phosphonate mit der Goldoberfläche wurde mittels MP-SPRS charakterisiert. Die Adsorption erfolgte aus Lösungen der Phosphonate in Isopropanol mit einer Konzentration von $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bei einer Flussrate von $100 \text{ }\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ über einen Zeitraum von 5 min. Die verwendete Konzentration der Lösungen wurde anhand von Vorversuchen optimiert. Niedrigere Konzentrationen führten zu längeren Adsorptionszeiten, höhere mussten durch die geringe Löslichkeit der Phosphonate ausgeschlossen werden.

Aus den Sensogrammen (Abbildung 15) lässt sich die Verschiebung des Resonanzwinkels, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, ablesen. Für die Resonanzwinkelverschiebung ergeben sich im Mittel folgende Werte; Tetracyclphosphonat $0,11^\circ$ bei 670 nm, $0,05^\circ$ bei 785 nm; Octylphosphonat $0,13^\circ$ bei 670 nm, $0,07^\circ$ bei 785 nm und Vinylphosphonat $0,12^\circ$ bei 670 nm, $0,06^\circ$ bei 785 nm. Da die Abhängigkeit des Brechungsindex von der Konzentration (dn/dc) für die verwendeten Phosphonate nicht bekannt ist, kann die Oberflächenkonzentration der Substanzen nicht berechnet werden. Aus den Sensogrammen ist jedoch klar ersichtlich, dass nach dem Spülvorgang mit Isopropanol irreversibel adsorbierte Spezies vorliegt.

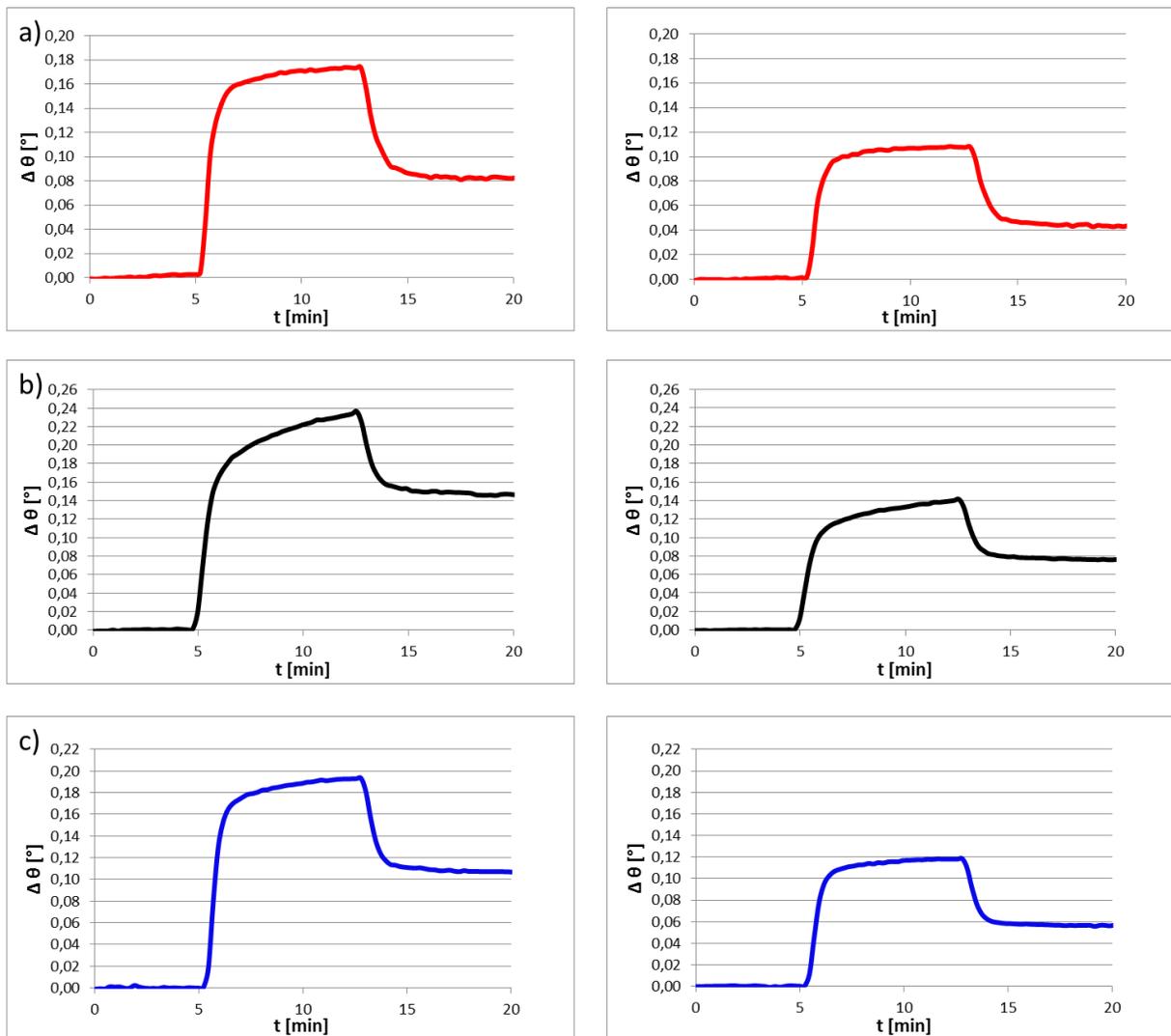


Abbildung 15 Repräsentative Sensogramme der Adsorption der verschiedenen Phosphonate auf Gold; a) Tetradecylphosphonat, b) Octylphosphonat, c) Vinylphosphonat, (links 670 nm, rechts 785 nm), Start der Adsorption bei 5 min, Start des Spülens bei 12,5 min. Flussrate $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Konzentration $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Zur Auswertung der Daten wurde die *2-Medien-Methode* angewandt, wobei die SPR-Kurven vor und nach der Adsorption in trockenem Zustand als auch in Isopropanol verglichen wurden. Durch Fitten der aus den Messungen in Luft und Isopropanol erhaltenen SPR-Kurven konnten die Kontinuumslösungen erhalten werden. Die zusammengehörigen Schichtdicken und Brechungsindizes wurden für beide Medien geplottet (Abbildung 16). Der Schnittpunkt den man aus dieser Auftragung erhält, ergibt die exakte Schichtdicke und den exakten Brechungsindex der adsorbierten Schicht für die bei der Messung angewandte Wellenlänge. Die Methode wurde für zwei Wellenlängen durchgeführt, um die erhaltenen Ergebnisse zu validieren und Artefakte auszuschließen.

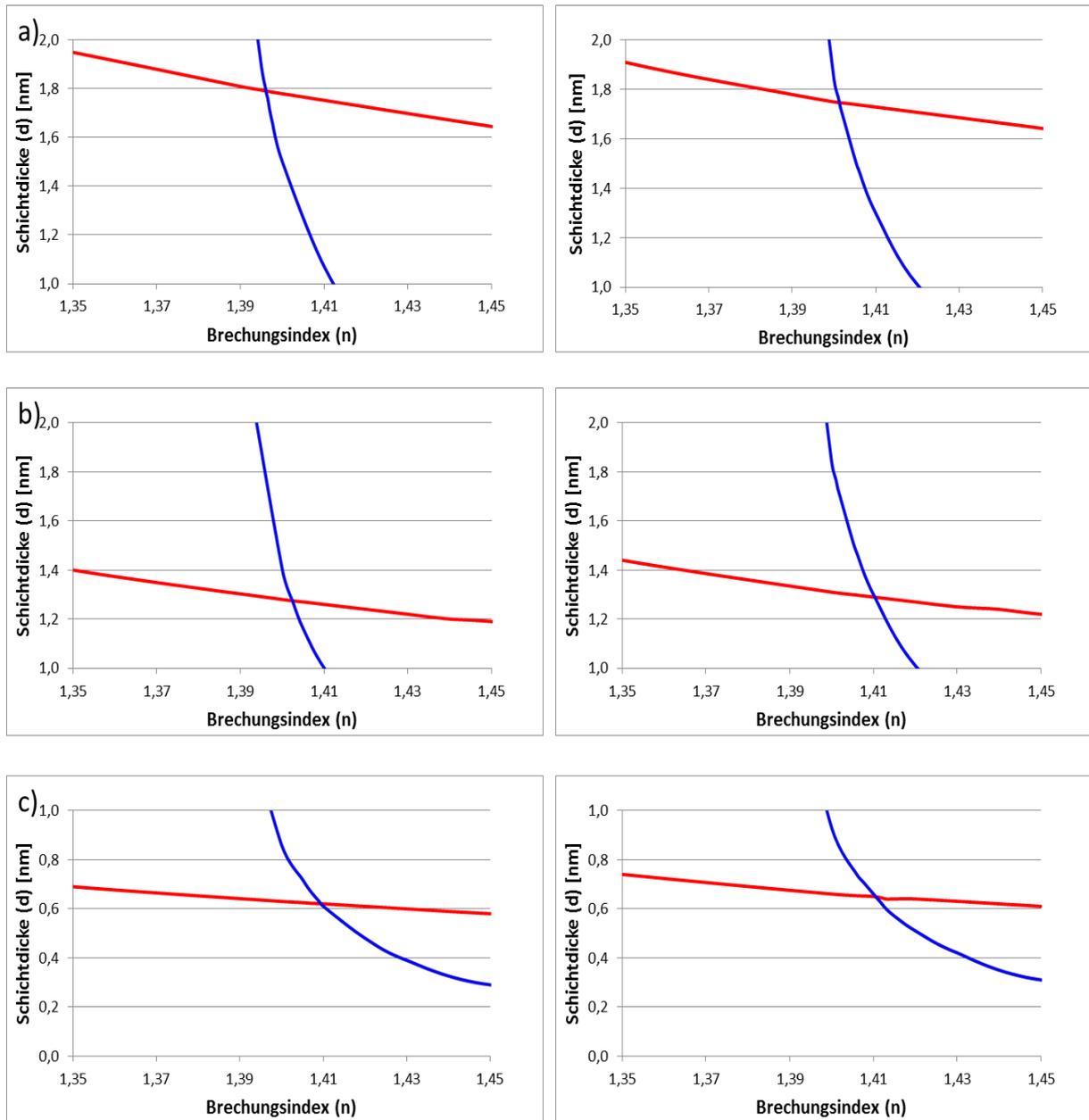


Abbildung 16 Repräsentative Darstellung der 2-Medien-Methode zur Bestimmung der Schichtdicke und des Brechungsindex bei zwei Wellenlängen zugehörig zu den oben gezeigten Messungen; a) Tetracyclphosphonat, b) Octylphosphonat, c) Vinylphosphonat, (links 670 nm, rechts 785 nm), (rote Linie Luft, blaue Linie Isopropanol).

Aus der 2-Medien-Methode ergeben sich die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse. Die gemittelten Schichtdicken für Tetracyclphosphonat $1,72 \pm 0,05$ nm, Octylphosphonat $1,43 \pm 0,13$ nm und Vinylphosphonat $0,69 \pm 0,04$ nm, korrelieren mit den in Tabelle 2 angeführten theoretischen Moleküllängen der Substanzen.

Tabelle 1 Schichtdicken d und Brechungsindices n der unterschiedlichen Phosphonat Monolayer auf Gold. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen.

	d [nm]		n [1]	
	670 nm	785 nm	670 nm	785 nm
Tetradecylphosphonat	$1,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$1,3960 \pm 0,0002$	$1,4012 \pm 0,0011$
Octylphosphonat	$1,4 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	$1,4016 \pm 0,0009$	$1,4053 \pm 0,0014$
Vinylphosphonat	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$1,4087 \pm 0,0008$	$1,4102 \pm 0,0008$

Die erhaltenen Brechungsindices steigen mit abnehmender Schichtdicke der Phosphonat Monolayer, was nicht dem erwarteten Trend entspricht, jedoch kann dies durch die unterschiedliche Bedeckung der Oberflächen mit den Phosphonaten erklärt werden kann. Je geringer die Oberflächenbedeckung, desto kleiner ist die optische Dichte der adsorbierten Schicht. Die Brechungsindices der Phosphonate liegen bei circa 1,4 und sind bei 670 nm niedriger als bei 785 nm, sprich die vermessenen Proben zeigen anomale Dispersion. Anomale Dispersion tritt normalerweise in Bereichen starker Absorption eines Materials auf, kann aber auch durch den Einfluss von Rauigkeit entstehen. In der Technologie wird dieses Phänomen beispielsweise in Lichtwellenleitern ausgenutzt um die Leitung von Signalen über sehr lange Strecken ohne Signalverstärkung zu ermöglichen. Die in dieser Arbeit untersuchten Oberflächen, könnten vielleicht nach genauerer experimenteller Untersuchung für derartige Anwendungen in Betracht gezogen werden. Trotz der Aktualität dieses spannenden Themas, wurde dies nicht im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet.

Die theoretischen Moleküllängen der Phosphonate wurden wie in nachfolgender Formel berechnet;

$$L = P=O + P-C + n \sqrt{2C-C^2 \times (1-\cos(109,5))} + \sqrt{C-C^2 + a^2 - 2 C-C a \cos(109,5)} \quad (30)$$

$$a = \cos\left(\frac{109,5}{2}\right) \times C-H_3 \quad (31)$$

wobei n für Octylphosphonat 3 und für Tetradecylphosphonat 6 beträgt.

$$L_{\text{Vinylphosphonat}} = P=O + P-C + \sin(60) \times C=C + \sin(60) \times C-H_2 \quad (32)$$

Hierzu wurden folgende Werte für die benötigten Bindungslängen und Bindungswinkel angenommen; P=O 154 pm, P-C 184 pm, C=C 134 pm, C-C 154 pm, C-H₃ 110 pm, C-H₂ 109 pm, Tetraederwinkel 109,5°, Winkel zwischen P-C und C=C Bindungen 60°.^[63]

Tabelle 2 Theoretische Moleküllängen der vermessenen Phosphonate.

	Theoretische Moleküllänge [nm]
Tetradecylphosphonat	2,00
Octylphosphonat	1,20
Vinylphosphonat	0,55

Die mittels MP-SPRS erhaltenen Schichtdicken weichen zwischen 0,15 nm und 0,3 nm von den theoretisch berechneten Moleküllängen ab. Vergleicht man die Ergebnisse der Schichtdicken, die bei den verschiedenen Wellenlängen gemessen wurden, so ist eine Abweichung von maximal 0,1 nm ersichtlich. Im Falle des Tetradecylphosphonats ist die Schichtdicke des adsorbierten Monolayers geringer als die berechnete Moleküllänge. Dies kann auf ein Kippen der Moleküle im gesamten Layer zurückzuführen sein. Der Effekt tritt vermutlich aufgrund der Länge der Kette auf und ist deshalb bei den anderen Phosphonaten nicht zu beobachten. Ein weiterer Grund dafür könnte eine nicht vollständige Bedeckung sein, denn bei MP-SPRS wird ein Durchschnitt der Probe vermessen. Der einfallende Strahl trifft bei unvollständiger Bedeckung teilweise auf das adsorbierte Phosphonat und teilweise auf die reine Goldoberfläche, regt die Plasmonenresonanz an, wird reflektiert und detektiert. Im Zuge der Auswertung wird aber das detektierte Signal einem Layer mit vollständiger Bedeckung zugeschrieben, somit wird die Schichtdicke zu kleineren Werten hin beeinflusst (siehe Abbildung 17). Dies ist auch der Grund warum bei höherer Rauigkeit des Substrats trotzdem eine einheitliche Schichtdicke erhalten wird.

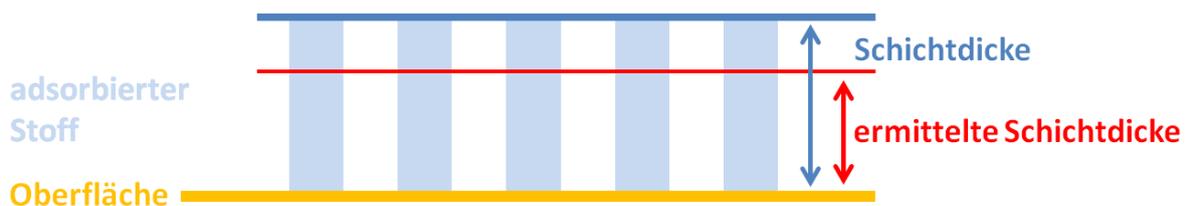


Abbildung 17 Schematische Darstellung des Einflusses von unvollständiger Bedeckung auf die mit MP-SPRS ermittelte Schichtdicke.

Zudem besteht nicht nur eine Messungenauigkeit sondern auch bei der Auswertung treten durch das Multilayer-Modelling zusätzliche Möglichkeiten für Ungenauigkeiten auf. Die Standardabweichungen der Ergebnisse sind für das Octylphosphonat deutlich höher als bei Tetradecyl- und Vinylphosphonat. Es ist anzunehmen, dass im Tetradecylphosphonat-Monolayer eine Stabilisierung der Ketten durch hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt und somit eine Schwankung in den Schichtdicken minimiert wird. Diese Stabilisierung dürfte beim Octylphosphonat mit um 6 Kohlenstoffatomen kürzerer Kettenlänge aufgrund geringerer hydrophober Wechselwirkungen nicht so stark ausgeprägt sein. Beim

Vinylphosphonat sind die Ketten so kurz, dass Instabilität kaum einen Einfluss auf die Schichtdicken hat. Die Konformation der Phosphonate auf der Oberfläche könnte mittels IRRAS untersucht werden, was aber nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden konnte.

3.1.2 Charakterisierung Phosphonat Monolayer

Eine Charakterisierung der Phosphonat Monolayer erfolgte mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) und Kontaktwinkelmessung. Zur Kontaktwinkelmessung wurde die Adsorption der Phosphonate auf gereinigten Gold-Sensor-Slides mit Dipping-Methode simuliert. Die Nullprobe wurde anstatt in Phosphonat-Lösung in Isopropanol gedippt. Nach ersten Messungen stellte sich heraus, dass sich die Phosphonate in Kontakt mit Wasser teilweise von der Oberfläche lösen, was für eine schwache Interaktion mit der Goldoberfläche wie in der Literatur beschrieben spricht. Zur Lösung dieses Problems wurde ein Temperschnitt bei 90 °C und einer Dauer von 1 h durchgeführt. Danach waren die Phosphonate offensichtlich irreversibel an der Oberfläche gebunden und die Kontaktwinkel konnten problemlos bestimmt werden.

Tabelle 3 Ergebnisse für Kontaktwinkel (CA) der getemperten Phosphonat Monolayer. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus sechs Messungen.

	CA [°]
Tetradecylphosphonat	83 ± 4
Octylphosphonat	74 ± 4
Vinylphosphonat	41 ± 1
Nullprobe	81 ± 4

Die Kontaktwinkel (siehe Tabelle 3) sind vergleichbar mit denen, die von Hoque et al.^[64] bestimmt wurden. Für Octylphosphonat stimmt der gemessene Wert von 74 ± 4 exakt mit dem aus der Literatur überein. Auch der Trend, dass der Kontaktwinkel mit zunehmender Kettenlänge des Phosphonats zunimmt, konnte festgestellt werden. Dies ist auf die mit der Kettenlänge wachsende Hydrophobizität zurückzuführen. Zusätzlich kann darauf geschlossen werden, dass die hydrophile Kopfgruppe der Phosphonate an der Goldoberfläche anbindet, da die Kontaktwinkel ansonsten niedriger wären und ähnliche Werte einnehmen müssten.

Um zu zeigen, dass die durch MP-SPRS detektierten, auf den Gold-Sensor-Slides haftenden Substanzen die adsorbierten Phosphonate sind, erfolgte eine Charakterisierung mittels XPS. Auch hier wurde vor der Messung der Temperschnitt durchgeführt. Die erhaltenen P_{2p}-Spektren sind in Abbildung 18 gezeigt.

