

**Charakterisierung von molekularen und
biomolekularen Wechselwirkungen mittels
Kalorimetrie und spektroskopischen
Methoden**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von
Karin Wöllner

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2008

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Gauglitz

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. U. Weimar

meinen Eltern

Danksagung

Mein Dank gilt besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. Günter Gauglitz für die freie Überlassung der Thematik, für den großen Freiraum und das Vertrauen bei der Gestaltung dieser Arbeit sowie die Möglichkeit an vielen Veranstaltungen im Laufe meiner Promotion teilzunehmen und schließlich für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in unserem Arbeitskreis.

Herrn Privatdozent Dr. Udo Weimar möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferats danken.

Dem gesamten Arbeitskreis Gauglitz möchte ich für das gute Arbeitsklima und die netten gemeinsam verbrachten Unternehmungen danken. Ganz speziell Frau Dipl. Chem. Stefanie Jäger für die vielen Diskussionen und für die Reflektometrischen Interferenzspektroskopie Messungen. Frau Dr. Nina Käppel und Herrn Dipl. Chem. Goran Markovic möchte ich speziell für die gute Zusammenarbeit mit der Biogruppe unseres Arbeitskreises danken sowie Frau Dipl. Chem. Nina Schweizer für die ausgezeichnete Zusammenarbeit im Rahmen des EU geförderten Projektes BBMO.

Frau Dipl. Biochem. Ursula Neu aus dem Arbeitskreis von Prof. Stehle der Biochemie der Uni Tübingen danke ich für die gute Kooperation zum Thema Affenvirus. Ebenso möchte ich Herrn Dr. Günter Roth für die hervorragende Kooperation und Bereitstellung der Peptide danken. Herrn C. Bücherl danke ich für sein Engagement und reges Interesse an meiner Arbeit, während seiner Praktikumszeit bei mir.

Frau Dipl. Chem. Maura Kasper und Herrn Dr. Stefan Busche danke ich für die Einarbeitung in das Mikrokalorimeter und für die vielen Diskussionen und Anregungen. Herrn Dr. Nicolae Leopold danke ich für die Einarbeitung in das IR-Gerät und Herrn Dipl. Chem. Hartmut Röhm aus dem Arbeitskreis von Prof. Maier der Organischen Chemie der Uni Tübingen danke ich für die NMR-Messungen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Alexander Ruderisch, als ehemaliger Mitarbeiter des Arbeitskreises von Prof. Schurig der Organischen Chemie der Uni Tübingen für die Bereitstellung des Calix[4]aren-Selektors sowie Frau Dr. A.-S. Belmont aus Lund in Schweden und Herrn Prof. K. Haupt der Universität Compiègne in Frankreich für die Bereitstellung der MIPs.

Frau Prof. R. Bilewicz der Uni Warschau in Polen, sowie Frau Prof. I. Vikholm-Lundin des Technical Research Centre Tampere in Finland und Frau Dr. B. Lindholm-Sethson der Umea Universität in Schweden danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen des EU Projektes BBMO.

Zu guter letzt möchte ich mich bei allen die durch ihre Unterstützung in den letzten Jahren die Durchführung und Erstellung dieses Werkes ermöglicht haben bedanken.

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	5
2. Theoretische Grundlagen	8
2.1 Kalorimetrie	8
2.1.1 Messprinzipien	8
2.1.2 Betriebsarten	8
2.1.3 Bauarten	9
2.1.4 Grundlagen der Thermodynamik	9
2.1.4.1 Isotherme Titrations-Kalorimetrie (ITC)	14
2.1.4.2 Voraussetzung für eine ITC-Messung	15
2.1.4.3 Bestimmung der Affinität	15
2.1.4.4 Bindungsaffinitäten	17
2.2 Ellipsometrie	18
2.2.1 Wechselwirkung von Licht und Medium	18
2.2.2 Dispersion	21
2.3 Untersuchte Systeme	24
2.3.1 Untersuchte Polymersysteme	24
2.3.1.1 Polydimethylsiloxan	24
2.3.1.2 Resorcin[4]aren-PDMS-System	24
2.3.1.3 Molekular geprägte Polymere (MIP)	26
2.3.1.4 Quellung von Polymeren	28
2.4 Untersuchte biochemische Systeme	31
2.4.1 Progesteron Immunoassay	31
2.4.2 PSA Immunoassay	31
2.4.3 Perfluorierte Verbindungen und Lipide	32