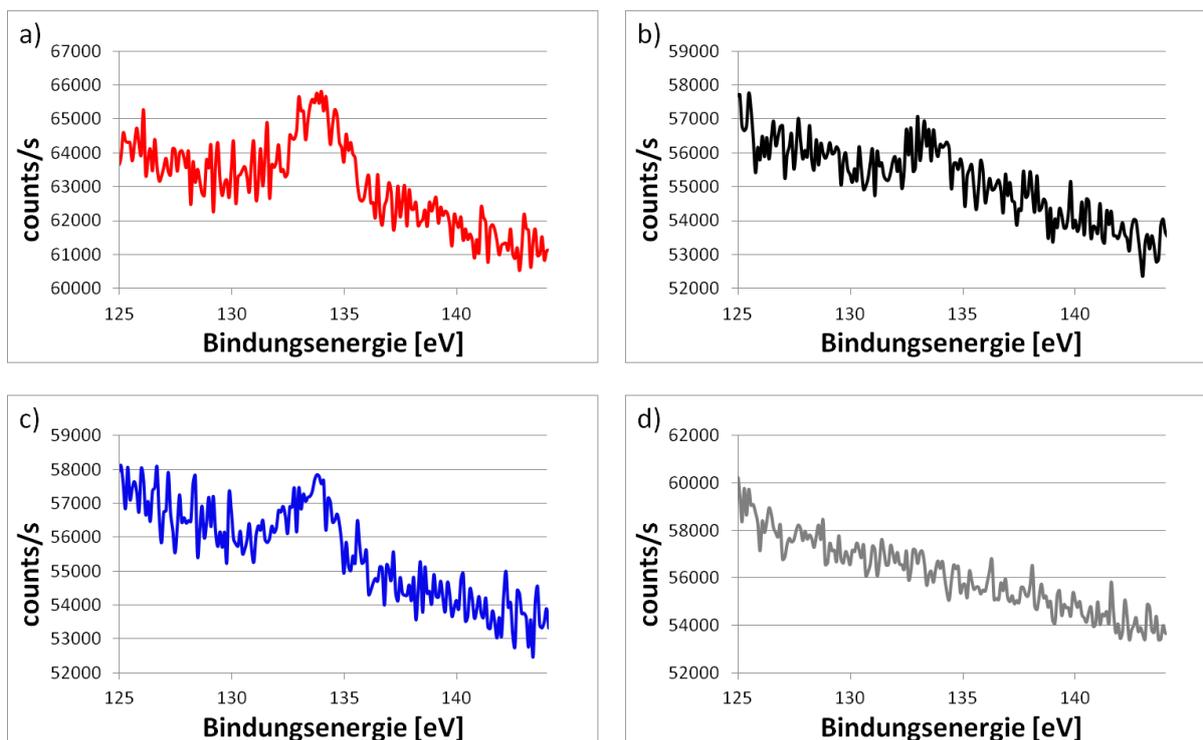


Abbildung 18 Darstellung der P_{2p} -Peaks der XPS-Spektren der verschiedenen Phosphonat Monolayer; a) Tetradecylphosphonat, b) Octylphosphonat, c) Vinylphosphonat, d) reiner Gold-Sensor-Slide.

Die P_{2p} -Peaks der Monolayer treten bei den folgenden Bindungsenergien auf; Tetradecylphosphonat bei 133,9 eV, Octylphosphonat bei 132,9 eV und Vinylphosphonat 133,8 eV. Diese Werte stimmen mit den Vergleichswerten für die Bindungsenergien der P_{2p} -Elektronen von Phosphonaten aus der NIST-Datenbank überein.^[65] Diese liegen bei 133,6 eV und 134,3 eV. Am Spektrum der Nullprobe ist klar ersichtlich, dass sich kein Phosphor auf der Oberfläche befindet.

3.1.3 Untersuchung Adsorptionsmechanismus Phosphonate an Goldoberflächen

Da keine Adsorptionsstudien von Phosphonaten auf Gold bekannt sind und die Affinität von Sauerstoff beziehungsweise der OH-Funktionalität zu Gold bekanntlich nicht so groß wie beispielweise die von Schwefel ist, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der Adsorption. In Abbildung 19 sind drei mögliche Anbindungsarten für Phosphonate auf Oberflächen angeführt.^[66]

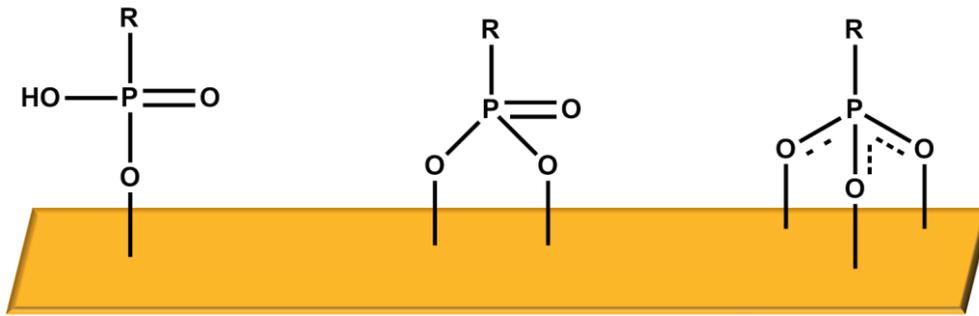


Abbildung 19 Schematische Darstellung der mögliche Anbindungsarten von Phosphonaten auf Goldoberflächen: links monodentat, mitte bidentat, rechts tridentat.

Während der Durchführung der Adsorptionsstudien fiel auf, dass die Menge an adsorbierter Spezies durch die Reinigung der Sensor-Slides beeinflusst wird. Je öfter ein Sensor-Slide gereinigt wurde, desto mehr adsorbierte an der Oberfläche. Um den Effekt der Reinigung mit Piranha-Lösung auf die Sensor-Slides zu ermitteln wurden AFM-Messungen von neuen, noch nie gereinigten, Sensor-Slides und gereinigten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Oberflächenbeschaffenheit der Sensor-Slides wird durch die Reinigung stark verändert. Ein Teil des Goldes wird abgelöst und es entstehen Goldklümpchen. Die Rauigkeit wird von 0,70 nm auf 6,19 nm erhöht, was eine Oberflächenvergrößerung mit sich bringt.

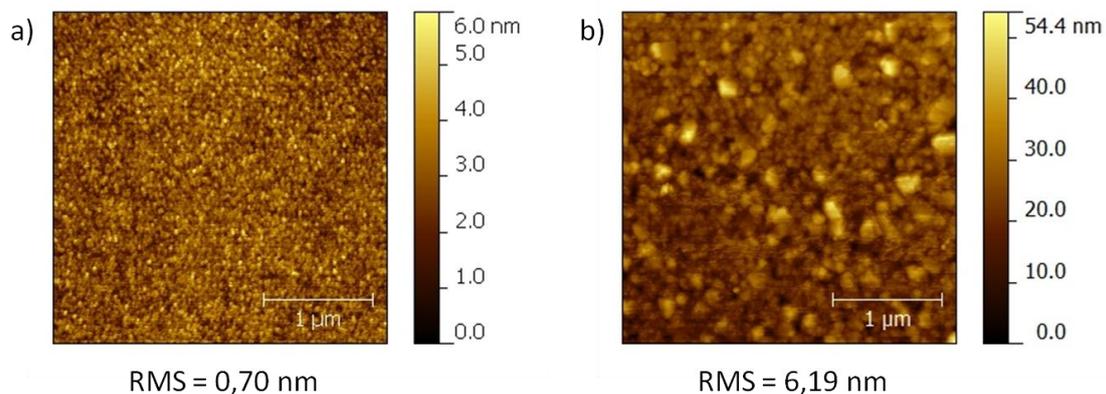


Abbildung 20 AFM-Bilder der Gold-Sensor-Slides; a) neu, b) in Piranha-Lösung gereinigt.

Zusätzlich erfolgten XPS-Messungen von neu hergestellten und gereinigten Goldoberflächen, sowohl ohne als auch mit Phosphonat-Monolayer. Dazu wurden Glassubstrate mit Aluminium (Haftschicht) und anschließend mit Gold bedampft.

Es konnte nachgewiesen werden, dass trotz stark oxidierender Wirkung von Piranha-Lösung kein Gold-Oxid auf den Substraten entstanden ist. Im O_{1s} -Spektrum ist ersichtlich, dass sich kein Sauerstoff auf den frisch bedampften und gereinigten Oberflächen ohne Phosphonat-

Monolayer befindet. Die Bindungsenergien für die O_{1s} -Elektronen liegen für die mit Phosphonat-Lösung behandelten Proben bei 531,6 eV (siehe Abbildung 21). Die Bindungsenergien der Au_{4f} -Elektronen liegen für die frisch bedampften Substrate bei 83,68 eV und für die restlichen Proben bei 83,98 eV (siehe Abbildung 22). Wäre Gold-Oxid vorhanden, müssten bei 85,5 eV und 89,4 eV zusätzliche Peaks für die Au-O-Bindung auftreten.^[67] In den umfassenden Spektren sind auch keine Hinweise auf eventuelle Schwefelreste, die von der Reinigung herrühren, zu finden. Auch ein komplettes Ablösen von Gold bis auf die Chrom bzw. Aluminium Haftschrift kann ausgeschlossen werden. Aus den P_{2p} -Spektren kann jedoch geschlossen werden, dass die Reinigungsprozedur einen Einfluss auf die Adsorption der Phosphonate hat (siehe Abbildung 23). Es tritt nur für die gereinigte Oberfläche ein Peak bei einer Bindungsenergie von 134,1 eV auf. Auch im Kohlenstoff-Spektrum (Abbildung 24) liegt dieser Trend vor.

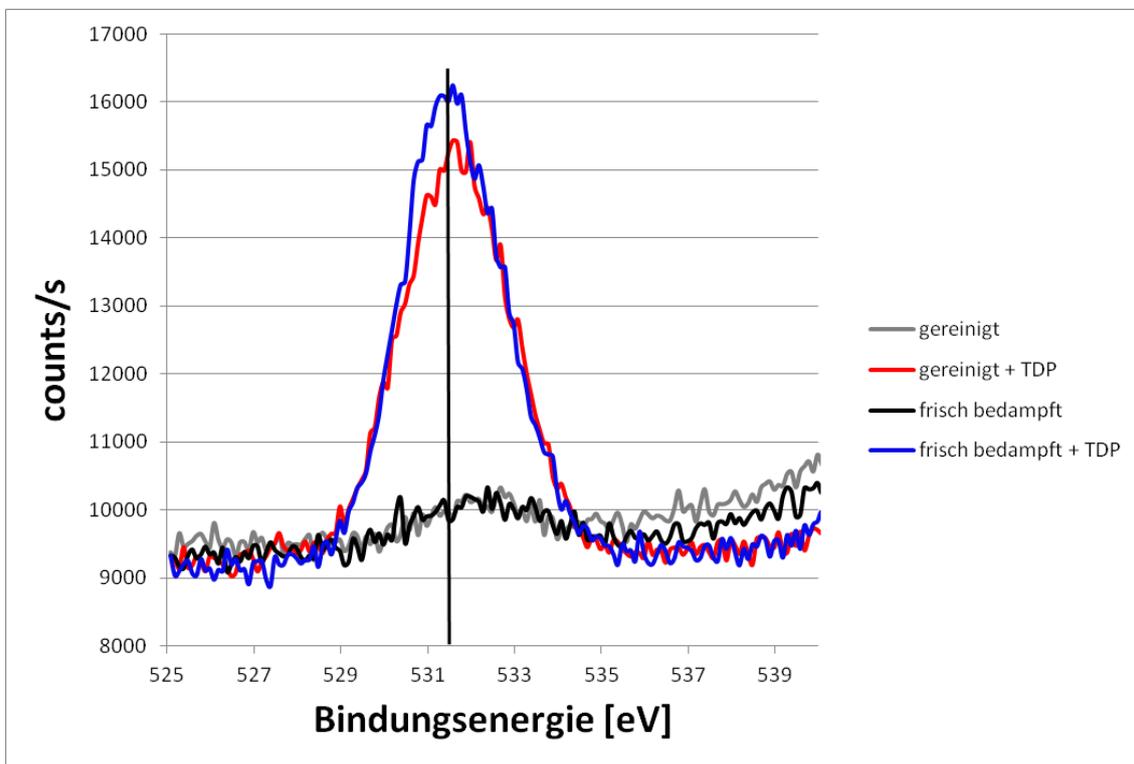


Abbildung 21 Darstellung der O_{1s} -Peaks der XPS-Spektren von frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten sowie von mit Tetradecylphosphonat behandelten frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten.

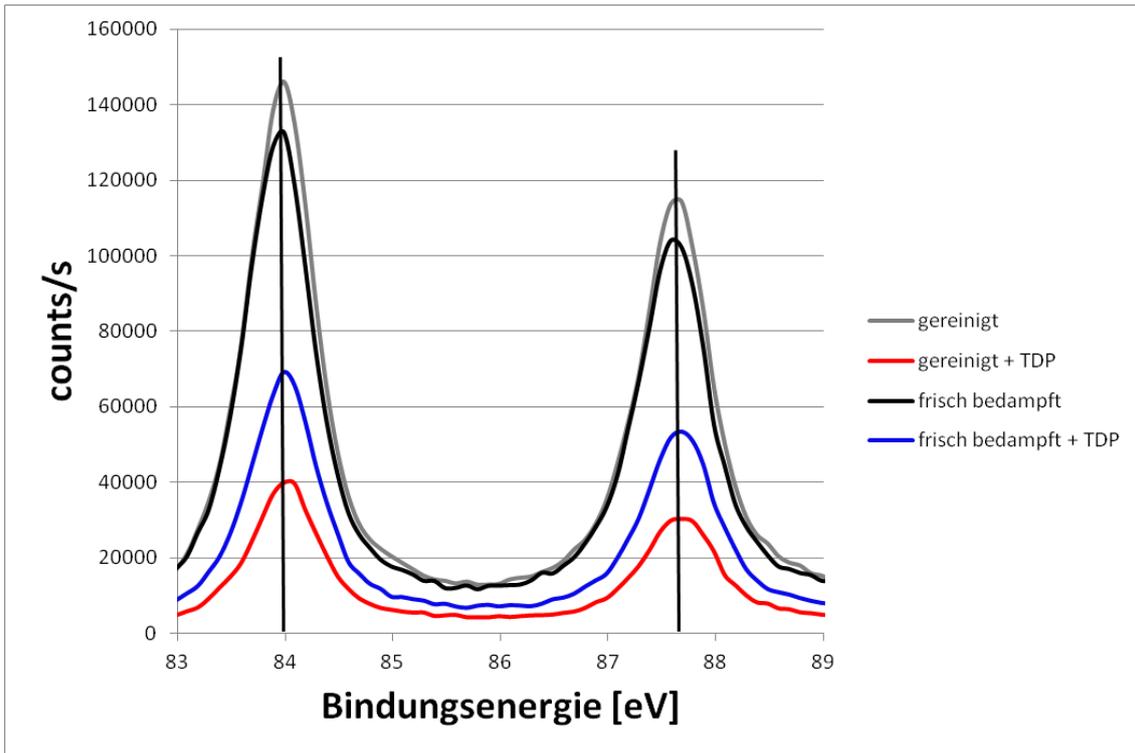


Abbildung 22 Darstellung der Au_{4f}-Peaks der XPS-Spektren von frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten sowie von mit Tetradecylphosphonat behandelten frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten.

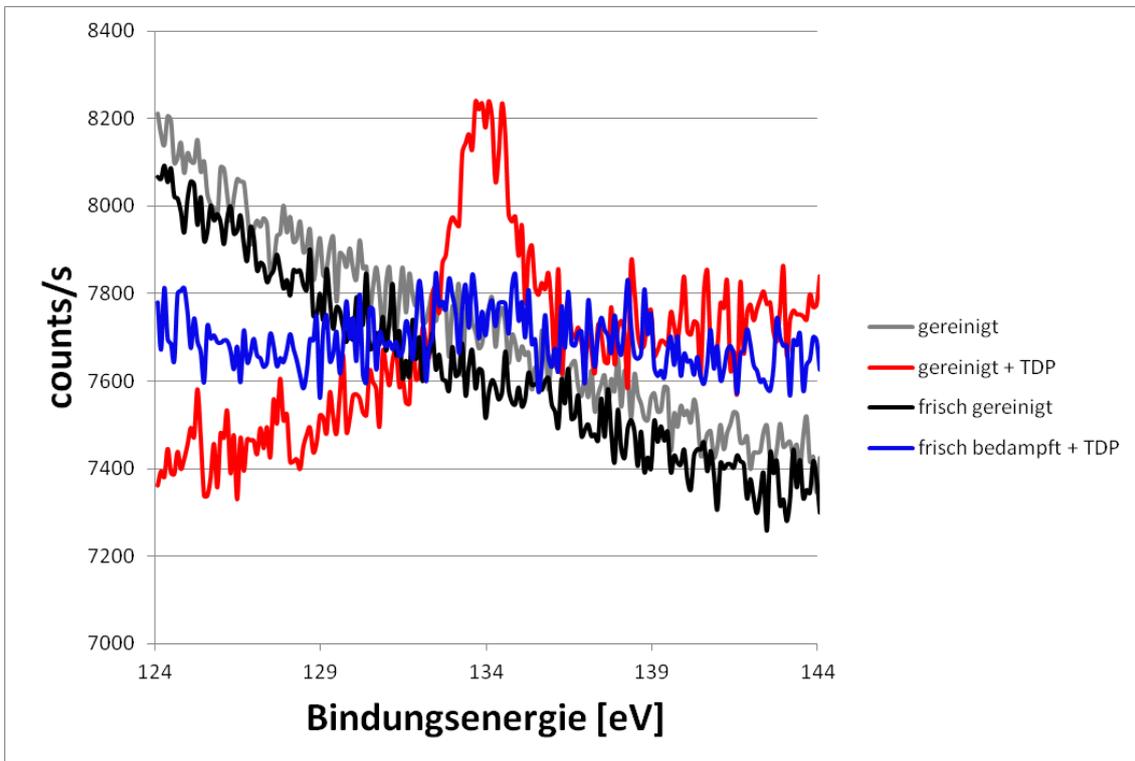


Abbildung 23 Darstellung der P_{2p}-Peaks der XPS-Spektren von frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten sowie von mit Tetradecylphosphonat behandelten frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten.

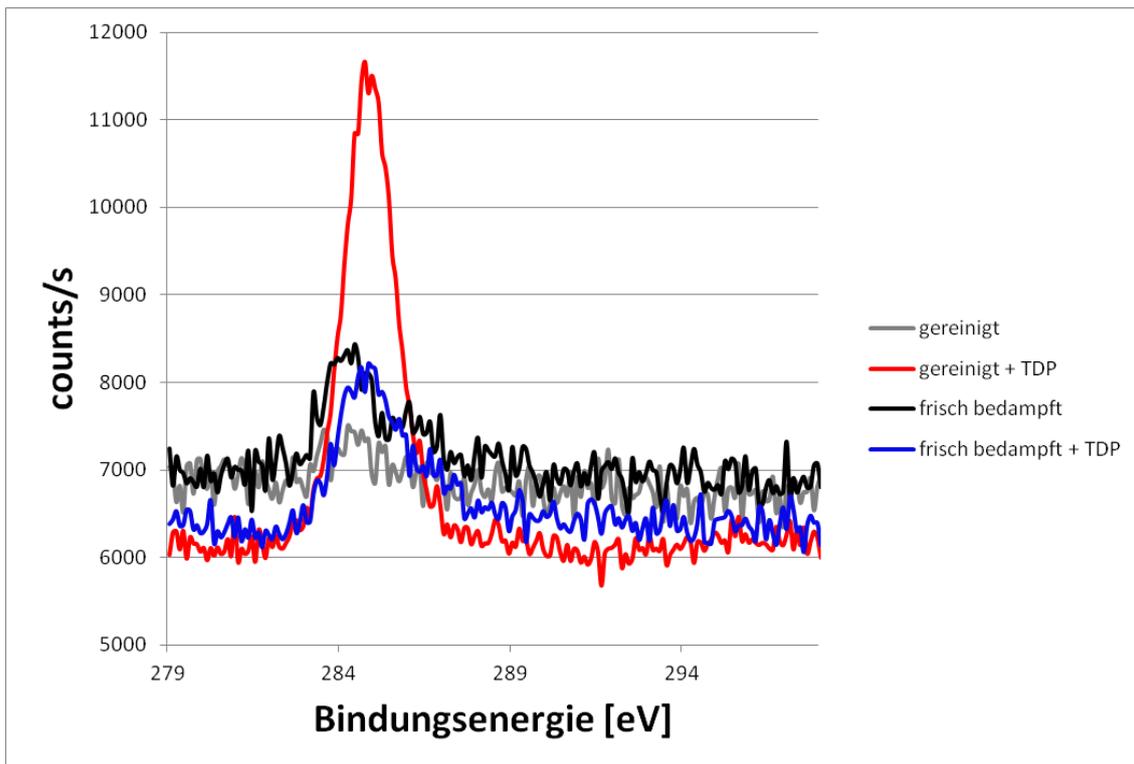


Abbildung 24 Darstellung C_{1s}-Peaks der XPS-Spektren von frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten sowie von mit Tetradecylphosphonat behandelten frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten.

Des Weiteren wurde ein O_{1s}-Spektrum des Phosphonats in Pulverform aufgenommen und mit dem des Monolayers verglichen (siehe Abbildung 25). Der O_{1s}-Peak des Phosphonats in Pulverform setzt sich aus zwei Signalen zusammen, dem für P=O und dem für P-OH (siehe Abbildung 26). Die O_{1s}-Peaks für P=O und P-OH wurden in das aufgenommene Spektrum gefittet. Die erhaltenen Maxima bei 531,38 eV für P=O und bei 532,78 eV für P-OH korrelieren mit Werten aus der Literatur, die für P=O bei 531,4 eV und für P-OH bei 532,8 eV liegen.^[64] Im Gegensatz dazu weist das Spektrum des Monolayers nur einen Sauerstoff-Peak auf. Dies lässt darauf schließen, dass drei gleichwertige Sauerstoffe vorliegen, was wiederum darauf hin deutet, dass ein tridentater Anbindungsmechanismus vorliegt.

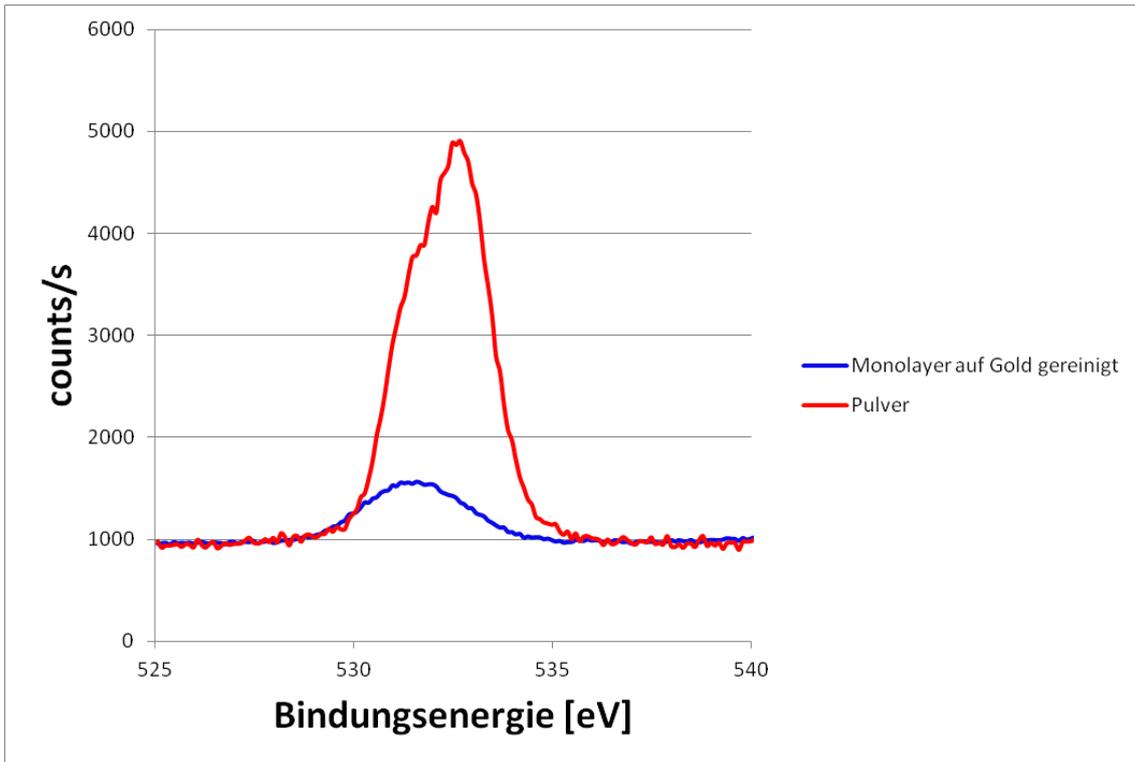


Abbildung 25 Vergleich der O_{1s}-Peaks der XPS-Spektren von Tetracyclphosphonat in Pulverform und als Monolayer.

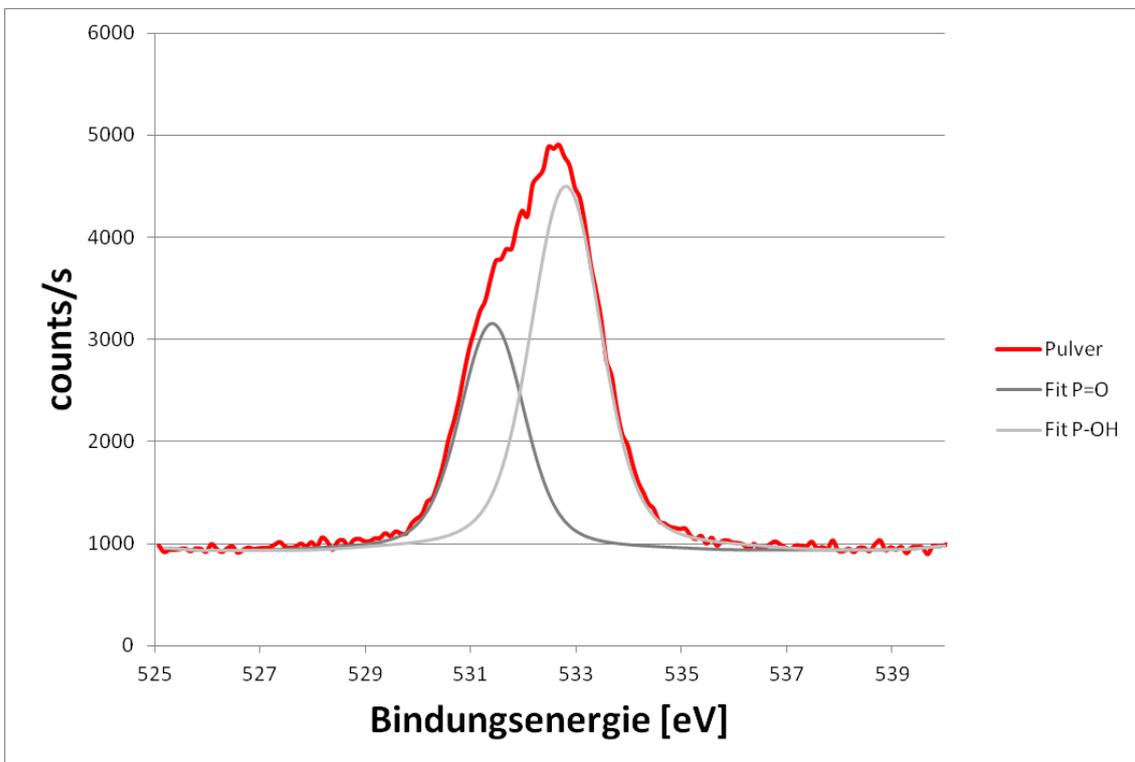


Abbildung 26 Darstellung des O_{1s}-Peaks des XPS-Spektrums von Tetracyclphosphonat in Pulverform.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob bei dem nach der Adsorption durchgeführten Tempersschritt eine Kondensation der Phosphonate (siehe Abbildung 27) auftritt. Die Phosphonate wurden in Pulverform beziehungsweise in flüssiger Form (Vinylphosphonat) jeweils in Kristallisierschalen überführt und für mehrere Stunden bei 90 °C in den Trockenschrank gestellt. Anschließend wurden IR-Spektren der temperaturbehandelten Substanzen, als auch der Ausgangstoffe aufgenommen.

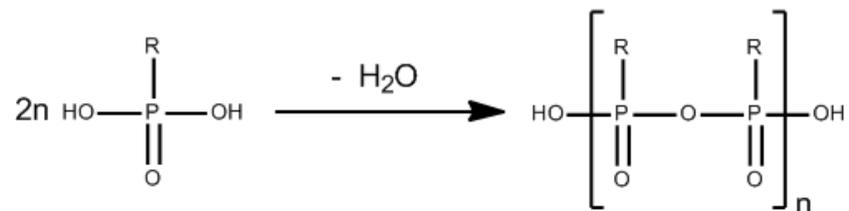


Abbildung 27 Reaktionsschema der Kondensation von Phosphonaten.

In den nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 28, Abbildung 29, Abbildung 30) werden die erhaltenen IR-Spektren gegenübergestellt. Bei Kondensation der Phosphonate sollte sich eine P-O-P Bindung ausbilden, welche im IR-Spektrum zu sehen sein sollte; ein Peak bei 1025-870 cm⁻¹, ein breiter Peak bei 945-925 cm⁻¹ und ein schwacher Peak bei 700 cm⁻¹.^[68] Dies ist bei allen der drei Substanzen nicht der Fall. Die Spektren von getemperten und nicht temperaturbehandelten Phosphonaten zeigen keine nennenswerten Unterschiede.

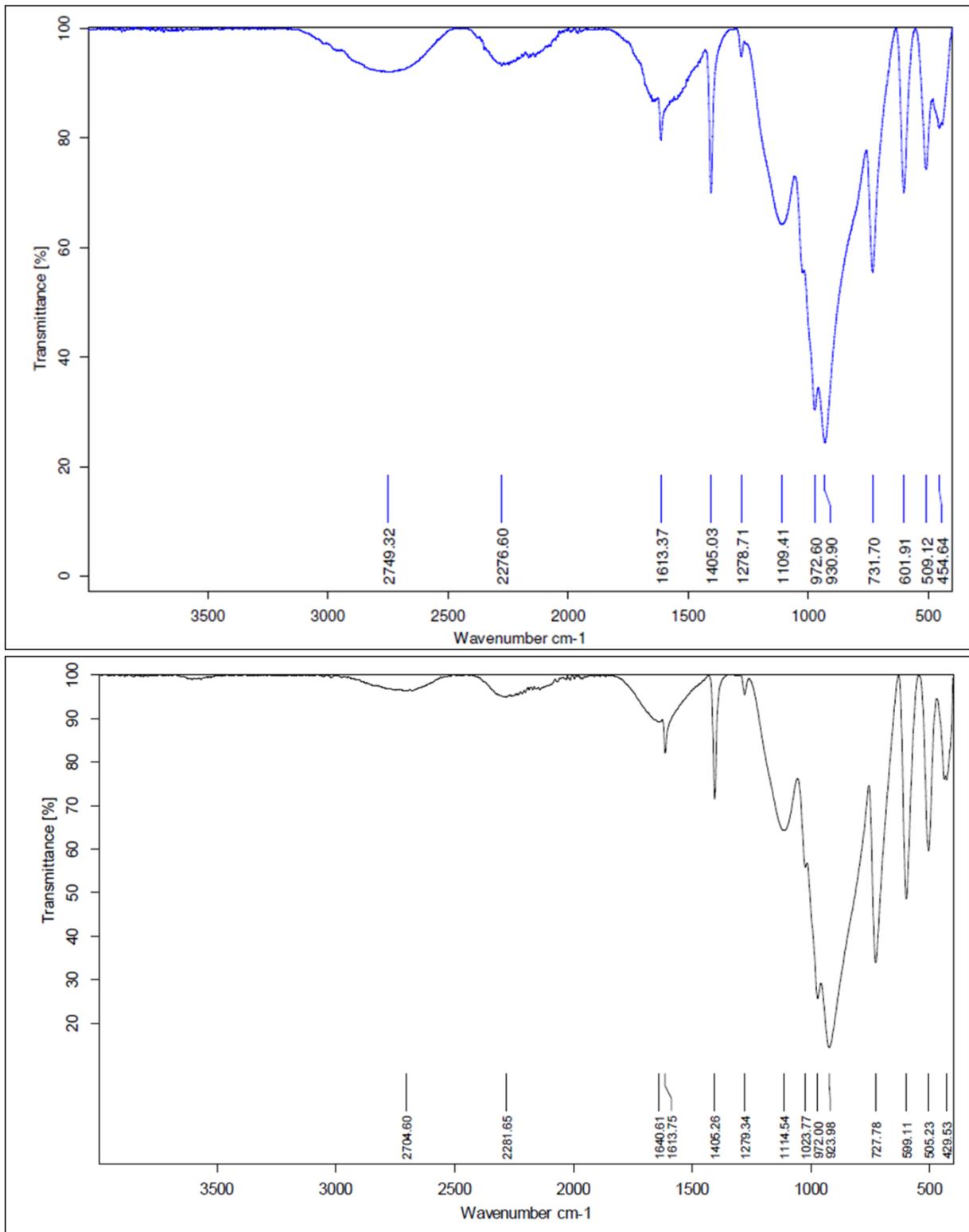


Abbildung 28 Vergleich der IR-Spektren von Vinylphosphonat; **unbehandelt (oben)** und getempert (unten).

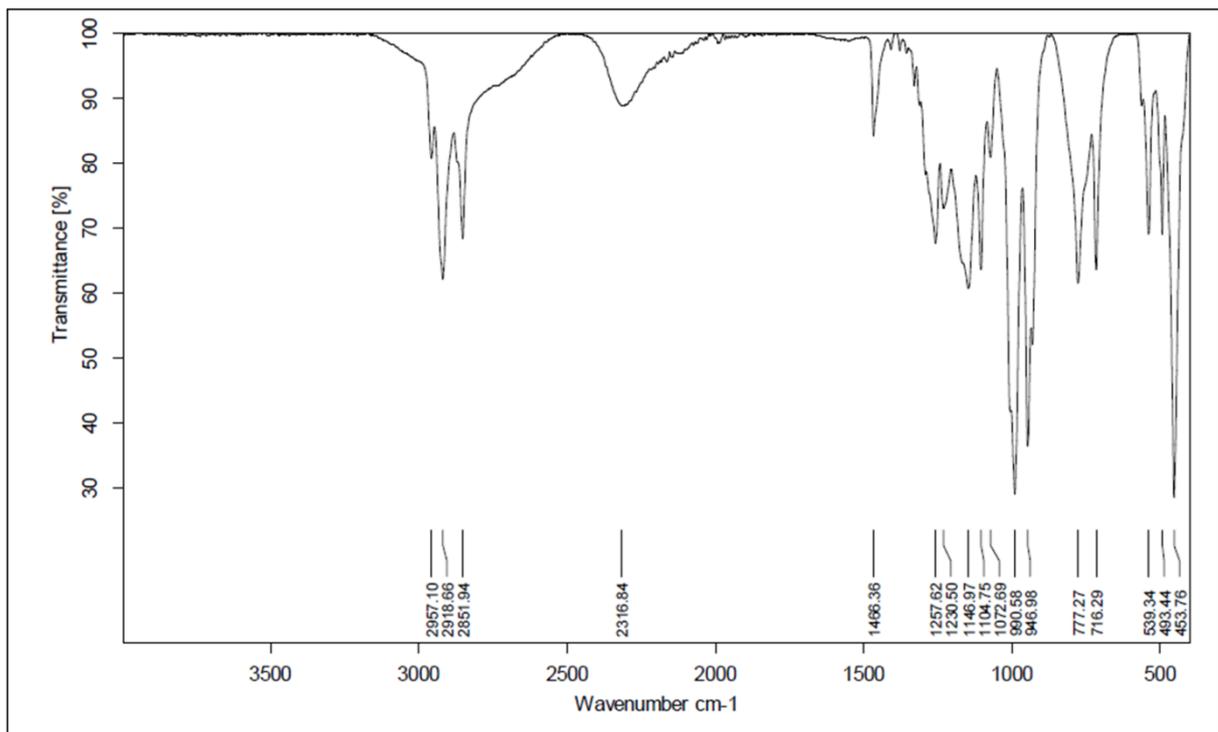
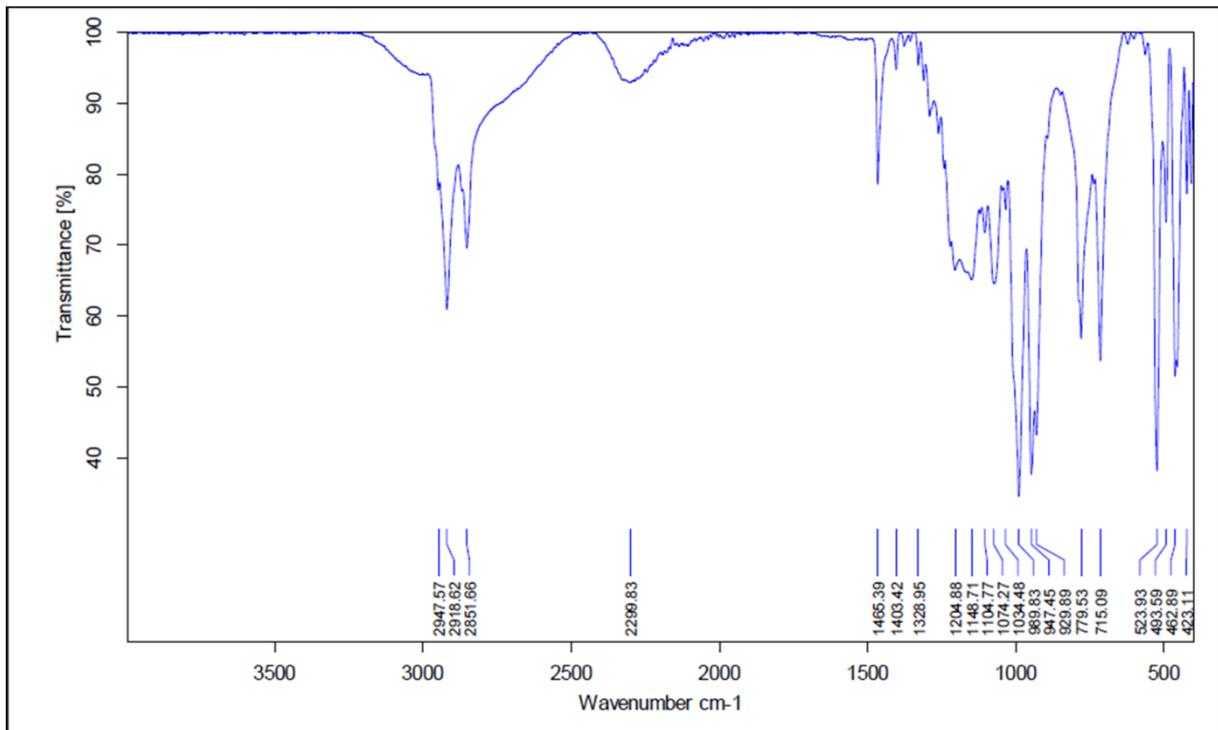


Abbildung 29 Vergleich der IR-Spektren von Octylphosphonat; **unbehandelt (oben)** und getempert (unten).