2.4.4	SV40 VP1 und GM1 _____	34
2.4.5	Ubiquitin_____	37
2.4.6	Kooperativität_____	38
3.	Material und Methoden_____	39
3.1	Geräteaufbau und Messverfahren_____	39
3.1.1	Verwendete Kalorimeter und Arbeitsweise_____	39
3.1.1.1	Empfindlichkeit_____	42
3.1.1.2	Kalibrierung_____	42
3.1.2	Verwendete Ellipsometer_____	44
3.1.2.1	Ellipsometrische Messungen_____	48
3.1.3	Weitere Geräte_____	49
3.2	Chemikalien_____	50
3.3	Substrate_____	51
3.3.1	Silizium-Wafer_____	51
3.3.2	Glas-Wafer_____	51
3.4	Präparation der sensitiven Chemoschichten____	52
3.4.1	Reinigung und Aktivierung_____	52
3.4.2	Silanisierung der Oberfläche_____	52
3.4.3	Polydimethylsiloxan (PDMS)_____	53
3.4.4	Präparation der MIP-Interferenzschichten_____	54
3.5	Präparation der biochemischen Systeme_____	54
3.5.1	Vorbereitungen für ITC-Messungen_____	54
3.5.2	Präparation der Lipidschichten_____	55
4.	Ergebnisse und Diskussion_____	56
4.1	Untersuchte Polymersysteme_____	56

4.1.1	Polydimethylsiloxan_____	56
4.1.1.1	Untersuchung mittels Ellipsometrie_____	56
4.1.2	PDMS-R4A System_____	62
4.1.2.1	Untersuchung mittels ITC_____	62
4.1.2.2	Untersuchung mittels RIfS_____	66
4.1.2.3	Untersuchung mittels IR_____	69
4.1.2.4	Untersuchung mittels ¹ H NMR_____	72
4.1.3	Molekular geprägte Polymere (MIP)_____	75
4.1.3.1	Untersuchungen mittels ITC_____	75
4.1.3.2	Untersuchungen mittels RIfS_____	77
4.2	Untersuchung von biochemischen Systemen_____	80
4.2.1	Charakterisierung des Progesteron-Antikörpers mittels Ellipsometrie _____	80
4.2.2	Untersuchtes Prostata-spezifisches Antigen mittels Ellipsometrie _____	86
4.2.3	Bestimmung der Affinität des SV40_____	90
4.2.4	Charakterisierung der Membranlipide _____	95
4.2.4.1	Untersuchung der Lipide mittels AFM_____	95
4.2.4.2	Untersuchung der Lipide anhand der ITC____	99
4.2.4.3	Untersuchung der Lipide mittels RIfS_____	102
4.2.5	Affinitätsbestimmung von Ubiquitin mit Peptiden_____	105
5.	Zusammenfassung_____	109
6.	Abkurzungen_____	113
7.	Literatur_____	116
8.	Abbildungsverzeichnis_____	121