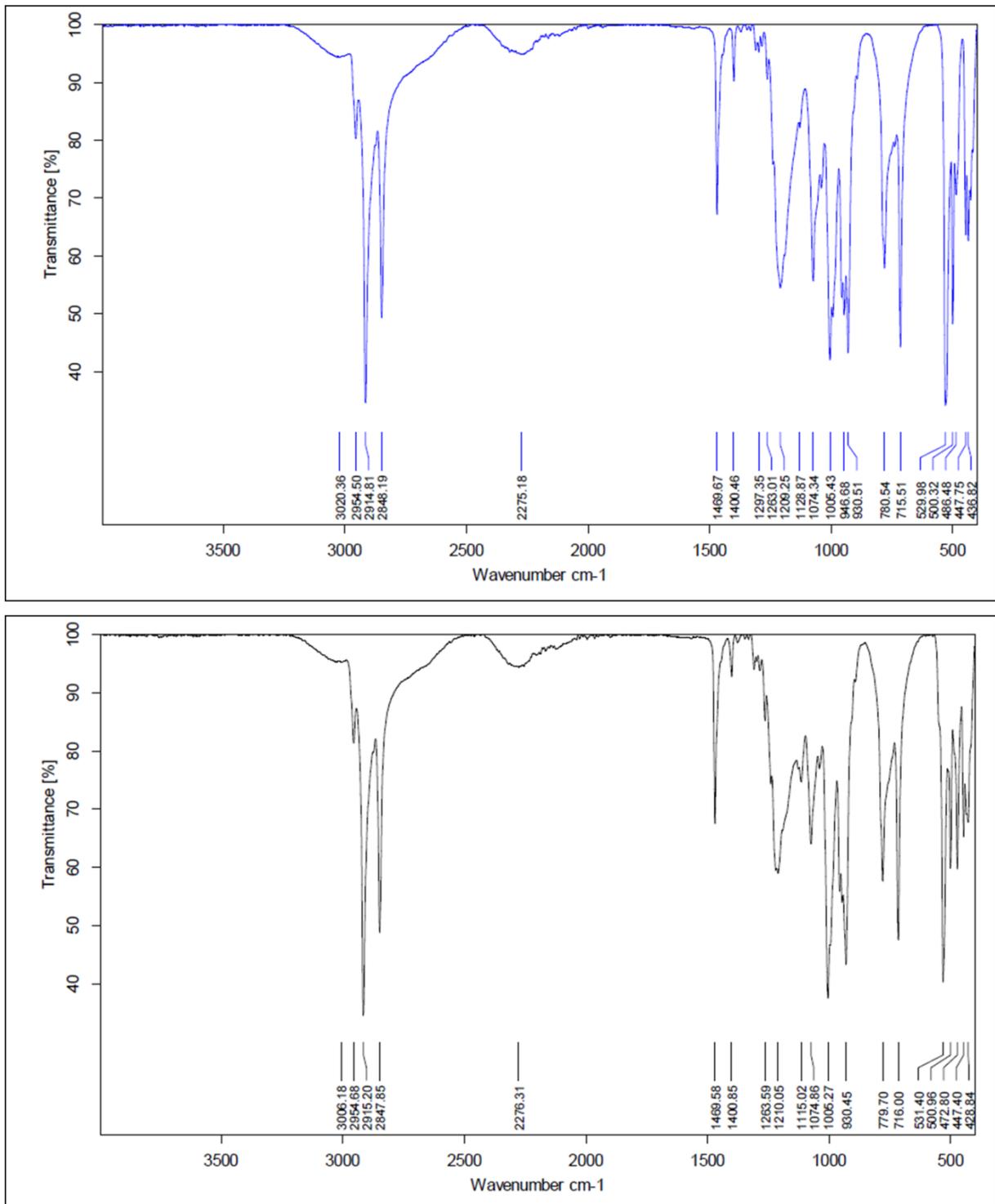


Abbildung 30 Vergleich der IR-Spektren von Tetradecylphosphonat; **unbehandelt (oben)** und getempert (unten).

In Tabelle 4 sind die charakteristischen Banden für die Verbindungen aufgelistet. Die Zuordnung erfolgte nach *Infrared Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts* von George Socrates (Wiley, 1998, Second Edition). Bei Tetradecyl- und Octylphosphonat ist die charakteristische Bande für die OH-Funktionalität von den asymmetrischen und

symmetrischen Streckschwingungen der CH₂ und CH₃ Gruppen überlagert und daher nicht in der Tabelle angeführt.

Tabelle 4 Zuordnung der Banden der IR-Spektren von den vermessenen Phosphonaten und Vergleich von getemperten und unbehandelten Proben.

Wellenzahl [cm ⁻¹]						Beschreibung Schwingung
Vinylphosphonat		Octylphosphonat		Tetradecylphosphonat		
<i>getempert</i>	<i>unbehandelt</i>	<i>getempert</i>	<i>unbehandelt</i>	<i>getempert</i>	<i>unbehandelt</i>	
-	-	2957,10	2947,57	2954,99	2954,50	CH ₃ asym str
-	-	2918,66	2918,62	2915,22	2914,81	CH ₂ asym str
-	-	2851,94	2851,66	2847,84	2848,19	CH ₂ sym str
2704,06	2749,32	-	-	-	-	OH str (P-OH)
2281,65	2276,60	2316,44	2299,83	2276,31	2275,18	OH str (P-OH)
1613,75	1613,37	-	-	-	-	C=C str (vinyl)
-	-	1465,36	1465,39	1469,58	1469,67	CH ₂ scissor
923,98	930,90	927,96	929,89	930,45	930,51	P-O str

Die minimalen Abweichungen der Positionen von charakteristischen Banden bei getemperten und nicht getemperten Phosphonaten sind auf Messungenauigkeiten zurückzuführen. Die Abweichungen bei den OH-Banden des Vinylphosphonats treten auf, weil die Banden generell sehr breit und eher flach sind. Im Bereich von 1500 bis 1700 cm⁻¹ zeigen sich Veränderungen der für die Vinyl-Gruppe charakteristischen Banden. Diese sind vermutlich auf eingelagertes Wasser zurückzuführen, welches Banden bei 1630-1600 cm⁻¹, verursacht durch die H-O-H Beugungsschwingung, aufweist.

Die in Zusammenarbeit mit Simon Leimgruber, Thomas Grießer, Gregor Trimmel und Stefan Spirk erhaltenen Ergebnisse sollen unter dem Titel *Phosphonate Monolayers on Gold* bei *Langmuir* eingereicht werden.

3.2 Protein Adsorption an kationischen Cellulose-Oberflächen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die unspezifische Proteinadsorption an Celluloseoberflächen durch kationische Modifizierung zu steuern. Dies sollte durch unterschiedliche Ladungsdichten der Substrate erreicht werden. Die Charakterisierung erfolgte mittels MP-SPRS und wurde durch QCM-D Daten aus einer Zusammenarbeit mit Dr. Tamilselvan Mohan ergänzt.

3.2.1 Adsorptionsstudie kationisch modifizierte Cellulose auf Cellulose

Die Adsorption von kationisch modifizierter Cellulose, Cellulose-4-[*N,N,N*-trimethylammonium]butyrat chlorid (bereitgestellt von Prof. Thomas Heinze, Jena), gezeigt in Abbildung 31, erfolgte auf Celluloseoberflächen, die durch Regenerierung von spin-coateten TMSC-Filmen hergestellt wurden. Das Experiment wurde mit einer Flussrate von $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ über einen Zeitraum von 30 min in einem Puffer mit einer Ionenstärke von 150 mM NaCl durchgeführt. Um später den Einfluss der unterschiedlichen Ladungsdichte des Substrats auf die Proteinadsorption zu zeigen, wurden Cellulosederivate mit Substitutionsgraden von 0,210 und 0,675 verwendet. Die Experimente wurden sowohl mit MP-SPRS und QCM-D durchgeführt.

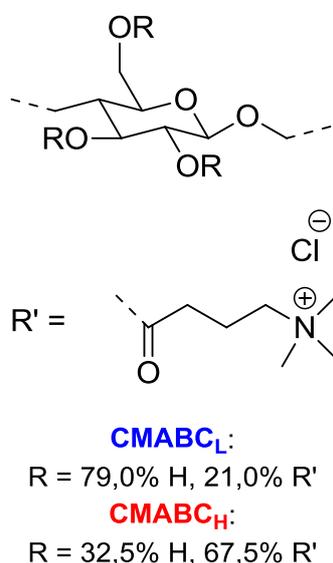


Abbildung 31 Struktur von Cellulose-4-[*N,N,N*-trimethylammonium]butyrat chloriden, wobei **CMABC_L** einen DS ($\text{NMe}_3^+\text{Cl}^-$) von 0,210 und **CMABC_H** einen DS ($\text{NMe}_3^+\text{Cl}^-$) von 0,675 kennzeichnet.

Zur exakten Bestimmung der Trockenmasse aus den MP-SPRS Adsorptionsstudien wäre die Verwendung der *deFeijter* Gleichung notwendig. Dies ist in diesem Falle aufgrund fehlender Kenntnis über das Brechungsindexinkrement nicht ausführbar. Auch die Anwendung der 2-

Medien-Methode ist nicht möglich. Diese setzt voraus, dass Medien eingesetzt werden, die sich in ihrem Brechungsindex stark unterscheiden, was bei Wasser und Puffer nicht der Fall wäre. Der Einsatz von Luft als zweitem Medium (zusätzlich zum verwendeten Puffer) ist nicht von Vorteil, weil eine komplette Trocknung der adsorbierten Schicht nach der Spülung mit Puffer nicht realisiert werden kann. Ist noch restliches Wasser in der Schicht, beeinflusst dieses das SPR-Signal und verfälscht das Ergebnis.

Die Sensogramme der Adsorption beider Cellulosederivate (Abbildung 32) zeigen deutlich, eine größere Menge adsorbierter Substanz auf der Celluloseoberfläche für das niedriger substituierte Cellulosederivat, als für das höher substituierte. Die Resonanzwinkelverschiebung beträgt im Mittel für CMABC_H $0,09^\circ$ bei 670 nm und $0,05^\circ$ bei 785 nm und für CMABC_L $0,20^\circ$ bei 670 nm und $0,13^\circ$ bei 785 nm.

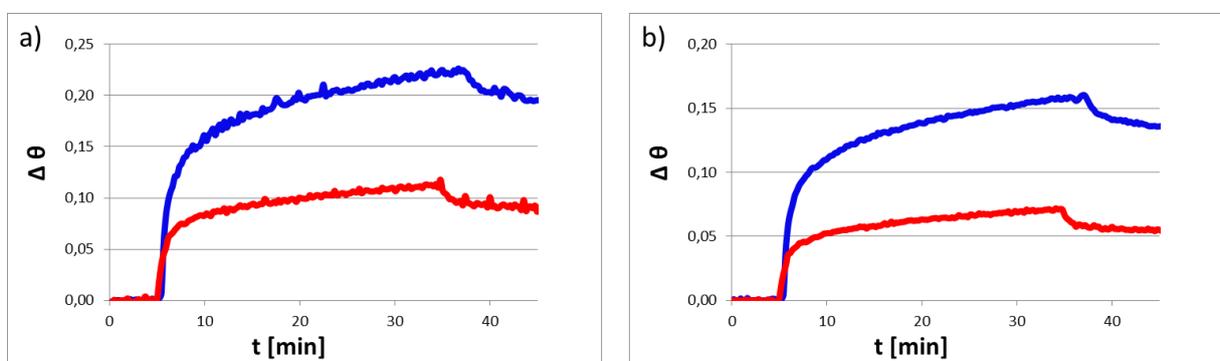


Abbildung 32 Sensogramme der mit MP-SPRS vermessenen Adsorption von CMABC_H und CMABC_L auf Cellulose bei a) 670 nm und b) 785 nm. Flussrate $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Konzentration $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Aus den QCM-D Messungen ist derselbe Trend wie bei den Sensogrammen aus der MP-SPRS ersichtlich (siehe Abbildung 33). Auffallend ist hierbei, dass sich die adsorbierten Filme während der Spülung beim Wechsel von Puffer auf Wasser je nach Substitutionsgrad unterschiedlich verhalten. Der CMABC_L Film weist eine geringe Frequenzänderung, jedoch eine große Änderung in der Dissipation auf. Der CMABC_H Film zeigt gegensätzliches Verhalten. Daraus lässt schließen, dass durch Reduzierung der Ionenstärke (durch Wechsel von Puffer zu Wasser) elektrostatische Kräfte zu tragen kommen, die vorher durch Gegenionen aufgehoben wurden. Diese führen bei CMABC_L zu einer Expansion des Films, hervorgerufen durch elektrostatische Repulsion zwischen den einzelnen Polymerketten. Bei CMABC_H führt derselbe Effekt aufgrund der höheren Ladungsdichte sogar zur Desorption schon adsorbierter Ketten.

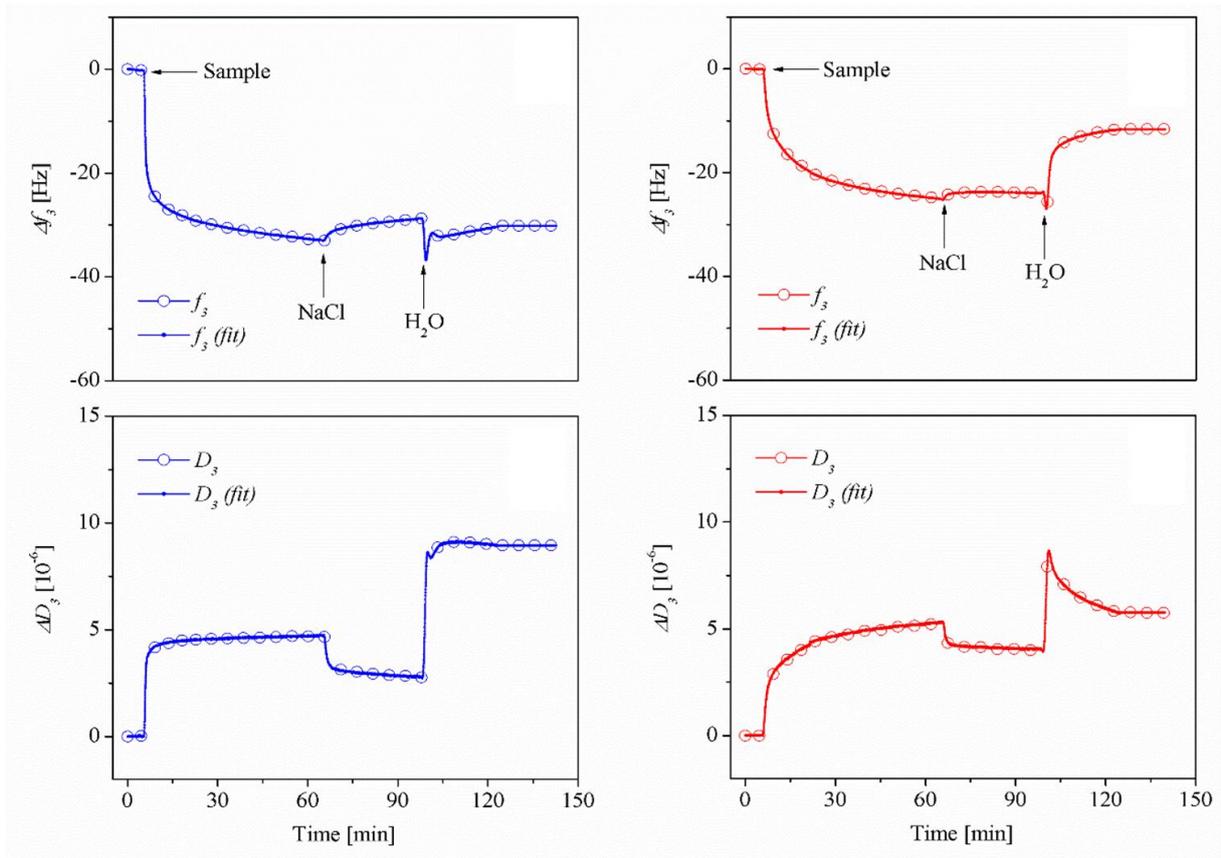


Abbildung 33 QCM-D Daten (Δf_3 , ΔD_3) der Adsorption von CMABC_L und CMABC_H auf Cellulose, bereitgestellt von Dr. Tamilselvan Mohan.

Die Feuchtmasse der adsorbierten Schichten konnte nicht mit der *Sauerbrey* Gleichung ermittelt werden, da diese nur für rigide Filme ($\Delta D = 0$) gilt. Bei beiden kationischen Cellulosederivaten tritt eine Änderung in der Dissipation auf, bei CMABC_H ist diese mit circa $7 \cdot 10^{-6}$ etwas geringer als bei CMABC_L mit circa $10 \cdot 10^{-6}$ (beide Werte für den 3. Oberton - ΔD_3). Daher musste viskoelastisches Modellierung angewandt werden. Mittels Voigt Modell^[47] wurden Oberflächenkonzentration $\Gamma_{\text{QCM-D}}$, Schichtdicken h_f , Scherviskositäten n_f und elastische Schermoduli μ_f , die in Tabelle 5 aufgetragen sind, bestimmt.

Tabelle 5 Ergebnisse aus dem viskoelastischen Modellierung der QCM-D Daten für die CMABC -Schichten auf Cellulose. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen.

	$\Gamma_{\text{QCM-D}}$ [$\text{mg} \cdot \text{m}^{-2}$]	h_f [nm]	$n_f \times 10^{-3}$ [$\text{N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$]	$\mu_f \times 10^4$ [$\text{N} \cdot \text{m}^{-2}$]
CMABC_L	$8,8 \pm 0,6$	$8,8 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,01$	$4,3 \pm 0,7$
CMABC_H	$2,9 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,05$	$2,6 \pm 0,3$

Generell ist anzumerken, dass die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Cellulosederivaten und der negativ geladenen Celluloseoberfläche (ζ -Potential:

-13,5 bis -17,7 mV im pH-Bereich von 4,7 bis 7,2)^[69] für CMABC_H größer sein sollten als für CMABC_L. Ein Grund für die bessere Adsorption von CMABC_L ist die Einwirkung der Löslichkeit, die aufgrund der geringeren Ladungsdichte für CMABC_L niedriger ist und somit die Adsorption begünstigt.^[70,71,72] Zudem ist der Einfluss der Konformation des Polymers zu beachten. Verursacht durch die hohe Ionenstärke (150 mM NaCl) nehmen die Cellulosederivate eine aufgewickelte Struktur an. Die Gegenwart von Elektrolyten kompensiert die Abstoßung zwischen den gleich geladenen Segmenten des Polymers. Außerdem kompensiert eine hohe Ionenstärke die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen kationischem Adsorbat und negativ geladener Celluloseoberfläche. Zusätzlich spielt der Effekt der konformellen Stabilisation des Adsorbats durch die Oberfläche eine gewisse Rolle. Diese konformelle Stabilisation ist geringer für Substanzen mit einem hohen Substitutionsgrad, da diese sterischen Druck ins System einbringen und somit schlechter adsorbieren.^[71]

Zusätzlich wurden die Oberflächen vor und nach der Adsorption mittels AFM charakterisiert (siehe Abbildung 34). Es ist ein klarer Unterschied in der Morphologie zwischen der Celluloseoberfläche und den kationisierten Oberflächen zu erkennen. Die AFM-Bilder der Cellulosederivatoberflächen weisen Aggregate auf, die als gewickelte Polymere interpretiert werden können. Die Rauigkeit der Celluloseoberfläche ist mit 2,4 nm höher als die der kationisierten Oberflächen, CMABC_L 1,6 nm, CMABC_H 1,4 nm.

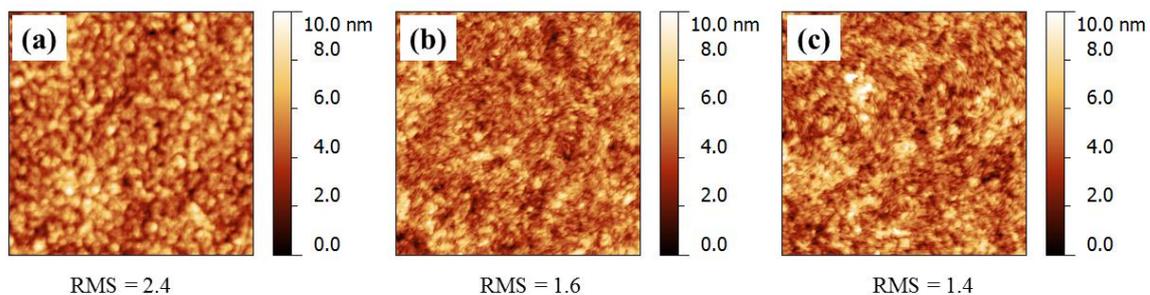


Abbildung 34 AFM Bilder und Rauigkeit von a) Cellulose, b) CMABC_L, c) CMABC_H. Bildgröße 1 x 1 μm^2 .

3.2.2 Adsorptionsstudie FITC-BSA auf kationisch modifizierten Celluloseoberflächen

Zur Untersuchung der unspezifischen Proteinadsorption an den kationisierten Celluloseoberflächen wurden Lösungen von fluoreszenzmarkiertem Rinderserumalbumin (FITC-BSA) mit einer Konzentration von 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ verwendet. BSA ist ein weitgehend akzeptierter Marker für unspezifische Protein-Adsorption. Die fluoreszenzmarkierte Variante erlaubt eine zusätzliche Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Adsorption

wurde bei einer Flussrate von $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ für 30 min bei drei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Ionenstärke der Puffer betrug 10mM Acetat beziehungsweise Phosphat und zusätzlich 100mM NaCl. Um einen Vergleichswert zu erhalten, wurden die Adsorptionsstudien auch auf nicht modifizierten Celluloseoberflächen durchgeführt.

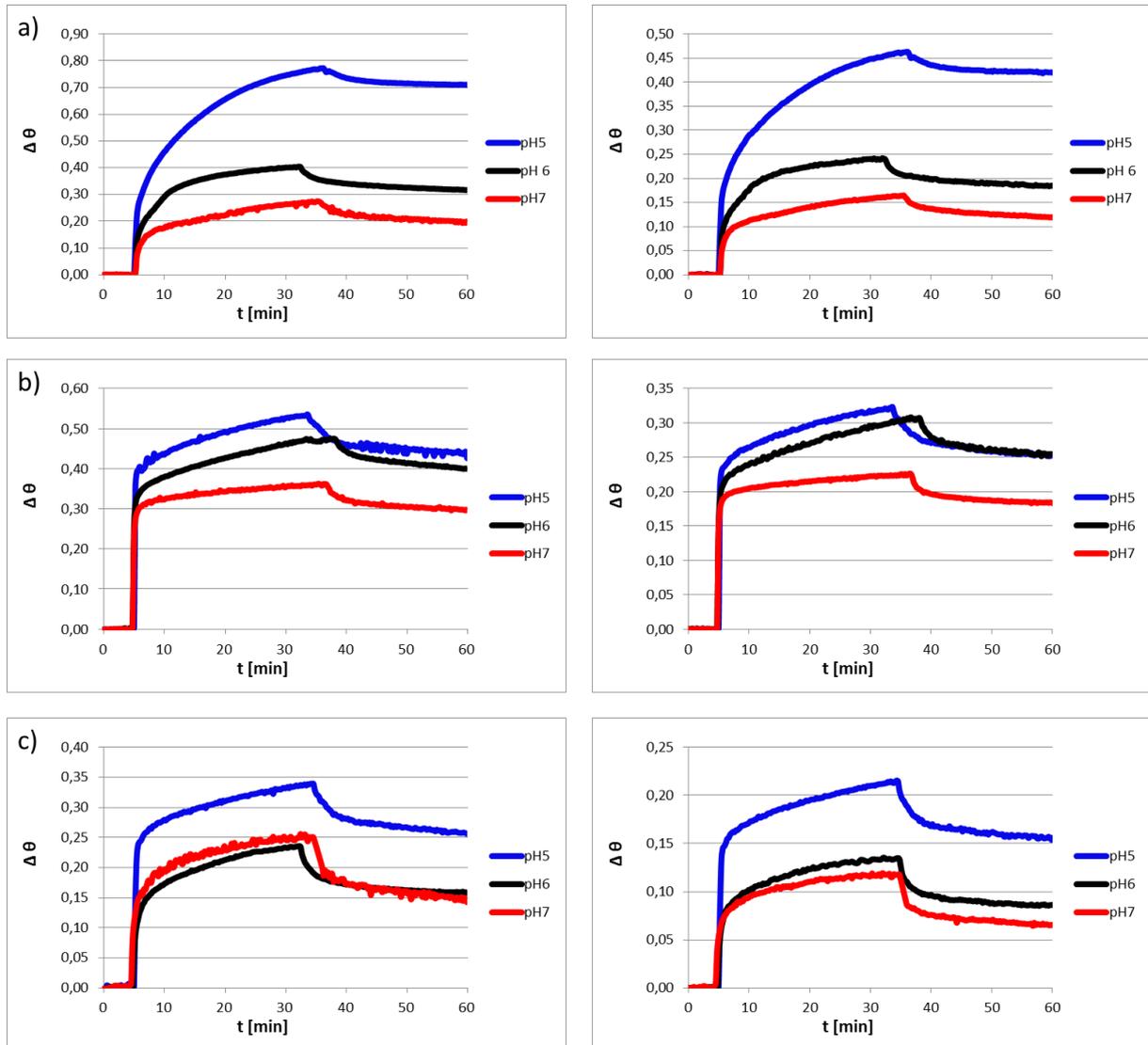


Abbildung 35 Repräsentative Sensogramme der mit MP-SPRS untersuchten Adsorption von FITC-BSA auf a) CMABC_H , b) CMABC_L , c) Cellulose, (links 670 nm, rechts 785 nm), Start der Adsorption bei 5 min, Start der Spülung bei 35 min. Flussrate $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Konzentration $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Aus den Sensogrammen wurde die Resonanzwinkelverschiebung abgelesen und mittels *deFeijter* Gleichung (22) die Oberflächenkonzentration bestimmt. Das Brechungsindexinkrement für BSA in wässrigen Puffersystemen beträgt $0,187 \text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$.^[73] Der $k\cdot d_p$ Wert wurde vom Gerätehersteller erhalten und beträgt ungefähr $1,09\cdot 10^{-7} \text{ cm}/^\circ$ für 670 nm und $1,90\cdot 10^{-7} \text{ cm}/^\circ$ für 785 nm.

Die erhaltenen Werte sind in

Tabelle 6 dargestellt. Diese können mit den Daten aus QCM-D Messungen in Tabelle 7, die nach gleicher Vorgehensweise wie die MP-SPRS Adsorptionsstudien durchgeführt wurden, verglichen werden (siehe Abbildung 36).

Tabelle 6 Mittels MP-SPRS bestimmte Menge an adsorbiertem FITC-BSA [$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$] und Vergleich mit Literaturwerten^[4]. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen.

	Cellulose	CMABC_L	CMABC_H	Chitosan	CMC
pH 5	1,6 ± 0,2	2,65 ± 0,11	3,90 ± 0,38	3,5	2,0
pH 6	0,8 ± 0,1	2,15 ± 0,26	1,98 ± 0,50	2,5	0,4
pH 7	0,6 ± 0,1	1,69 ± 0,12	1,73 ± 0,24	1,8	0,3

Die Adsorptionsstudien zeigen, dass die Adsorption von FITC-BSA größer auf den kationisch modifizierten Oberflächen als auf reinen Celluloseoberflächen ist. Dies liegt an der elektrostatischen Anziehung zwischen negativ geladenem Protein und positiv geladener Oberfläche. Die verminderte Adsorption auf Celluloseoberflächen resultiert aus elektrostatischer Repulsion durch die negative Ladung der Cellulose. Zudem ist die Celluloseoberfläche hydrophil und somit komplett hydratisiert, was zu einer Konkurrenz zwischen Proteinmolekülen und Wassermolekülen führt. Die Proteinmoleküle müssen um zu adsorbieren die Wassermoleküle verdrängen. Die Werte der Proteinmengen für Cellulose stimmen mit aus der Literatur bekannten Werten überein.^[4] Außerdem kann ein Vergleich zwischen der Proteinadsorption auf Cellulose und anderen Polysaccharidoberflächen gemacht werden. So ist beispielsweise die Proteinadsorption auf den negativ geladenen Carboxymethylcelluloseoberflächen (CMC) ähnlich gering wie auf den ebenfalls negativ geladenen nicht modifizierten Celluloseoberflächen. Wohingegen die adsorbierten Mengen an Protein auf den kationischen Celluloseoberflächen vergleichbar sind mit denen, die auf positiv geladenem Chitosan bestimmt wurden. Es ist anzumerken, dass die Werte aus der Literatur bei derselben Flussrate ($100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) und Temperatur ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), jedoch bei anderer Konzentration ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) und über längere Zeit (60 min) gemessen wurden^[4]

Im Allgemeinen hat die Rauigkeit einen begünstigenden Einfluss auf die Adsorption. Jedoch ist ein großer Effekt der Oberflächenrauigkeit in den gezeigten Studien auszuschließen, weil trotz höherer Rauigkeit von CMABC_L weniger Protein auf besagten Oberflächen adsorbiert, als auf CMABC_H Oberflächen. Ein höherer Substitutionsgrad bringt eine größere Ladungsdichte mit sich, was die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Protein steigert. Jedoch ist anzumerken, dass diese Effekte, beruhend auf gegensätzlichen Ladungen von Adsorbat und Sorbens, durch die hohe Ionenstärke limitiert werden. Alle Ladungen werden von kleinen, beweglichen Gegenionen abgeschirmt.

Ein weiterer Faktor, der den Adsorptionsprozess beeinflusst, ist die Entropie. Adsorption wird begünstigt durch das Freiwerden von an der Oberfläche adsorbierten Wassermolekülen und Gegenionen. Grundsätzlich gilt, je höher die Ladungsdichte der Oberfläche, desto mehr Gegenionen und Wassermoleküle sind an der Oberfläche angelagert und desto mehr können bei der Adsorption freigelassen werden. Daher ist der Entropiegewinn bei der Adsorption an stark geladenen Oberflächen größer als bei schwach geladenen. Jedoch ist aus den QCM-D Daten ersichtlich, dass der weniger geladene, dickere CMABC_L Film eine höhere Quellung als der CMABC_H Film aufweist. Er verhält sich wie ein gequollenes Hydrogel, das aufgrund sterischer Abstoßung resistenter gegen Proteinadsorption ist. Der CMABC_H Film ist weniger hydratisiert und kann zusätzlich durch die höhere Ladungsdichte mehr beziehungsweise weitreichendere elektrostatische Anziehungskräfte auf das Protein ausüben.

Aufgrund des Freiwerdens von Gegenionen und Wassermolekülen von der Oberfläche können strukturelle Veränderungen am Protein stattfinden. Dies kann in den Sensogrammen in Abbildung 35 beobachtet werden. Die Adsorption auf CMABC_H braucht länger bis zum Erreichen eines Adsorptionsplateaus als auf CMABC_L.

Generell ist die Proteinadsorption besonders hoch bei pH 5 nahe des Isoelektrischen Punktes von BSA (IP = 4,7). Dies kann auf die verminderte Löslichkeit des Proteins durch die neutrale Gesamtladung zurückgeführt werden. Über dem Isoelektrischen Punkt ist BSA durch Deprotonierung der Carboxylgruppen negativ geladen und somit löslicher, was eine verminderte Adsorption mit sich zieht.

Tabelle 7 Mittels QCM-D bestimmte Menge an adsorbiertem FITC-BSA [$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$]. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen.

	Cellulose	CMABC_L	CMABC_H
pH 5	20,1 ± 0,8	35,2 ± 0,2	42,5 ± 0,8
pH 6	2,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	4,9 ± 0,5
pH 7	1,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1	3,6 ± 0,2

Aus den QCM-D Daten lassen sich gleiche Trends, wie aus der Bestimmung der unspezifischen Proteinadsorption mittels MP-SPRS, ablesen. Die Adsorption ist bei pH 5 am höchsten. Auch hier zeigt sich die verminderte Proteinadsorption auf den nicht modifizierten Celluloseoberflächen. Die adsorbierte Proteinmenge ist auf CMABC_H am größten.

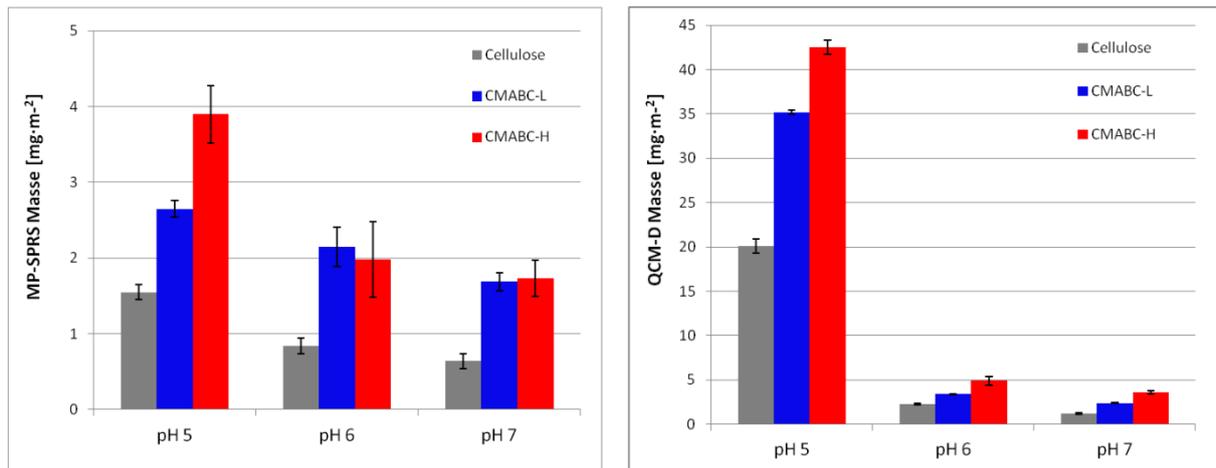


Abbildung 36 Vergleich der adsorbierten Mengen an Protein bestimmt durch MP-SPRS und QCM-D. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen.

Aus Kombination der Daten von MP-SPRS und QCM-D wurde der Wassergehalt der adsorbierten Proteinschichten (Tabelle 8) nach Gleichung (29) errechnet.

Tabelle 8 Wassergehalt [%] FITC-BSA-Schichten auf Cellulose und Cellulosederivaten.

	Cellulose	CMABC _L	CMABC _H
pH 5	92 ± 1	92 ± 1	91 ± 1
pH 6	63 ± 2	37 ± 6	60 ± 7
pH 7	47 ± 4	30 ± 2	52 ± 4

Mit abnehmenden pH-Wert nimmt der Wassergehalt der adsorbierten Proteinschichten zu. Bei pH 5 liegt der Wassergehalt bei allen untersuchten Oberflächen bei 91-92 %. Wie schon erwähnt, befindet sich der Isoelektrische Punkt des BSA bei pH 4,7. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Proteins wird dieses, sobald es in Kontakt mit der Oberfläche tritt, samt umgebendem Wasser ausgefällt, was zu hohen Mengen an eingelagertem Wasser führt. Die Ladungsdichte des unterliegenden Substrats scheint keinen Effekt auf den Wassergehalt zu haben.

Bei den anderen pH-Werten hingegen spielt die Beschaffenheit der unterliegenden Schicht eine Rolle für die Menge an gekoppeltem Wasser. Die Wassergehalte sind für auf Cellulose und CMABC_H adsorbierte Proteinschichten mit 63 % bzw. 60 % bei pH 6 und 47 % bzw. 52 % bei pH 7 ähnlich, die von denen auf CMABC_L weichen mit 37 % bei pH 6 und 30 % bei pH 7 deutlich davon ab. Die beobachteten Ergebnisse lassen sich teilweise durch die hohe Rauigkeit der Celluloseoberflächen erklären. Dadurch ist die Oberfläche besser zugänglich und mehr Wechselwirkungen zum Adsorbat sind möglich. In den Poren der Celluloseoberflächen können sich mehr Wassermoleküle einlagern, als bei den kationisch modifizierten Oberflächen. Der Unterschied in den Wassergehalten von CMABC_H und

CMABC_L kann auf starke hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Protein und kationischer Cellulose zurückgeführt werden. Diese können nach einer strukturellen Änderung der Proteine auftreten, die sich durch Kontaktwinkelmessungen beobachten lässt.

Die Kontaktwinkelmessungen (Tabelle 9) zeigen relativ hohe Werte für Proteinoberflächen bei FITC-BSA auf den kationisch modifizierten Substraten. Vergleichswerte für Wasserkontaktwinkel von BSA-Schichten auf Cellulose liegen bei 20-68° je nach pH-Wert.^[74,75]

Tabelle 9 Kontaktwinkel [°] (Wasser) der FITC-BSA-Schichten auf Cellulose und Cellulosederivaten.

	Cellulose	CMABC _L	CMABC _H
pH 5	44 ± 1	88 ± 1	102 ± 2
pH 6	23 ± 2	58 ± 2	70 ± 2
pH 7	12 ± 2	50 ± 1	61 ± 1

In wässrigen Lösungen befindet sich normalerweise der hydrophobe Teil des Proteins im Inneren des Moleküls. Durch konformelle Änderungen und Denaturierung können diese Teile nach außen treten. Solche konformellen Änderungen treten häufig bei Adsorption auf und sind thermodynamisch begünstigt. Außerdem ist der Effekt der Ladungskomplexation zu berücksichtigen. Die negative Ladung des Proteins wird durch die positive Ladung der Oberfläche ausgeglichen, was zu einer Erhöhung der Hydrophobizität, also zu einem höheren Kontaktwinkel führt. Dieser Effekt ist bei CMABC_H größer als bei CMABC_L, da es eine höhere Ladungsdichte aufweist. Zusätzlich ist zu beachten, dass die Proteinbeladung der Oberflächen bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich ist und dies auch Einfluss auf den Kontaktwinkel hat. Eine Erhöhung des Kontaktwinkels durch die Fluoreszenzmarkierung konnte durch Vermessung von nicht fluoreszenzmarkiertem BSA ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10 Kontaktwinkel [°] (Wasser) von BSA-Schichten auf Cellulose und Cellulosederivaten

	Cellulose	CMABC _L	CMABC _H
pH 5	42 ± 2	87 ± 1	100 ± 1
pH 6	20 ± 2	57 ± 2	71 ± 1
pH 7	14 ± 1	52 ± 1	63 ± 2

Aus der Oberflächenkonzentration und den Kenntnissen über die Konformation und Größe des Proteins kann die Anzahl der adsorbierten Schichten näherungsweise bestimmt werden. BSA ist ein Protein bestehend aus 583 Aminosäureeinheiten mit einem Molekulargewicht von 66.463 Da. Es nimmt in wässrigen Lösungen die Form eines Rotationsellipsoids ein mit

Achsenlängen von 14 nm und 4 nm.^[76] Die Berechnung wurde anhand nachstehender Formeln durchgeführt unter der Vereinfachung, dass BSA eine rechteckige Grundfläche einnimmt. Es wurde errechnet wie viel Fläche ein Molekül BSA benötigt. Die adsorbierte Masse an BSA pro Fläche wurde auf die entsprechende Anzahl an Moleküle umgerechnet. Anschließend wurde der Quotient beider Werte gebildet. Ergebnisse sind in Tabelle 11 angeführt.

$$A_{BSA} = 14 \text{ nm} \times 4 \text{ nm} = 56 \text{ nm}^2 = 56 \cdot 10^{16} \text{ m}^2 \quad (33)$$

$$MK_{BSA} \text{ pro } m^2 = \frac{1}{A_{BSA}} = 1,78 \cdot 10^{16} \quad (34)$$

$$\Gamma_{BSA} [MK_{BSA} \cdot m^{-2}] = \Gamma_{BSA} [mg \cdot m^{-2}] \times 10^{-3} \times 6,02241 \cdot 10^{23} \times \frac{1}{MG_{BSA}} \quad (35)$$

$$N_{Schichten} = \frac{MK_{BSA} \text{ pro } m^2}{\Gamma_{BSA} [MK_{BSA} \cdot m^{-2}]} \quad (36)$$

wobei A_{BSA} für die Fläche, die ein Molekül BSA benötigt, MK_{BSA} für Molekül BSA, Γ_{BSA} für die Oberflächenkonzentration des BSA, MG_{BSA} für das Molekulargewicht von BSA und $N_{Schichten}$ für die Anzahl an BSA-Schichten steht.

Tabelle 11 Anzahl adsorbierter FITC-BSA-Schichten auf Cellulose und Cellulosederivaten.

	Cellulose	CMABC _L	CMABC _H
pH 7	0,32	0,86	0,88
pH 6	0,43	1,09	1,00
pH 5	0,79	1,34	1,98

Laut den oben angeführten Berechnungen bilden sich auf den nicht modifizierten Celluloseoberflächen nur Sub-Monolayer an Protein. Bei pH 6 liegt auf den kationisierten Oberflächen ein Monolayer, bei pH 7 ein Sub-Monolayer vor. Ein Bilayer bildet sich nur bei pH 5 auf CMABC_H. In der Literatur wird beschrieben, dass bei der Adsorption von BSA, je nachdem wie konzentriert die Lösung aus der adsorbiert wird ist, eine unterschiedliche Anzahl an Schichten aufgebaut und die Orientierung des Proteins an der Oberfläche beeinflusst wird. Je höher die Proteinkonzentration, desto mehr Schichten werden adsorbiert und desto eher tritt eine *end-on* Orientierung auf. Eine *side-on* Orientierung wird bei BSA-Konzentrationen bis ungefähr 5 mg·ml⁻¹ begünstigt. Wie aus den erhaltenen

Ergebnissen ersichtlich, spielt die Menge an adsorbierten Teilchen die größte Rolle für die Anzahl der aufgebauten Schichten, jedoch die Orientierung der Teilchen ergibt sich aus der Konzentration der Proteinlösung, wobei anzumerken ist, dass BSA ein weiches Protein ist, das während des Adsorptionsvorgangs aufgrund von *Unfolding* oder Denaturierung etwas abgeflacht oder gestaucht werden kann.^[74]

Es wurden Fluoreszenzmikroskopische Messungen von den nicht modifizierten und den kationischen Celluloseoberflächen nach der Adsorption von FITC-BSA vorgenommen. Diese sind in Abbildung 37 dargestellt und zeigen die Verteilung von FITC-BSA auf den besagten Substraten. Es konnten dieselben Trends bezüglich adsorbierter Menge an FITC-BSA wie bei QCM-D und MP-SPRS festgestellt werden. Eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte jedoch nicht.