9. Anhang	126
9.1 Akademische Lehrer	126
9.2 Lebenslauf	127

1. Einleitung

Mit der Gewinnung von Informationen über stoffliche Systeme, ganz besonders über die Art und Menge ihrer Bestandteile einschließlich der dreidimensionalen Anordnung und Verteilung wie auch zeitlichen Änderung und der dazu erforderlichen Methodik beschäftigt sich die chemische bzw. biochemische Analytik. Die aus analytischen Untersuchungen gewonnenen Resultate sind stets Informationen, die durch stoffliche und energetische Wechselwirkungen mit dem untersuchten Objekt erhalten werden [Dan10]. Für die Untersuchung analytischer Fragestellungen wie z. B. der Strukturaufklärung oder Trennung und Identifizierung von Substanzen, steht eine fast schon unüberschaubare Anzahl an Methoden zur Verfügung. Neben den klassischen Methoden wie der Chromatographie oder den elektroanalytischen Messmethoden gibt es eine Vielzahl an spektroskopischen Methoden. Eine Einführung und Übersicht in die verschiedenen Methoden ist z. B. in [Cam20] zu finden. Die meisten dieser Methoden sind sowohl für die quantitative als auch für die qualitative Bestimmung geeignet. Zusätzlich stellt sich die Analytik gegenwärtig den Problemen der industriellen Prozesskontrolle und der Umweltüberwachung unter Einsatz von chemischen und biochemischen Sensoren [Ott30]. Eine übersichtliche Darstellung über Chemo- und Biosensoren ist in [Göp40] und [Sch50] gegeben. Für die Entwicklung solcher Sensoren sind sensitive Materialien notwendig, die je nach Anwendungsgebiet unterschiedlichen Anforderungen gerecht werden müssen. Im Idealfall sollte die Wechselwirkung einer sensitiven Schicht mit einem Analyten sich durch hohe Selektivität, Stabilität und Reversibilität auszeichnen. In den meisten Fällen finden aber zusätzliche Wechselwirkungen mit anderen Analyten statt, so dass zwischen spezifischer und unspezifischer Wechselwirkung unterschieden werden muss. Zu den unspezifischen Wechselwirkungen zählen z. B. die Polymer-Lösungsmittelkorrelationen, die durch nicht selektive Einlagerung des Lösungsmittels in die Poren des Polymers entstehen. Im Gegensatz dazu gehören die Antigen-Antikörperkorrelationen, die durch Anbindung des Antikörpers an eine Bindungsstelle entstehen zu den spezifischen Wechselwirkungen. Bevor also die Schicht zur Sensoranwendung kommt, sollte daher eine ausführliche Aufklärung des Wechselwirkungsverhaltens mit dem Analyten erfolgen. Daher sind umfassende Charakterisierungen der Materialien und ihres Wechselwirkungsverhalten un-

umgänglich. In dieser Arbeit werden, für die Untersuchung und Charakterisierung der chemischen und biochemischen Systeme, hauptsächlich die Isotherme Titrations-Kalorimetrie (ITC) und die spektrale Ellipsometrie (SE) eingesetzt. Außerdem kommen die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS), die Infrarot-Spektroskopie (IR), die Rasterkraftmikroskopie (AFM) und die Kernresonanzspektroskopie (NMR) zum Einsatz.

Mit der Kalorimetrie kommt eine thermodynamische Methode zum Einsatz, mit der Wärmeänderungen ΔQ von Systemen gemessen werden. Sie ist damit eine fundamentale analytische Methode für die Untersuchung von thermischen Effekten als Folge chemischer und biochemischer Reaktionen [Doy51]. Es gibt verschiedene Methoden wie ELISA, RIA, SPR, etc. die routinemäßig für die Charakterisierung von biologischen Wechselwirkungen verwendet werden [Pie51]. Hier wird speziell die Isotherme Titrations-Kalorimetrie für die Untersuchung von molekularen und biomolekularen Wechselwirkungen eingesetzt. Die ITC kann für zahlreiche Anwendungen verwendet werden, wie z. B. für Bindungsstudien von Antigen-Antikörper, Protein-Peptid, Protein-Protein, Enzym-Inhibitor, sowie Enzyme-Kinetik Wechselwirkungen [Per51]. Aus den Resultaten der Messungen lassen sich Aussagen über die thermodynamischen Größen wie Enthalpie, Entropie, freie Enthalpie und die Bindungskonstante einer untersuchten Reaktion machen. Überdies bekommt man Informationen über den Reaktionstyp, die Kooperativität und sie kann zur Strukturaufklärung von z. B. Proteinen beitragen [Sab52]. Sie liefert damit Informationen, die für Analysemethoden wie der Chromatographie oder den unzähligen spektroskopischen Methoden nicht oder nicht in diesem Umfang aus einer Messung zugänglich sind. Es wird in dieser Arbeit aber auch auf Problematiken bei Anwendung der ITC Methode eingegangen, so ist z. B. die Affinität manchmal schwer bestimmbar, trotz allem können aber Bindungsereignisse, exo- bzw. endotherme Reaktionsabläufe bestimmt werden.

Die spektrale Ellipsometrie hingegen erlaubt die gleichzeitige Bestimmung zweier unbekannter Schichtparameter, der physikalischen Schichtdicke und des Brechungsindex n . Mit der Ellipsometrie wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Analyten auf Polymer- und Rezeptorfilme mit Schichtdicken im Nanometerbereich untersucht. Die Arbeit teilt sich in zwei Hauptbereiche, einmal in den der Polymerchemie, in der zum einem eine interes-

sante Untersuchungsreihe mit dem bekannten Polydimethylsiloxan (PDMS) und verschiedener organischer Lösungsmittel mittels Ellipsometrie durchgeführt werden. PDMS zeichnet sich zwar durch sehr hohe Stabilität aus, reagiert aber nur im begrenzten Maße selektiv auf Analyte. Deshalb war ein weiterer Schritt dieser Arbeit der Einbau einer makromolekularen Erkennungsstruktur in das PDMS-Grundgerüst. Als Erkennungsstruktur wurde dafür ein organisches Makromolekül aus der Gruppe der Calixarene gewählt, um eine selektivere Erkennung von Analytmolekülen mit chemischen Polymeren zu erreichen. Ein weiteres Polymersystem, das in diese Arbeit untersucht wird, sind die sogenannten molekular geprägten Polymere (MIP), die sich durch hohe Robustheit und hohe Selektivität dank des Vorhandenseins von spezifischen Hohlräumen auszeichnen. Somit werden in diesem System sowohl die Stabilität der Polymere als auch die Selektivität der hochspezifischen biochemischen Rezeptoren vereinigt. Der zweite große Bereich dieser Arbeit befasst sich mit der Untersuchung und Charakterisierung des Wechselwirkungsverhaltens von biochemischen Systemen. In den ersten beiden Kapiteln des Bereichs erfolgt die Untersuchung von Immunoassays mittels Ellipsometrie. Hierbei sollte zum einen die Schichtdicke der einzelnen Filme der Modell-Assays, die für das Prostata-spezifische Antigen (PSA) und für die Progesteron Detektion optimiert wurden, charakterisiert werden und der Analyteinfluss auf die Sensoroberfläche untersucht werden. Letzteres wurde ferner auf das Verhalten in verschiedenen Umgebungsmedien untersucht. Aber auch die Kalorimetrie findet in diesem Bereich Anwendung. Im Rahmen des EU-Projektes BBMO wurden Wechselwirkungsuntersuchungen von Phospholipiden mit perfluorierten Carbonsäuren mittels ITC, RfS und der Rasterkraftmikroskopie durchgeführt. Für ein besseres Verständnis biochemisch ablaufender Prozesse erfolgte die Affinitätsbestimmung des Affenvirus SV40 mit dem Gangliosid-Rezeptor GM1 sowie einem weiteren interessanten Biosystem, der Ubiquitinbindung eines Peptidsegments der Ubiquitin Carboxyhydrolase L3 (UCH-L3). Somit wird in dieser Arbeit ein Spektrum verschiedenartiger chemischer und biochemischer Systeme, die im Bereich der Sensorik und der klinischen Diagnostik zum Einsatz kommen sollen, mit einer Reihe von Analysemethoden vorgestellt. Die Experimente sollen dazu beitragen, das Wechselwirkungsverhalten zwischen Rezeptorschicht und Ligand bzw. Polymerschicht und Analytmolekülen besser zu verstehen und zusätzlich Referenzdaten liefern.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Kalorimetrie

Die Kalorimetrie ist eine fundamentale analytische Methode zur Untersuchung von thermischen Effekten als Folge chemischer und biochemischer Reaktionen bzw. physikalischer Zustandsänderungen. Dabei wird die Wärmeänderung ΔQ eines Systems gemessen. Das Kalorimetersignal gibt die Leistung als Funktion der Zeit wieder und ermöglicht damit direkte Aussagen über die Thermodynamik und die Kinetik chemischer Reaktionen. Kalorimeter werden nach dem Messprinzip, Betriebsart und der Bauart eingeordnet.