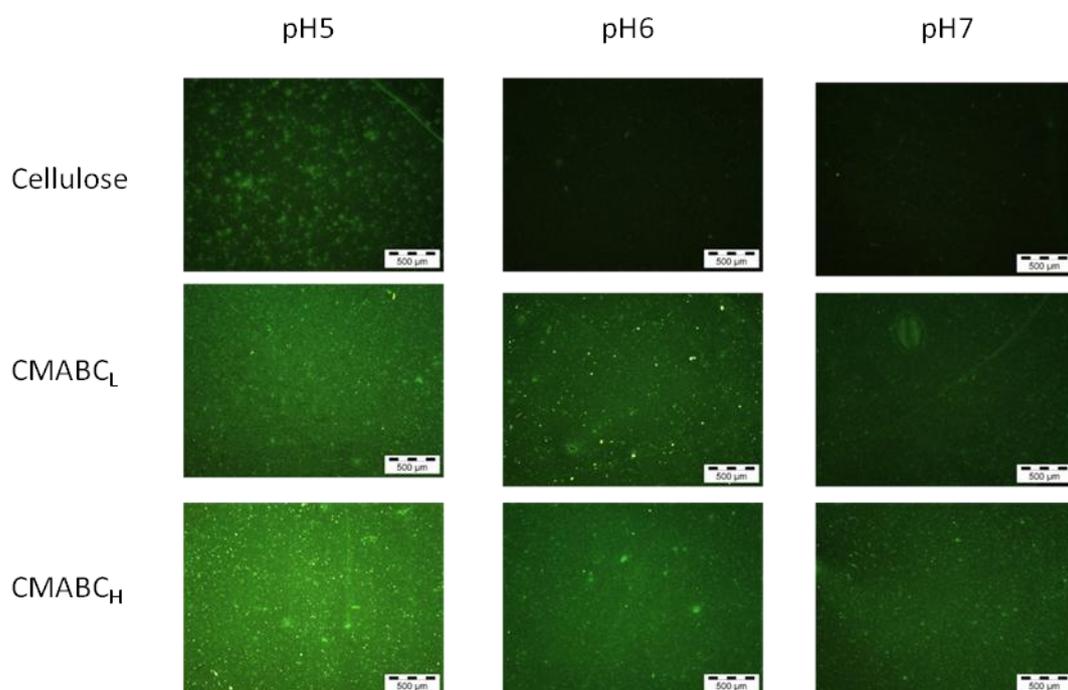


Abbildung 37 Fluoreszenz-Bilder der mit FITC-BSA beladenen Oberflächen, bereitgestellt von Dr. Tamilselvan Mohan.

3.2.3 Proteinadsorption und Quantifizierung auf strukturierten kationischen Celluloseoberflächen

Im Rahmen einer gemeinsamen Publikation mit Dr. Tamilselvan Mohan wurde die Proteinadsorption auf strukturierten kationischen Celluloseoberflächen untersucht und die Quantifizierung mittels Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden von ihm bereitgestellt und werden im Nachfolgenden besprochen.

Die strukturierten Oberflächen wurden durch Spin-Coating von TMSC auf COP-Slides und anschließender Regenerierung mit HCl zu Cellulose durch Abdeckung mit einer Aluminium

Maske mit quadratischen Löchern erhalten. Auf den strukturierten Celluloseoberflächen wurden die kationischen Cellulosederivate adsorbiert und diese dann mit Tetramethylrhodamin Isothiocyanat – Rinderserumalbumin (TRITC-BSA) beladen. Dies erfolgte mit TRITC-BSA Konzentrationen im Bereich von $0,001 - 1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ und bei verschiedenen pH-Werten (5, 6, 7). In diesem Experiment wurde ein anderes fluoreszenzmarkiertes Protein als bei den zuvor durchgeführten verwendet, da die Emissionswellenlänge von FITC-BSA im Gegensatz zu der von TRITC-BSA vom verwendeten Microarray Reader nicht entsprechend detektiert werden kann. Die Fluoreszenzintensität der mit TRITC-BSA beladenen Oberflächen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt und in Abhängigkeit der Konzentration aufgetragen (siehe Abbildung 39). Um dieses Ergebnis zu veranschaulichen, wurden die Fluoreszenzbilder rot koloriert (siehe Abbildung 38).

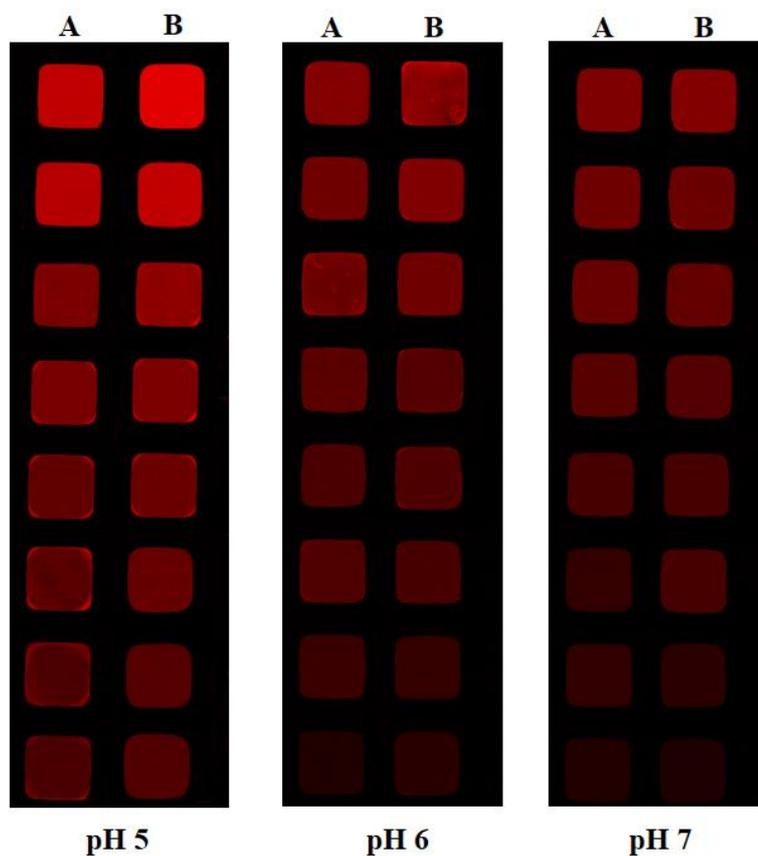


Abbildung 38 Mit kationisch modifizierter Cellulose ausgestattete COP-Slides inkubiert mit TRITC-BSA-Lösungen mit den Konzentrationen (1000, 500, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 und $0,001 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bei verschiedenen pH-Werten: A) CMABC_L , B) CMABC_H .

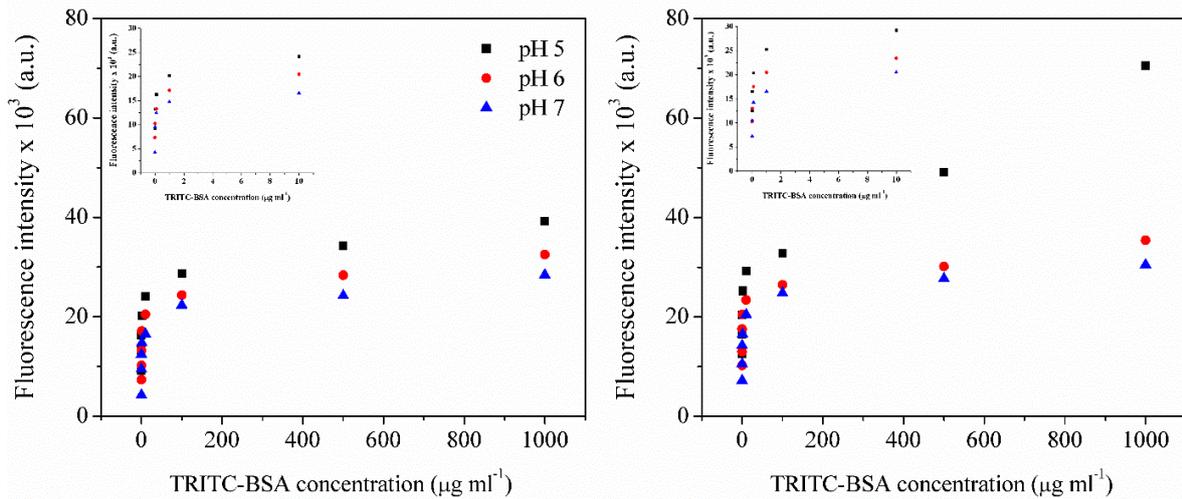


Abbildung 39 Fluoreszenzintensität von TRITC-BSA auf CMABC_L (links) und CMABC_H (rechts) beschichteten COP-Slides in Abhängigkeit der Konzentration bei verschiedenen pH-Werten.

Aus den Experimenten ist klar ersichtlich, dass innerhalb der Genauigkeit der Methode die Wechselwirkungskapazität von TRITC-BSA mit kationischen und nicht modifizierten Celluloseoberflächen ident ist mit dem von FITC-BSA. Die Cellulosepatches sind gleichmäßig mit TRITC-BSA bedeckt, jedoch zeigt sich an den Rändern ein minimaler Kaffeeringeffekt. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Beladung der Patches mit fluoreszenzmarkiertem Protein über einen Bereich von 15 pM bis 15 µM. Zudem ist ersichtlich, dass die Fluoreszenzintensitäten zu den Ergebnissen der MP-SPRS und QCM-D Messungen passen. Für eine direkte Quantifizierung wäre jedoch noch zusätzliche Kalibration notwendig, um ein mögliches Quenching der Fluoreszenz zu berücksichtigen.

Die in Zusammenarbeit mit Tamilselvan Mohan, Cíntia Salomão Pinto Zarth, Rupert Kargl, Stefan Köstler, Volker Ribitsch, Thomas Heinze, Stefan Spirk und Karin Stana-Kleinschek erhaltenen Ergebnisse wurden unter dem Titel *Triggering Protein Adsorption on Tailored Cationic Cellulose Surfaces* bei *Biomacromolecules* zur Publikation eingereicht.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Vorstudien zur Entwicklung von Biosensoren mit zwei unterschiedlichen Konzepten wurden mittels MP-SPRS erfolgreich durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Phosphonate auf den Goldoberflächen adsorbieren. Die ermittelten Dicken der adsorbierten Schichten korrelieren mit errechneten Moleküllängen, was auf eine Adsorption von Monolayern hindeutet. Die Charakterisierung der Monolayer erfolgte durch XPS und Kontaktwinkelmessungen. Die gewonnenen Erkenntnisse können zur Weiterentwicklung des Systems zu einem Biosensor eingesetzt werden. Die Modifikation des Monolayers mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) und anschließender Amid-Bindungsknüpfung kann durch Einsatz eines Phosphonats mit Carbonsäureester-Rest realisiert werden (siehe Abbildung 40).

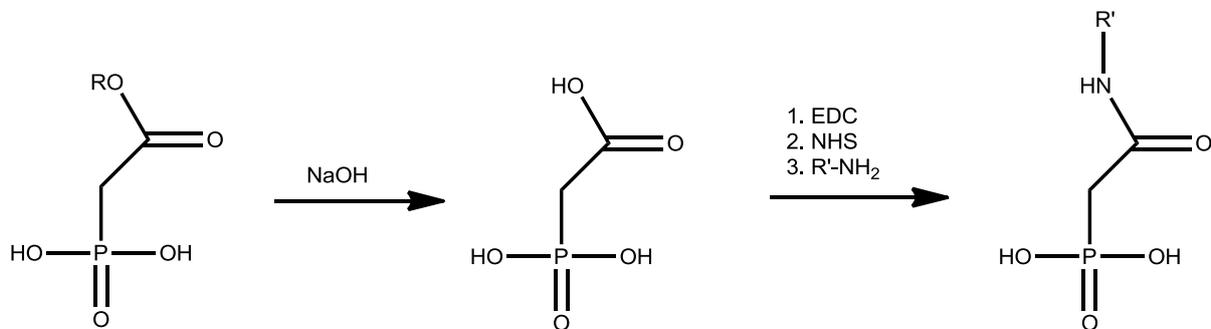


Abbildung 40 Darstellung der Modifikationsmöglichkeit von Phosphonat-Monolayern.

In der zweiten Vorstudie konnte die Kontrolle der unspezifischen Proteinadsorption, untersucht anhand von FITC-BSA, durch kationische Modifizierung von Celluloseoberflächen gezeigt werden. Des Weiteren wurde der Einfluss einer pH-Wert Änderung auf das Adsorptionsverhalten auf den funktionalisierten Oberflächen überprüft. Die Menge an adsorbiertem Protein ist bei pH 5, nahe des Isoelektrischen Punktes von BSA, am höchsten. Die unspezifische Proteinadsorption ist auf den kationisierten Oberflächen größer als auf nicht modifizierter Cellulose, und ist besonders hoch auf der Oberfläche mit der höheren Ladungsdichte. Zusätzlich wurde der Wassergehalt aus Kombination von MP-SPRS (Trockenmasse) und QCM-D (Feuchtmasse) Daten berechnet. Das untersuchte System eignet sich aufgrund mangelnder Spezifität nicht zum Einsatz in Biosensoren, jedoch kann BSA als *blocking agent* verwendet werden, sodass eine selektive Funktionalisierung von Celluloseoberflächen mit funktionellen Proteinen, wie Antikörpern, erfolgen kann.

5 Problemdiskussion Messungen MP-SPR-Spektrometer

In diesem Kapitel wird auf generelle Probleme bei der Messung mit dem SPR-Navi 200 von Bionavis, die während der experimentellen Arbeit aufgetreten sind, eingegangen.

Während der Durchführung eines Adsorptionsexperimentes wird, wie in Abbildung 41 gezeigt, die zu adsorbierende Flüssigkeit aus einem Gefäß über PEEK- und Silikonschläuche mittels peristaltischer Pumpe durch die Flusszelle, die auf den Sensor-Slide gepresst wird (Abbildung 42), über den Sensor-Slide gepumpt und dann in einem Abfallbehälter aufgefangen.

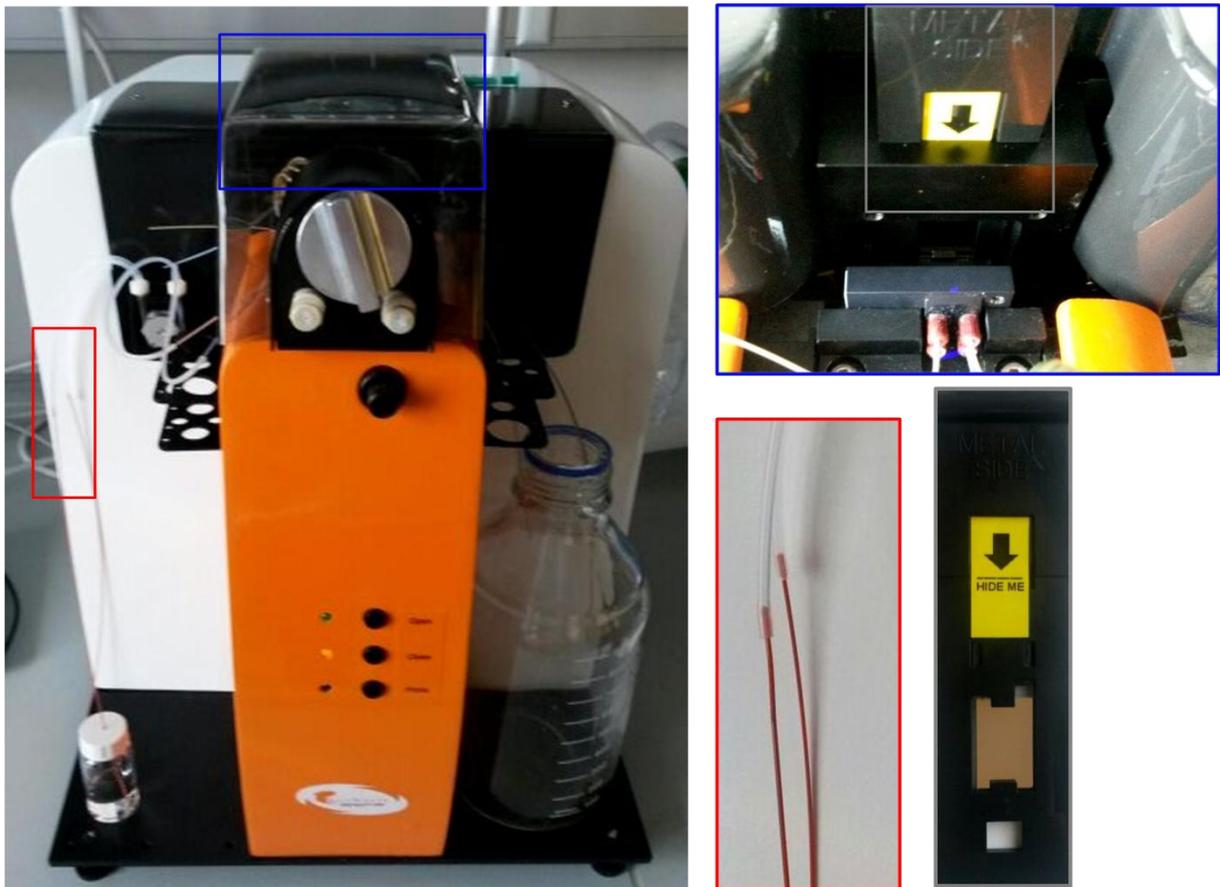


Abbildung 41 SPR-Navi 200 von Bionavis.

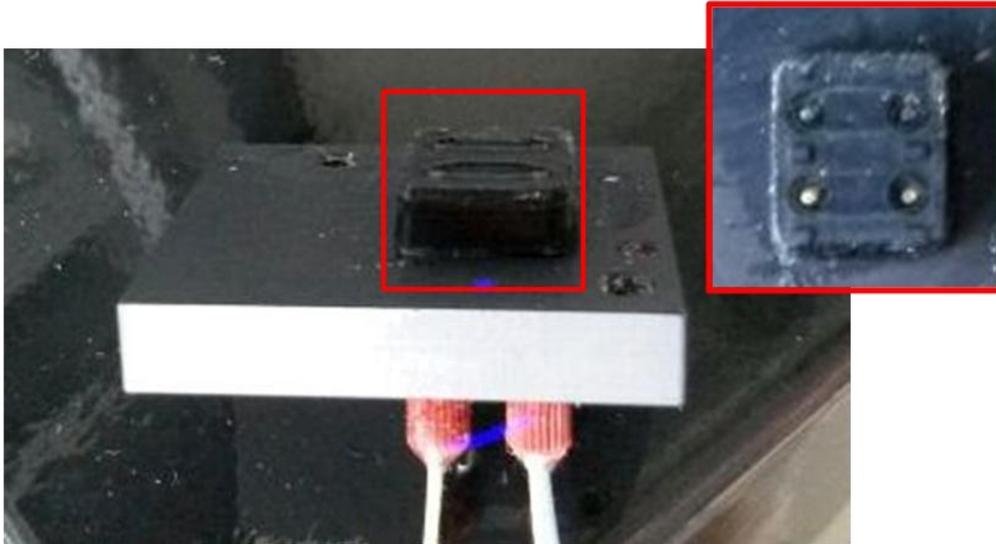


Abbildung 42 Flusszelle des SPR-Navi 200 von Bionavis.

Ein häufig auftretendes Problem sind Luftblasen im Inneren der Schläuche oder der Flusszelle. Diese entstehen meist am Übergang vom dünneren PEEK-Schlauch in den dickeren Silikonschlauch, wo sie zumeist anhaften und je nach Größe die Flussrate minimieren können. Generell fällt auf, dass die Häufigkeit der Luftblasen mit sinkender Viskosität der Lösung abnimmt. Solche Luftblasen können durch Erhöhung der Flussrate und abruptes Starten und Stoppen der Pumpe losgelöst und abtransportiert werden. Sobald sich adsorbierte Spezies auf dem Sensor-Slide befindet, ist von einer Erhöhung der Flussrate abzuraten, weil sich durch eine damit verbundene Erhöhung der Scherkräfte, die adsorbierte Schicht ablösen kann. Es besteht die Möglichkeit, dass eine Luftblase in der Flusszelle hängen bleibt. In diesem Fall muss die Messung abgebrochen werden. Luftblasen stören die Messung im hohen Ausmaß. Der Einfluss einer Luftblase auf Sensogramm und SPR-Kurve sind in Abbildung 43 dargestellt. Die SPR-Kurve weist zwei Minima auf, was daher kommt, dass sich zwei Medien in der Flusszelle befinden, die beide ein Signal liefern. Im Sensogramm ist der Abfall des Resonanzwinkels auf den Wert, der bei Luft erhalten wird, zu erkennen.