Jedes Kalorimeter besitzt grundsätzlich zwei entscheidende Bereiche, den Probenbereich und die Umgebung. Zum Probenbereich zählt nicht nur der zu untersuchende Prozess sondern auch das Reaktionsgefäß selbst. Mit der Umgebung sind nicht die allgemeinen Laborbedingungen, sondern das direkte Umfeld des Probenbereichs, die Thermophilen-Elemente und das äußere Wärmebad, gemeint.

$$\Delta T = T_{\text{Probe}} - T_{\text{Umgebung}} \quad (1)$$

2.1.1 Messprinzipien

Es gibt in der Kalorimetrie verschiedene Methoden, mit der Wärmeeffekte eines Systems experimentell bestimmt werden können:

1. Die thermoelektrische Kompensation,
2. die Kompensation durch Phasenumwandlung, und
3. die Messung der zeitlichen und/oder
4. örtlicher Temperaturdifferenz.

2.1.2 Betriebsarten

Es gibt grundlegend einmal den ideal isothermen und den ideal adiabatischen Betrieb:

1. Isotherm, ($\Delta T = 0$, $T_p = \text{konstant}$), Probe und Umgebung werden bei konstanter Temperatur gehalten.
2. Adiabatisch, ($\Delta T = 0$, $T_p \neq \text{konstant}$), es findet kein Wärmeaustausch zwischen Probe und Umgebung statt, Probe und

Umgebung werden bei gleicher Temperatur gehalten, welche sich während einer Reaktion ändern kann.

Da aber nur ein quasi-isothermer bzw. adiabatischer Zustand realisierbar ist, wird weit verbreitet die isoperibole Betriebsart praktiziert:

3. Isoperibol, ($\Delta T \neq 0$, $T_U = \text{konstant}$), die Umgebung wird bei konstanter Temperatur gehalten, während sich die Temperatur im Probengefäß ändert.

2.1.3 Bauarten

Es wird, in Bezug auf die Bauart, zwischen Einfach- und Zwillingskalorimeter unterschieden. In einem Einfachkalorimeter wird die Proben temperatur gegen die Umgebungstemperatur gemessen bzw. kompensiert. Bei einem Zwillingskalorimeter wird gegen eine Referenzzelle unter gleichen Bedingungen gemessen bzw. kompensiert, so dass von außen kommende thermische Störungen ausgeglichen werden können und die Empfindlichkeit dadurch erhöht wird.

2.1.4 Grundlagen der Thermodynamik:

Erster Hauptsatz der Thermodynamik: Die Energie eines isolierten Systems ist unveränderlich.

Anders Ausgedrückt bedeutet der erste Hauptsatz, dass jedes System eine innere Energie besitzt, die nur durch den Transport von Energie in Form von Arbeit W oder Wärme Q verändert werden kann.

$$dU = \delta Q + \delta W = \delta Q - pdV \quad (2)$$

Wird bei konstantem Volumen erwärmt (isochore Vorgänge), so ist $dV = 0$ und damit auch $\delta W = 0$, somit ergibt sich für verschwindend kleine Änderungen:

$$dU = \delta Q_v = C_v dT, \quad (3)$$

wobei C_v die Wärmekapazität bei konstantem Volumen ist. Führt man hingegen Wärme δQ bei konstantem Druck (isobare Vorgänge) zu, so ist $dp = 0$.

Für die Beschreibung isobarer Zustandsänderungen eignet sich die folgende Gleichung:

$$H = U + pV \quad (4)$$

Somit ist die Temperaturabhängigkeit der Enthalpie gleich der Wärmekapazität bei konstantem Druck:

$$dH = \delta Q_p = C_p dT \quad (5)$$

Wird Wärme an die Umgebung abgegeben, wird der Prozess als exotherm bezeichnet und die Enthalpie ist $\Delta H < 0$. Während Prozesse, die Wärme aus der Umgebung benötigen um ablaufen zu können, als endotherm bezeichnet werden und die Enthalpie $\Delta H > 0$ ist.

Zweiter Hauptsatz der Thermodynamik: In einem isolierten System führen spontane Prozesse zu einer zunehmenden Entropie des Systems.

$$\Delta S_{ges} > 0 \quad (6)$$

mit ΔS_{ges} für die gesamte Entropie des Systems. Für ein System, das im Wärmekontakt mit seiner Umgebung steht, bedeutet eine Änderung der Wärme damit gleichzeitig eine Änderung der Entropie des Systems (ΔS) und der Umgebung (ΔS_U). Für nicht umkehrbare Prozesse bedeutet dies, dass die Entropie größer Null ist:

$$dS = dS_U \geq 0 \quad \text{mit} \quad dS_U = -\frac{dq}{T}, \text{ ist} \quad (7)$$

$$dS \geq \frac{dq}{T} \quad (8)$$

Dritter Hauptsatz der Thermodynamik: Für einen ideal kristallisierten Festkörper am absoluten Nullpunkt der Temperatur, kann die Entropie den Wert Null annehmen.

$$\lim_{T \rightarrow 0} \Delta S(\text{idealer Festkörper}) = 0 \quad (9)$$

Durch die Gibbs-Funktion werden die Entropie ΔS und die Enthalpie ΔH , bei konstantem Druck, miteinander verbunden.

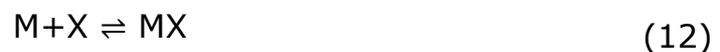
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (10)$$

Damit eine Reaktion freiwillig ablaufen kann, muss die Gibbs-Energie bzw. freie Reaktionsenthalpie ΔG negativ sein. Der Wert von ΔG macht eine Aussage über die Triebkraft der Reaktion.

Unter Gleichgewichtsbedingungen ist $\Delta G = 0$, und somit die Standardenthalpie:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (11)$$

K ist dabei die thermodynamische Gleichgewichtskonstante unter einem gegebenen Druck und einer bestimmten Temperatur. Die Gleichgewichtskonstante wird analog zum Massenwirkungsgesetz [Nic60] für die Modellreaktion



folgend formuliert:

$$K_a = \frac{[MX]}{[M][X]} \quad \text{bzw.} \quad K_d = \frac{[M][X]}{[MX]} \quad (13)$$

Die Gleichgewichtskonstante ist dabei mit der Bindungsenthalpie folgenderweise verknüpft:

$$-RT \ln K = \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (14)$$

Damit eine Reaktion bei konstantem Druck und Temperatur aber überhaupt stattfinden kann, muss die freie Gibbs-Energie $\Delta G < 0$ sein (siehe Gl. 11). Für Endotherme Reaktion bedeutet dies: $\Delta S > \Delta H/T > 0$.

Für eine Reaktion mit einer 1:1 Stöchiometrie ergibt sich:

$$X_{ges} = [X] + [MX] \quad (15)$$

und

$$[M_{ges}] = [MX] + [M] = [MX] + \frac{[MX]}{K[X]} \quad (16)$$

mit: $[X] = X_{ges} - [MX]$ ist

$$[M_{ges}] = [MX] + \frac{[MX]}{K(X_{ges} - [MX])} \quad (17)$$

damit ergibt sich die folgende quadratische Gleichung:

$$[MX]^2 + [MX] \left[-M_{ges} - X_{ges} - \frac{1}{K} \right] + M_{ges} X_{ges} = 0 \quad (18)$$

Die Lösung der quadratischen Gleichung ist:

$$[MX] = \frac{-b - \sqrt{b^2 + 4ac}}{2} \quad (19)$$

mit $c = M_{ges} X_{ges}$

und $b = -M_{ges} - X_{ges} - 1/K$

Durch Differenzieren von Gleichung (19) erhält man:

$$\frac{d[MX]}{dX_{ges}} = \frac{1}{2} + \frac{1 - (1+r)/2 - X_v}{(X_v^2 - 2X_v(1-r) + (1+r)^2)^{1/2}} \quad (20)$$

mit $\frac{1}{r} = c = K_a [M_{ges}] n = \frac{M_{ges}}{K_d}$ und $X_v = \frac{X_{ges}}{M_{ges}}$ (21)

wird die Gleichung 20 einfacher dargestellt. Da die Änderung der Konzentration $[MX]$ in Zusammenhang mit der Wärmeänderung steht, gilt:

$$dQ = d[MX] \cdot \Delta H^0 \cdot V_0 \quad (22)$$

Durch Substitution der Gleichung (22) in (20) ergibt sich folgendes:

$$\frac{dQ}{dX_{ges}} = \Delta H^0 V_0 \left[\frac{1}{2} + \frac{1 - (1+r)/2 - X_v/2}{(X_v^2 - 2X_v(1-r) + (1+r)^2)^{1/2}} \right] \quad (23)$$