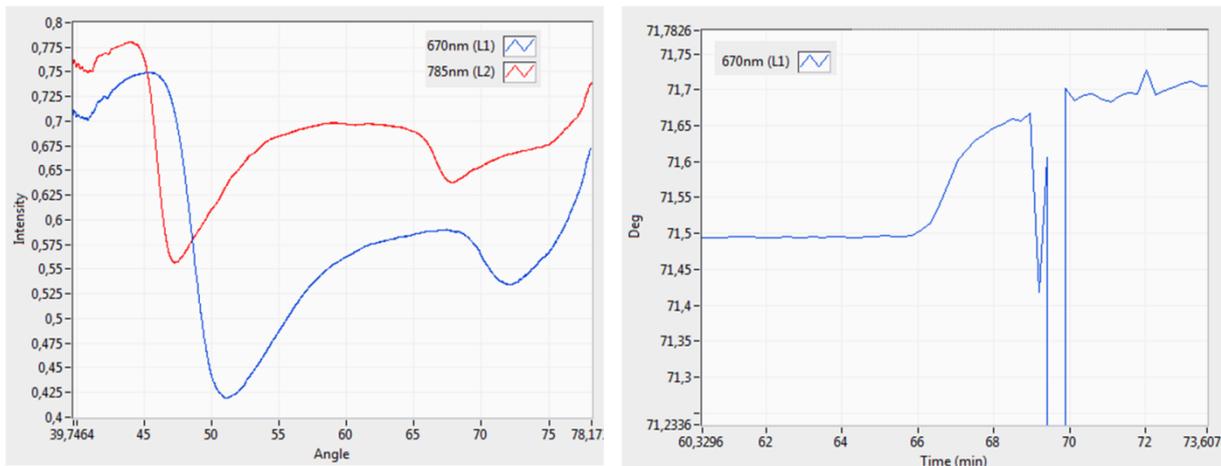


Abbildung 43 Darstellung einer SPR-Kurve (links) und eines Sensogramms (rechts) bei Luftblase in der Flusszelle.

Zusätzlich ist das Gerät sehr empfindlich gegenüber Erschütterungen. Die Genauigkeit der Winkelmessung wird stark beeinträchtigt. Dieses Problem kann durch eine dämpfende Unterlage gelöst werden.

Ein weiteres Problem sind Verstopfungen des fluidischen Systems durch Ablagerung von Adsorbat in den Schläuchen und an den Eingängen der Flusszelle oder durch Einbringung von Staub. Verunreinigungen können durch Filtration der Arbeitslösungen und Einsatz von Gefäßen mit Schraubdeckel, die nur eine kleine Öffnung für den Schlauch besitzen, verhindert werden. Zur Vorbeugung von Verstopfungen wird das fluidische System nach jeder Messung mit einer 0,1 wt. % wässrigen Sodiumdodecylsulfat-Lösung und MilliQ-Wasser ausreichend gespült.

Außerdem ist auf eine korrekte Verwendung der Sensor-Slides zu achten. Trotz Reinigung in stark oxidierender Piranha-Lösung können sich immer wieder Staubpartikel an der Oberfläche anlagern. Es empfiehlt sich, die Sensor-Slides sofort nach der Reinigung zu verwenden und eventuell vorhandene Staubpartikel mit antistatischen Tüchern und hochreinem Isopropanol zu entfernen. Zudem sollten die Sensor-Slides nicht unendlich oft verwendet werden, da sich mit jedem Reinigungsschritt die Rauigkeit der Oberfläche erhöht. Dies bewirkt eine Streuung des einfallenden Strahls an der Oberfläche und vermindert somit die Intensität des reflektierten Strahls und verbreitert die SPR-Kurve.

6 Experimentelles

6.1 Geräte

Multi-Parametric Surface Plasmon Resonance Spectroscopy (MP-SPRS)

Die MP-SPRS-Messungen wurden an einem SPR Navi 200 von Bionavis Ltd, Tampere, Finnland, ausgestattet mit zwei verschiedenen Lasern (670 nm, 785 nm) und zwei Messkanälen, durchgeführt. Es wurden Gold-Sensor-Slides (SPR102-AU) eingesetzt (50 nm Gold-Schicht auf Glassubstrat mit 2 nm Chrom-Haftschrift). Die Messungen wurden über den vollen Winkelbereich (39°-78°) mit einer Scan-Geschwindigkeit von 8° s^{-1} bei einer Temperatur von 24,9 °C vorgenommen. Die Evaluation der Daten erfolgte mit dem Programm Winspall 3.02.

Quartz Crystal Microbalance - Dissipation (QCM-D)

Es wurde eine Quatzkristallmikrowaage mit Dissipationseinheit von Q-Sense, Gothenburg, Schweden verwendet. QCM-D Sensoren (QSX301) wurden von LOT-Oriel, Deutschland, gekauft. Alle Berechnungen wurden mit der Software QTools 3.0.12 von Q-Sense ausgeführt.

Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM-Aufnahmen wurden im *tapping mode* mit einem Agilent 5500 AFM multimode scanning probe microscope, Agilent, Santa Barbara, CA, mit Slizium Cantilevern (ATEC-NC-20, Nanosensors, Deutschland) mit einer Resonanzfrequenz von 210-490 kHz und einer Kraftkonstante von $12\text{-}110 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ erhalten. Die Bilder wurden mit der Software Gwyddion bearbeitet.

X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

XPS-Spektren wurden mittels Thermo Scientific Instrument, ausgestattet mit einer monochromatischen Al K α Röntgenstrahlquelle (1486,6 eV), aufgenommen. Hochaufgelöste Scans wurden mit einer Durchlaufenergie von 50 eV und einer Schrittgröße (Auflösung) von 0,1 eV erlangt, umfassende Scans mit einer Durchlaufenergie von 100 eV und einer Schrittgröße von 0,1 eV. Alle Spektren wurden auf den Au 4f 7/2 Peak normiert. Ladungskompensation erfolgte durch eine Argon Flood Gun. Alle Analysen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Peaks wurden mit einer Gaussian/Lorenzian Misch-Funktion

gefettet und eine Shirley Hintergrundkorrektur wurde vorgenommen. (Software Thermo Advantage v5.906).

Aufdampfanlage

Die Aufdampfung von Aluminium und Gold auf die Glassubstrate erfolgte mit einem Gerät der Marke Edwards FTM6.

Profilometer

Die Bestimmung der Schichtdicken erfolgte an einem Profilometer von Bruker, Dektak XT.

Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkelmessungen wurden mit Wasser und einer Menge von 3 μl an einem Krüss DAS 100 Kontaktwinkelmessgerät durchgeführt.

Infrarot-Spektroskopie

IR-Spektren wurden an einem ATFT-IR Bruker Alpha durchgeführt. Pro Spektrum wurden 64 Scans, bei Hintergrundmessungen 24 Scans, mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} im Bereich von $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ aufgenommen. (Software OPUS 6,5)

Fluoreszenzmikroskopie

Das Abscannen der Microarrays erfolgte mit einem Microarray Scanner DNAscope LM+ von GeneFocus, USA mit grüner Anregung (523 nm) und roter Emission. Die Bilder wurden mittels Software rot koloriert.

6.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angeführt, von kommerziellen Quellen bezogen (Sigma Aldrich Austria) und ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet. Die Reinheit der Phosphonate betrug 97%., die des verwendeten *puriss. p. a.* Isopropanols bei $\geq 99,8\%$. Cellulose-4-[*N,N,N*-trimethylammonium]butyrat chlorid mit unterschiedlichen Substitutionsgraden (CMABC_L: DS = 0,21; CMABC_H: DS = 0,675) wurde von Prof. Thomas

Heinze, Universität Jena zur Verfügung gestellt. Trimethylsilyl-Cellulose (TMSC, $DS_{TMS} = 2,8$ hergestellt aus Avicel PH-101) wurde vom Thüringischen Institut für Textil- und Kunststoff-Forschung e.V. (TITK), Deutschland, gekauft. Milli-Q Wasser (Widerstand = $18,2 \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$) von einem Millipore Wasser-Reinigungs-System, USA, wurde verwendet.

6.3 Probenvorbereitung und Messung

6.3.1 Reinigung Gold-Sensor-Slides

Die Reinigung der Gold-Sensor-Slides erfolgte in Piranha-Lösung, bestehend aus H_2O_2 (30 wt. %) und H_2SO_4 (98 wt. %) (1:3; v/v). Die Gold-Sensor-Slides wurden für 30 min in benannte Lösung ($T < 90 \text{ }^\circ\text{C}$) getaucht, danach intensiv mit Milli-Q Wasser gespült und anschließend im Stickstoff-Strom getrocknet.

6.3.2 Herstellung Cellulose-Filme

Die Herstellung der Cellulose-Filme auf gereinigten Gold-Sensor-Slides erfolgte durch statisches Spin-Coating einer Trimethylsilylcellulose (TMSC)-Lösung und anschließender Regeneration mit HCl zu Cellulose. TMSC (1 % (w/v)) wurde durch Erhitzen auf $60 \text{ }^\circ\text{C}$ und Rühren über Nacht in Toluol gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die TMSC-Lösung mittels $5 \mu\text{m}$ PTFE Spritzen-Filter filtriert. Es wurde je Sensor-Slide $100 \mu\text{l}$ der TMSC-Lösung aufgetragen und bei einer Geschwindigkeit von 4000 rpm und einer Beschleunigung von $2500 \text{ rpm}\cdot\text{s}^{-1}$ für 60 s gespinnt. Die mit TMSC beschichteten Sensor-Slides wurden jeweils in einer Petrischale aus Polystyrol mit einem Durchmesser von 5 cm platziert. 3 ml einer 12 wt. % HCl wurden neben dem Slide aufgetragen. Die Petrischale wurde mit einem Deckel versehen, sodass die TMSC-Filme für 15 min den HCl-Dämpfen ausgesetzt waren. Zur Überprüfung der Regeneration der Cellulose aus TMSC wurde der Kontaktwinkel beider Oberflächen mit Wasser bestimmt.

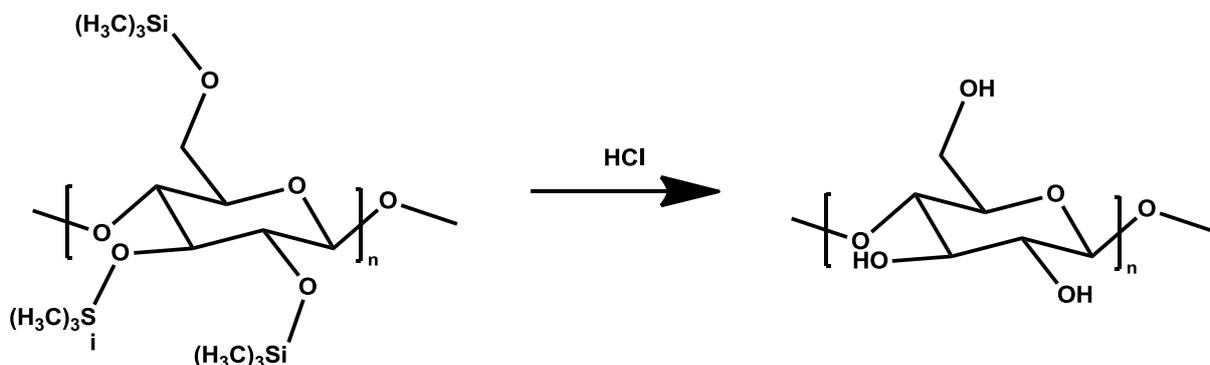


Abbildung 44 Umwandlung TMSC (DS 2,8) zu Cellulose.

6.3.3 Herstellung Arbeitslösungen

Herstellung Phosphonat-Lösungen

Tetradecylphosphonat, Octylphosphonat und Vinylphosphonat (5 mg ml^{-1}) wurden in hoch reinem Isopropanol gelöst und mit einem $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ PTFE Spritzen-Filter filtriert.

Herstellung CMABC-Lösungen

CMABC_H und CMABC_L (0,1 %, w/v) wurden in reinem Milli-Q Wasser aufgelöst. Die Ionenstärke der Lösungen wurde mit NaCl auf 150 mM gebracht. Ein pH-Wert von 7 wurde mit 0,1 M NaOH oder 0,1 M HCl eingestellt. Alle Lösungen wurden über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mit einem $5 \text{ }\mu\text{m}$ PTFE Spritzen-Filter filtriert.

Herstellung Protein-Lösungen

FITC-BSA ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) wurde in 10 mM Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten aufgelöst; pH 5 (Natriumacetat/Essigsäure), pH 6 und 7 (Natriumphosphat). Der pH-Wert der Pufferlösungen wurde entweder mit Eisessig (pH 5) oder 0,1 M NaOH (pH 6 und 7) eingestellt. Die Ionenstärke der drei Pufferlösungen wurde mit NaCl auf 100 mM eingestellt.

6.3.4 Adsorption von Phosphonaten auf Gold

Die Adsorption von Tetradecylphosphonat, Octylphosphonat und Vinylphosphonat erfolgte auf frisch gereinigten Gold-Sensor-Slides. Nach Equilibrierung in Luft für circa 20 min wurde für weitere 20 min in Isopropanol equilibriert. Die in Isopropanol gelösten Phosphonate ($5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) wurden danach mit einer Flussrate von $0,1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ für 5 min über die Gold-Sensor-Slides gepumpt. Anschließend erfolgten die Spülung mit Isopropanol und die Trocknung mit Luft. Es wurde eine 3-fach Bestimmung durchgeführt.

6.3.5 Bedampfen von Glassubstraten

Die Glassubstrate ($2 \times 5 \times 0,2 \text{ cm}$) wurden für 30 min in Piranha-Lösung ($T > 90 \text{ }^\circ\text{C}$), bestehend aus H_2O_2 (30 wt. %) und H_2SO_4 (98 wt. %) (1:3; v/v), gereinigt und intensiv mit deionisiertem Wasser gespült. Die sauberen Glassubstrate wurden mit Aluminium (20 nm), welches als Haftschiicht diente, und Gold (30 nm) beschichtet. Anschließend wurden diese angeritzt und in kleinere Stücke (circa $2 \times 1,5 \times 0,2 \text{ cm}$) zerbrochen.

6.3.6 Beschichtung bedampfter Substrate mit Phosphonaten

Ein Teil der bedampften Substrate wurde für 10 min in Piranha-Lösung ($T < 90\text{ °C}$), bestehend aus H_2O_2 (30 wt. %) und H_2SO_4 (98 wt. %) (1:3; v/v), gereinigt und intensiv mit Milli-Q Wasser gespült, die restlichen wurden direkt verwendet. Alle Substrate wurden für 5 min in einer Phosphonat-Isopropanol-Lösung ($5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) eingelegt, danach mit Isopropanol gespült und an Luft getrocknet.

6.3.7 Probenvorbereitung Kontaktwinkelmessung Phosphonate

Gold-Sensor-Slides wurden für 30 min in Piranha-Lösung ($T < 90\text{ °C}$), bestehend aus H_2O_2 (30 wt. %) und H_2SO_4 (98 wt. %) (1:3; v/v), getaucht und intensiv mit Milli-Q Wasser gespült. Die gereinigten Sensor-Slides wurden für 5 min in Phosphonat-Isopropanol-Lösung ($5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) eingelegt, mit Isopropanol gespült, an Luft getrocknet und für 1 h bei 90 °C im Trockenschrank getempert. Eine Nullprobe, die nur in Isopropanol eingelegt wurde, wurde ebenfalls vorbereitet.

6.3.8 Adsorption von CMABC auf Cellulose-Filmen

Die Adsorption von CMABC_L und CMABC_H erfolgte auf mit Cellulose beschichteten Gold-Sensor-Slides. Nach Equilibrierung der Cellulose-Filme mit Milli-Q Wasser und anschließend 150 mM NaCl wurde CMABC ($1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) mit einer Ionenstärke von 150 mM NaCl bei einer Flussrate von $100\text{ }\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ für 30 min über die Sensor-Slides gepumpt. Danach wurde die CMABC-Lösung zuerst gegen 150 mM NaCl und dann gegen Milli-Q Wasser ausgetauscht. Es wurde eine 3-fach Bestimmung durchgeführt.

6.3.9 Adsorption von FITC-BSA auf CMABC

Die Adsorption von FITC-BSA erfolgte auf CMABC beschichteten Cellulose-Filmen. Nach Equilibrierung in Milli-Q Wasser und Puffer mit entsprechendem pH-Wert wurden die FITC-BSA-Lösungen ($1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) für 30 min mit einer Flussrate von $100\text{ }\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ durch die Flusszelle gepumpt. Nachfolgend wurde mit Puffer bei entsprechendem pH-Wert und Milli-Q Wasser gespült. Es wurde eine 3-fach Bestimmung durchgeführt.

6.3.10 Herstellung strukturierter kationischer Celluloseoberflächen

Zur Beschichtung von COP-Slides (25 x 75 mm²) wurden 2 ml TMSC-Lösung (1 % (w/v)) in Toluol/Cyclohexanon (1:9 (v/v)) aufgetragen und bei einer Geschwindigkeit von 4000 rpm und einer Beschleunigung von 2500 rpm·s⁻¹ für 60 s gespinnt. Die mit TMSC beschichteten COP-Slides wurden mit einer Aluminium Maske (75 x 25 mm², Dicke: 1 mm) mit 16 quadratischen Löchern (5 x 5 mm²) abgedeckt und in einem 1000 ml Exsikkator mit 300 ml 10 wt. % HCl platziert. Die Slides wurden für 15 min regeneriert und danach in einen Puffer (100 ml) bei verschiedenen pH-Werten (5, 6, 7) eingetaucht, mit MilliQ-Wasser für 15 min gespült und im N₂-Strom getrocknet.

6.3.11 Adsorption kationischer Cellulosen und TRITC-BSA auf strukturierten Celluloseoberflächen

CMABC_H und CMABC_L (30 µl, 1 mg·ml⁻¹, 150 mM NaCl, pH 7) wurden auf die strukturierten Cellulosefelder aufgetropft und für 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen mit Elektrolytlösung (30 µl, 150 mM NaCl, pH 7) ausgetauscht und die Platten nochmals für 30 min inkubiert. Danach wurden die Platten mit MilliQ-Wasser für 45 min inkubiert.

Es wurden TRITC-BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 1000, 500, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 und 0,001 µg·ml⁻¹ bei den pH-Werten von 5, 6 und 7 mit einer Ionenstärke von 100 mM NaCl hergestellt. Jede Lösung wurde auf ein Feld der mit kationischer Cellulose beschichteten Platten getropft (30 µl pro Feld) und 30 min lang inkubiert. Danach wurde die Proteinlösung mit Puffer getauscht und eine Inkubation über 30 min erfolgte. Die Platten wurden im N₂-Strom getrocknet. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht durchgeführt.