Trägt man nun in einen Schaubild dQ/dX_{ges} gegen X_{ges}/M_{ges} auf und variiert dabei den Parameter c , bekommt man die verschiedenen Bindungsisothermen (Abb. 1). Dabei ist c das Produkt aus Bindungskonstante, gesamte Substratkonzentration (z. B. Protein- oder Makromolekülkonzentration) $[M_{ges}]$ und der Stöchiometrie n (siehe Gl. 21). Bei sehr hoher Affinität ist $c = \infty$, d. h. alle Liganden $[X]$ binden, bis die Sättigung eintritt und man eine rechtecksförmige Kurve erhält. Für Reaktionen mit sehr schwacher Affinität ist $c < 1$ und man erhält nahezu horizontale Kurven, die bei Unkenntnis der Stöchiometrie keine exakte Aussage über K zulassen. Nur im Bereich zwischen $c = 1$ und $c = 1000$ lässt sich durch die Isothermen eine genaue Aussage über die Bindungskonstante K machen [Wis70].

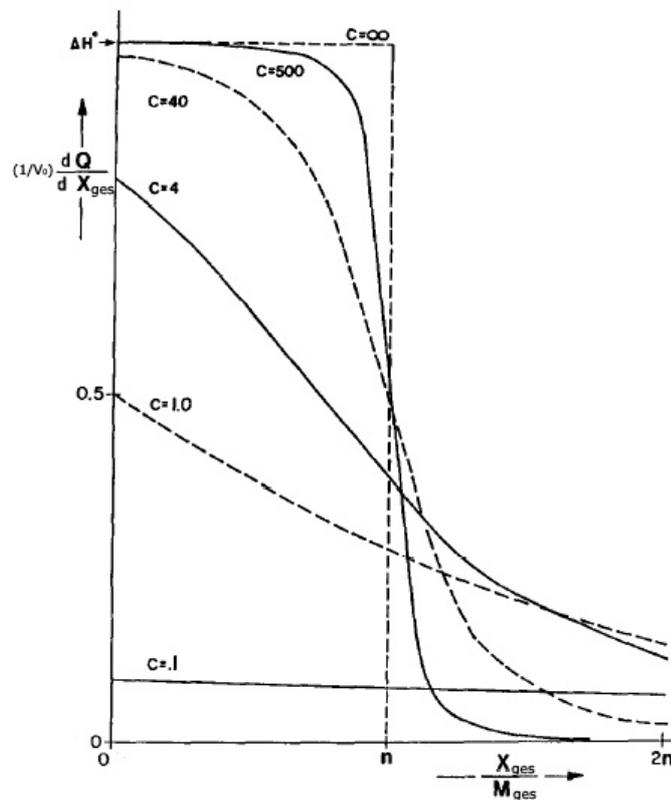


Abb. 1: Simulierte Bindungsisotherme für verschiedene Werte des c -Parameters.

Somit ist c der Parameter der geändert werden kann, um ein Experiment zu optimieren [Hal80]. Daraus lässt sich ableiten, dass Reaktionen mit hoher Affinität bei niedriger Konzentration $[M]$ gemessen werden müssen, während Reaktionen mit niedriger Affinität bei hoher Konzentration $[M]$ angesetzt werden müssen. Allerdings kann dabei der Punkt erreicht werden, wo man an die

Messgrenze des Kalorimeters stößt, um bei noch genügend kleiner Konzentration in den sensitiven c-Bereich zu fallen.

2.1.4.1 Isotherme Titrations-Kalorimetrie (ITC)

Die ITC besteht aus einer Mess- und einer Referenzzelle welche entweder 4 oder 1 mL fassen können. Für Untersuchungen von Ligand- und Substratwechselwirkungen eignet sich die Isotherme Titrations-Kalorimetrie. Im verwendeten Titrations-Kalorimeter wird ein Ligand in Lösung über eine Spritze durch eine Kapillare in das Probengefäß geleitet. Bei Reaktion des Liganden mit der Probenlösung resultiert ein Wärmefluss pro Injektion. Die exotherme Reaktion ist für das hier verwendete Gerät durch das positive bzw. die endotherme durch das negative Leistungs-Zeit-Signal zu erkennen. Durch Integration der Fläche eines Signals bekommt man die Wärmemenge in Zeitabhängigkeit pro Titration. Trägt man diese Wärmemenge gegen die molare Konzentration des zugetropften Liganden auf, erhält man daraus die Bindungsenthalpie und die Bindungskonstante K . Daraus lässt sich dann die freie Enthalpie und die Entropie bestimmen. Somit ist die isotherme Titrations-Kalorimetrie eine Methode in der sich gleichzeitig in einem Experiment die Affinität und die thermodynamischen Größen bestimmen lassen [Lea91].