7 Appendix

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AFM	Atomic Force Microscopy
BSA	Rinderserum Albumin (Bovine Serum Albumin)
CMABC	Cellulose-4-[N,N,N-trimethylammonium]butyrat chlorid
dn/dc	Brechungsindexinkrement
DS	Degree of Substitution
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
FITC-BSA	Fluorescein Isothiocyanat – Rinderserumalbumin
IP	Isoelektrischer Punkt
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Adsorptions-Spektroskopie
MP-SPRS	Multi-Parametric Surface Plasmon Resonance Spectroscopy
NHS	N-Hydroxysuccinimid
QCM-D	Quartz Crystal Microbalance - Dissipation
RMS	Root Mean Square
SAM	Self-Assembled-Monolayer
TMSC	Trimethylsilylcellulose
TRITC-BSA	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat – Rinderserumalbumin
XPS	X-Ray Photoelectron Spectroscopy

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Schichtdicken d und Brechungsindices n der unterschiedlichen Phosphonat Monolayer auf Gold. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen....	31
Tabelle 2 Theoretische Moleküllängen der vermessenen Phosphonate.....	32
Tabelle 3 Ergebnisse für Kontaktwinkel (CA) der getemperten Phosphonat Monolayer. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus sechs Messungen.	33
Tabelle 4 Zuordnung der Banden der IR-Spektren von den vermessenen Phosphonaten und Vergleich von getemperten und unbehandelten Proben.	44
Tabelle 5 Ergebnisse aus dem viskoelastischen Modelling der QCM-D Daten für die CMABC-Schichten auf Cellulose. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen.	47
Tabelle 6 Mittels MP-SPRS bestimmte Menge an adsorbiertem FITC-BSA [$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$] und Vergleich mit Literaturwerten ^[4] . Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen.	50
Tabelle 7 Mittels QCM-D bestimmte Menge an adsorbiertem FITC-BSA [$\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}$]. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen.	51
Tabelle 8 Wassergehalt [%] FITC-BSA-Schichten auf Cellulose und Cellulosederivaten.....	52
Tabelle 9 Kontaktwinkel [°] (Wasser) der FITC-BSA-Schichten auf Cellulose und Cellulosederivaten.....	53
Tabelle 10 Kontaktwinkel [°] (Wasser) von BSA-Schichten auf Cellulose und Cellulosederivaten.....	53
Tabelle 11 Anzahl adsorbierter FITC-BSA-Schichten auf Cellulose und Cellulosederivaten....	54

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vergleich von Adsorptionsisothermen nach <i>Henry</i> , <i>Freundlich</i> und <i>Langmuir</i> . ^[7]	4
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Adsorption von ellipsoidisch geformten Proteinen an einer Oberfläche; i) <i>side-on</i> und ii) <i>end-on</i> Orientierung. ^[18]	7
Abbildung 3 Schematischer Vergleich von kooperativem und nicht-kooperativem Effekt während der Adsorption von Proteinen an Oberflächen. ^[8]	8
Abbildung 4 Schematische Darstellung von Reflexion und Brechung an einer Grenzfläche...	11
Abbildung 5 Darstellung der Brechung in Abhängigkeit der Brechungsindices; a) $n_1 = n_2$, b) $n_1 < n_2$, c) $n_1 > n_2$.	12
Abbildung 6 Darstellung des Brechungsindexverlaufs bei Veränderung der Wellenlänge für normale und anomale Dispersion.	13
Abbildung 7 Schematische Darstellung der Konfigurationen zur optischen Anregung von Oberflächenplasmonen nach <i>Kretschmann</i> und <i>Otto</i> .	15
Abbildung 8 Aufbau eines MP-SPR-Spektrometers nach <i>Kretschmann</i> -Konfiguration. ^[37]	17
Abbildung 9 SPR-Kurve und Verschiebung des Resonanzwinkels $\Delta\theta$ bei veränderter chemischer Umgebung.	17
Abbildung 10 Schematischer Aufbau eines Adsorptionsexperimentes – Sensogramm.	18
Abbildung 11 QCM-D Sensor (links) und schematische Darstellung des zur Schwingung angeregten Quarzkristalls. ^[43]	22
Abbildung 12 Gegenüberstellung des Dissipationsverhaltens von rigiden und weichen Schichten. ^[47]	23
Abbildung 13 Schema zur Erklärung des Einflusses von Flüssigkeitshüllen der Proteine auf deren Adsorptionsverhalten. ^[43]	26
Abbildung 14 Struktur der mit MP-SPRS vermessenen Phosphonate; Tetradecylphosphonat, Octylphosphonat, Vinylphosphonat (von links nach rechts).	28
Abbildung 15 Repräsentative Sensogramme der Adsorption der verschiedenen Phosphonate auf Gold; a) Tetradecylphosphonat, b) Octylphosphonat, c) Vinylphosphonat, (links 670 nm, rechts 785 nm), Start der Adsorption bei 5 min, Start des Spülens bei 12,5 min. Flussrate 100 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Konzentration 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.	29
Abbildung 16 Repräsentative Darstellung der 2-Medien-Methode zur Bestimmung der Schichtdicke und des Brechungsindex bei zwei Wellenlängen zugehörig zu den oben gezeigten Messungen; a) Tetradecylphosphonat, b) Octylphosphonat, c) Vinylphosphonat, (links 670 nm, rechts 785 nm), (rote Linie Luft, blaue Linie Isopropanol).	30
Abbildung 17 Schematische Darstellung des Einflusses von unvollständiger Bedeckung auf die mit MP-SPRS ermittelte Schichtdicke.	32
Abbildung 18 Darstellung der P_{2p} -Peaks der XPS-Spektren der verschiedenen Phosphonat Monolayer; a) Tetradecylphosphonat, b) Octylphosphonat, c) Vinylphosphonat, d) reiner Gold-Sensor-Slide.	34

Abbildung 19 Schematische Darstellung der mögliche Anbindungsarten von Phosphonaten auf Goldoberflächen: links monodentat, mitte bidentat, rechts tridentat.	35
Abbildung 20 AFM-Bilder der Gold-Sensor-Slides; a) neu, b) in Piranha-Lösung gereinigt.	35
Abbildung 21 Darstellung der O _{1s} -Peaks der XPS-Spektren von frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten sowie von mit Tetradecylphosphonat behandelten frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten.	36
Abbildung 22 Darstellung der Au _{4f} -Peaks der XPS-Spektren von frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten sowie von mit Tetradecylphosphonat behandelten frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten.	37
Abbildung 23 Darstellung der P _{2p} -Peaks der XPS-Spektren von frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten sowie von mit Tetradecylphosphonat behandelten frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten.	37
Abbildung 24 Darstellung C _{1s} -Peaks der XPS-Spektren von frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten sowie von mit Tetradecylphosphonat behandelten frisch bedampften und gereinigten Goldsubstraten.	38
Abbildung 25 Vergleich der O _{1s} -Peaks der XPS-Spektren von Tetradecylphosphonat in Pulverform und als Monolayer.....	39
Abbildung 26 Darstellung des O _{1s} -Peaks des XPS-Spektrums von Tetradecylphosphonat in Pulverform.....	39
Abbildung 27 Reaktionsschema der Kondensation von Phosphonaten.....	40
Abbildung 28 Vergleich der IR-Spektren von Vinylphosphonat; unbehandelt (oben) und getempert (unten).....	41
Abbildung 29 Vergleich der IR-Spektren von Octylphosphonat; unbehandelt (oben) und getempert (unten).....	42
Abbildung 30 Vergleich der IR-Spektren von Tetradecylphosphonat; unbehandelt (oben) und getempert (unten).....	43
Abbildung 31 Struktur von Cellulose-4-[N,N,N-trimethylammonium]butyrat chloriden, wobei CMABC _L einen DS (NMe ₃ ⁺ Cl ⁻) von 0,210 und CMABC _H einen DS (NMe ₃ ⁺ Cl ⁻) von 0,675 kennzeichnet.	45
Abbildung 32 Sensogramme der mit MP-SPRS vermessenen Adsorption von CMABC _H und CMABC _L auf Cellulose bei a) 670 nm und b) 785 nm. Flussrate 100 µl·min ⁻¹ . Konzentration 1 mg·ml ⁻¹	46
Abbildung 33 QCM-D Daten (Δf_3 , ΔD_3) der Adsorption von CMABC _L und CMABC _H auf Cellulose, bereitgestellt von Dr. Tamilselvan Mohan.	47
Abbildung 34 AFM Bilder und Rauigkeit von a) Cellulose, b) CMABC _L , c) CMABC _H . Bildgröße 1 x 1 µm ²	48
Abbildung 35 Repräsentative Sensogramme der mit MP-SPRS untersuchten Adsorption von FITC-BSA auf a) CMABC _H , b) CMABC _L , c) Cellulose, (links 670 nm, rechts 785 nm), Start der	

Adsorption bei 5 min, Start der Spülung bei 35 min. Flussrate $100 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Konzentration $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$	49
Abbildung 36 Vergleich der adsorbierten Mengen an Protein bestimmt durch MP-SPRS und QCM-D. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei Messungen.	52
Abbildung 37 Fluoreszenz-Bilder der mit FITC-BSA beladenen Oberflächen, bereitgestellt von Dr. Tamilselvan Mohan.	55
Abbildung 38 Mit kationisch modifizierter Cellulose ausgestattete COP-Slides inkubiert mit TRITC-BSA-Lösungen mit den Konzentrationen (1000, 500, 100, 10, 1, 0,1, 0,01 und $0,001 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) bei verschiedenen pH-Werten: A) CMABC_L , B) CMABC_H	56
Abbildung 39 Fluoreszenzintensität von TRITC-BSA auf CMABC_L (links) und CMABC_H (rechts) beschichteten COP-Slides in Abhängigkeit der Konzentration bei verschiedenen pH-Werten.	57
Abbildung 40 Darstellung der Modifikationsmöglichkeit von Phosphonat-Monolayern.	58
Abbildung 41 SPR-Navi 200 von Bionavis.	59
Abbildung 42 Flusszelle des SPR-Navi 200 von Bionavis.	60
Abbildung 43 Darstellung einer SPR-Kurve (links) und eines Sensogramms (rechts) bei Luftblase in der Flusszelle.	61
Abbildung 44 Umwandlung TMSC (DS 2,8) zu Cellulose.	64

7.4 Referenzen

- [1] A. Turner, G. Wilson, I. Kaube, *Biosensors: Fundamentals and Applications.*, UK: Oxford University Press, **1987**.
- [2] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. Y. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 321.
- [3] Y. Jung, J. Y. Jeong, B. H. Chung, *Analyst*, **2008**, 133, 697.
- [4] H. Orelma, I. Filpponen, L.-S. Johansson, J. Laine, O. J. Rojas, *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 4311.
- [5] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie, Physical Chemistry*, Wiley-VCH Verlag, **2006**.
- [6] H. Yildirim Erbil, *Surface Chemistry of Solid And Liquid Interfaces*, Blackwell Publishing, **2006**.
- [7] A. Wilke, *Optimierung der biosorptiven Schwermetallentfernung unter Verwendung von immobilisierter Algenbiomasse*, Band Dissertation, Hrsg.: TU Berlin, FB III Prozesswissenschaften, Berlin, **2001**, S.23-24.
- [8] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2011**, 162, 87.
- [9] M. G. E. G. Bremer, J. Duval, W. Norde, J. Lyklema, *Colloids Surf. A*, **2004**, 250, 29.
- [10] S. Demanèche, J. P. Chapel, L. J. Monrozier, H. Quiquampoix, *Colloids Surf. B*, **2009**, 70, 226.
- [11] F. Höök, M. Rodahl, B. Kasemo, P. Brzezinski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 12271.
- [12] W. Norde, *Driving Forces for Protein Adsorption at Solid Interfaces*, In *Biopolymers at Interfaces* Vol. 75, New York, **1998**.
- [13] P. G. Koutsoukos, W. Norde, J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.*, **1983**, 95, 385.
- [14] W. Kunz, J. Henle, B. W. Ninham, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **2004**, 9, 19.
- [15] W. Norde, *Colloids Surf. B*, **2008**, 61, 1.
- [16] J. D. Andrade, V. Hlady, *Adv. Polym. Sci.*, **1986**, 79, 1.
- [17] B. P. Frank, G. Belfort, *Langmuir*, **2001**, 17, 1905.
- [18] P. Roach, D. Farrar, C. C. Perry, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 8168.
- [19] J. J. Ramsden, *Chem. Soc. Rev.*, **1995**, 24, 73.
- [20] A. Hinderliter, S. May, *J. Phys. Condens. Matter.*, **2006**, 18, 1257.
- [21] A. Herrig, M. Janke, J. Austermann, V. Gerke, A. Janshoff, C. Steinem, *Biochemistry*, **2006**, 45, 13025.
- [22] R. Kurrat, J. J. Ramsden, J. E. Prenosil, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1994**, 90, 587.

- [23] J. Zhang, X. Y. Liu, *J. Chem. Phys.*, **2003**, 119, 10972.
- [24] <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-16-03194>.
- [25] G. Decher, J. B. Schlenoff, *Multilayer Thin Films*, Wiley-VCH-Verlag, **2003**.
- [26] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, *J. Biosci. Bioeng.*, **2001**, 91, 233.
- [27] H. Hänsel, W. Neumann, *Physik; Elektrizität - Optik - Raum und Zeit*, Spektrum Akademischer Verlag, **1993**.
- [28] D. Halliday, R. Resnick, J. Walker, *Halliday Physik*, 2. Auflage, Wiley-VCH, **2001**.
- [29] A.-L. Cauchy, *Bulletin de Férussac.*, **1830**, 14, 6.
- [30] M. Sheik-Bahae: *Nonlinear Optics Basics. Kramers-Krönig Relations in Nonlinear Optics*. In: R. D. Guenther, *Encyclopedia of Modern Optics*. Academic Press, Amsterdam, **2005**.
- [31] E. Kretschmann, H. Raether, *Z. Naturforsch.*, **1968**, 23, 2135.
- [32] A. Otto, *Z. Physik*, **1968**, 216, 398 .
- [33] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström, *Sensor. Actuat. B*, **1983**, 4, 299.
- [34] H. Raether, *Surface Plasmons on smooth and rough surfaces and on gratings*, Springer-Verlag, Berlin, **1988** .
- [35] A. D. Boardman, *Electromagnetic surface modes*, John Wiley and Sons, **1982**.
- [36] M. L. Theye, *Phys. Rev. B*, **1970**, 2, 3060.
- [37] www.bionavis.com.
- [38] L. S. Jung, C. T. Campbell, T. M. Chinowsky, M. N. Mar, S. S. Yee, *Langmuir*, **2006**, 3, 1248.
- [39] R. M. A. Azzam, N. M. Bashara, *Ellipsometry and Polarized Light*, Elsevier, Amsterdam, **1987**.
- [40] J. W. Sadowski, I. K. J. Korhonen, J. P. K. Peltonen, *Opt. Eng.*, **1995**, 34, 2581.
- [41] K. A. Peterlinz, R. Georgiadis, *Opt. Commun.*, **1996**, 130, 260.
- [42] J. A. DeFeijter, J. Benjamins, F. A. Veer, *Biopolymers*, **1978**, 17, 1759.
- [43] I. Reviakine, D. Johannsmann, R. P. Richter, *Anal. Chem.*, **2001**, 83, 8838.
- [44] Buch Stefan
- [45] W. G. Cady, *Piezoelectricity*, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, **1946**.
- [46] M. Rodahl, F. Hook, A. Krozer, P. Brzezinski, B. Kasemo, *Rev. Sci. Instrum.*, **1995**, 66, 3924.
- [47] Q-Sense, Basic Training, **2006**.
- [48] F. Höök, B. Kasemo, T. Nylander, C. Fant, K. Scott, H. Elwing, *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5796.

- [49] G. Z. Sauerbrey, *Phys.*, **1959**, 155, 206.
- [50] J. D. Ferry, *Viscoelastic Properties of Polymers*, 3rd ed., Wiley & Sons, New York, **1980**.
- [51] P. Oswald, *Rheophysics – The Deformation and Flow of Matter*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K., **2009**.
- [52] P. Bingen, G. Wang, N. F. Steinmetz, M. Rodhal, R. P. Richter, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 8880.
- [53] I. Carton, A. R. Brisson, R. P. Richter, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, 9275.
- [54] A. Laschitsch, B. Menges, D. Johannsmann, *Appl. Phys. Lett.*, **2000**, 77, 2252.
- [55] E. Reimhult, C. Larsson, B. Kasemo, F. Hook, *Anal. Chem.*, **2004**, 76, 7211.
- [56] D. Johannsmann, I. Reviakine, E. Rojas, M. Gallego, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 8891.
- [57] E. Rojas, M. Gallego, I. Reviakine, *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 8982.
- [58] K. H. Choi, J. M. Friedt, F. Frederix, A. Campitelli, G. Borghs, *Appl. Phys. Lett.*, **2002**, 81, 1335.
- [59] A. Bund, O. Schneider, V. Dehnke, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2002**, 4, 3552.
- [60] L. Macakova, E. Blomberg, P. M. Claesson, *Langmuir*, **2007**, 23, 12436.
- [61] G. Tarjus, P. Schaaf, J. Talbot, *J. Chem. Phys.*, **1990**, 93, 8352.
- [62] H. R. Gwon, S. H. Lee, *Materials Transactions*, **2010**, 51, 1150.
- [63] D. R. Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*, 87. Ausgabe, **2006**.
- [64] E. Hoque, J. A. DeRose, B. Bhushan, K. W. Hipps, *Ultramicroscopy*, **2009**, 109, 1015.
- [65] V.I. Nefedov, Buslaev, A.A. Kuznetsova, L.F. Yankina, *Zh. Neorg. Khimii*, **1974**, 19, 1416.
- [66] I. Gouzman, M. Dubey, M. D. Carolus, J. Schwartz, S. L. Bernasek, *Surf. Sci.*, **2006**, 600, 773.
- [67] H. Tsai, E. Hu, K. Perng, M. Chen, J.-C. Wu, Y.-S. Chang, *Surf. Sci.*, **2003**, 537, 447.
- [68] G. Socrates, *Infrared Characteristic Group Frequencies, Tables and Charts*, Second Edition, Wiley, **1998**.
- [69] T. Ristic, T. Mohan, R. Kargl, S. Hribernik, A. Doliska, K. Stana-Kleinschek, L. Fras, *Cellulose*, **2014**, 21, 2315.
- [70] T. Mohan, C. Zarth, A. Doliska, R. Kargl, T. Grießer, S. Spirk, T. Heinze, K. Stana-Kleinschek, *Carbohydr. Polym.*, **2013**, 92, 1046.
- [71] A. V. Dobrynin, A. Deshkovski, M. Rubinstein, *Macromolecules*, **2001**, 34, 3421.
- [72] A. V. Dobrynin, M. Rubinstein, *Progr. Polym. Sci.*, **2005**, 30, 1049.
- [73] J. L. Robeson, R. D. Tilton, *Langmuir*, **1996**, 12, 6104.
- [74] S. J. McClellan, E. I. Franses, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **2005**, 260, 265.

[75] T. Białopiotrowicz, B. Janczuk, *J. Surf. Deterg.*, **2001**, 4, 287.

[76] P. G. Squire, P. Moser, C. T. O`Konski, *Biochemistry*, **1968**, 7, 4261.

7.5 Curriculum Vitae

Personal Data

Name, Title: Katrin Niegelhell, BSc
Date of Birth: 19.02.1991
Place of Birth: Graz
Nationality: Austria



Education

1997-2001 Volksschule Edelstauden
2001-2009 Wirtschaftskundliches Bundesrealgymnasium Graz
10/2009-09/2012: Technische Universität Graz, Austria, Bachelor studies in Chemistry
Bachelor thesis: "Antimikrobiell ausgestattete biodegradierbare Komposite" with Frank Wiesbrock, Dipl.-Chem.Univ. Dr.rer.nat. Univ.-Doz.
09/2012 - current: Technische Universität Graz, Austria, Master studies in Technical Chemistry

Summer Jobs

07/2010 IVOCLAR VIVADENT AG, Bendererstrasse 2, FL-9494 Schaa

Research Stays Abroad

01.06. – 08.06.2014 Petru Poni Institute, Romanian Academy of Sciences, Iasi, Romania.
"Interaction of DNA-Origami with modified polysaccharide surfaces".

Research Interests: Multi-Parametric Surface Plasmon Resonance, Quartz Crystal Microbalance and Polysaccharide based materials.

Publications

- **Phosphonate Monolayers on Gold Surfaces**
Katrin Niegelhell, Simon Leimgruber, Thomas Grießer, Gregor Trimmel, Stefan Spirk*
intended for submission to Langmuir

- **Interactions of Birch Xylan with Cellulose Thin Films - an AFM and QCM-D Study**
Christian Ganser, Petra Gasparic, Siegfried Zöhrer, Katrin Niegelhell, Caterina Czubala, Albrecht Miletzky, Christian Teichert, Karin Stana-Kleinschek, Robert Schennach, Stefan Spirk*
submitted to Cellulose
- **Triggering Protein Adsorption on Tailored Cationic Cellulose Surfaces**
Tamilselvan Mohan*, Cíntia Salomão Pinto Zarth, Rupert Kargl, Katrin Niegelhell, Stefan Köstler, Volker Ribitsch, Thomas Heinze, Stefan Spirk*, Karin Stana-Kleinschek
submitted to Biomacromolecules

Scholarships

- KUWI: Stipendium für Kurzfristige Wissenschaftliche Arbeiten - Travel Expense Allowance for visit abroad.

Participation in Conferences

- EN(ergy)LITE(racy)WEEK, 11th-14th February 2014, Maribor, Slovenia.

Participation in Projects

- Marie-Curie-Career Integration Grant of the European Union (2013-2016, Grant No. 618158) with Dr. Stefan Spirk, TU Graz, Austria.

Public-To-Science Activities

- Out of the Box Lab, Maribor 2014,
<https://www.flickr.com/photos/razumaribor/12495916723/in/set-72157640915858804/>,
<https://www.flickr.com/photos/razumaribor/12495918143/in/set-72157640915858804/>

30.07.2014