Ein wichtiger Aspekt ist allerdings auch, dass die gemessene Wärmemenge eines Experimentes durch einige Effekte beeinträchtigt werden kann. Dies können zum einen Lösungsmittelleffekte sein. Es muss darauf geachtet werden, dass sowohl Ligand als auch Substrat im selben Solvent gelöst werden, da sonst, durch z. B. Ionisation von Pufferlösungen beim Titrieren, ein unerwünschter starker Wärmefluss entsteht. Zum anderen ist bei der Vorbereitung eines Experimentes darauf zu achten, dass alle Dichtungsmaterialien funktionsfähig sind.

Es gibt eine Vielzahl an Kalorimeterkonstruktionen die in Laboren Anwendung finden, wie z. B. die Gas-Perfusion-Kalorimetrie, die DSC (Differential Scanning Calorimetry), die Reaktionskalorimetrie, die Durchflusskalorimetrie und noch viele weitere. Je nach Anwendungsgebiet und Informationsgehalt, den man aus einem Experiment erhalten möchte, werden die Geräte ausgewählt. Zusätzlich besitzt jedes Kalorimeter seine eigene Methode der Datenanalyse [Bla81]. Bei der quantitativen Auswertung der kinetischen Daten muss bei dem Gerät, das in dieser Arbeit verwendet wurde (TAM

2277), besonders auf das Vorzeichen der Enthalpie geachtet werden, da sich die Auswertesoftware für die Kalorimeter der jeweiligen Gerätehersteller in dieser Hinsicht unterscheiden. Speziell beim TAM (Thermal Activity Monitor, Software: DigiTAM 4.1) entspricht ein positives Vorzeichen der Enthalpie einer exothermen Reaktion und ein negatives Signal entspricht somit einer endothermen Reaktion [Gai90]. Dies kann bei Auswertungen zur Verwechslung im Hinblick auf die Bezeichnung der Reaktion, ob exotherm oder endotherm, führen.

2.1.4.2 Voraussetzungen für eine ITC-Messung

Damit eine ITC-Messung reibungslos ablaufen kann, muss folgendes beachtet werden:

- die Messinstrumente müssen absolut sauber sein.
- Dichtungsmaterial sollte nicht abgenutzt sein und muss regelmäßig erneuert werden.
- Vor jeder Messung ist das Dichtungsmaterial mit Silicon zu bearbeiten, um eine vollständige Wärmeabschirmung der Zellen zu gewährleisten.
- Es empfiehlt sich die Referenzzelle als erstes in den Messzylinder einzubringen, damit Fehlpräparationen von dieser Seite ausgeschlossen werden können.
- Beim Füllen der Titrationsspritze sind Luftblasen strengstens zu vermeiden, da diese die Messung beeinflussen.
- Das Messprogramm sollte für einen störungsfreien Ablauf über Nacht gestartet werden.

Diese Voraussetzungen sind für eine sinnvolle Interpretation der gemessenen Wärmesignale nötig. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass alle ITC-Messungen kalibriert und korrigiert werden müssen.

2.1.4.3 Bestimmung der Affinität

Das Ergebnis eines ITC-Experimentes ist eine zeitaufgelöste Leistungskurve, in der eine Serie von Peaks entsprechend der sequenziellen Injektion des Liganden zu einer Substratlösung zu erkennen ist (Abb. 2a)). Durch Integration der einzelnen Peaks resultiert eine

Bindungsisotherme, die der Enthalpie (kJ/mol) entspricht, aufgetragen gegen das Molverhältnis (Ligand/Substrat) (Abb. 2b)). Durch das Fitten der Bindungsisothermen erhält man die Bindungskonstante K_a . In modernen Kalorimetern wird das Fitten der Kurve durch eine spezielle Auswertesoftware automatisch durchgeführt [Gai90].

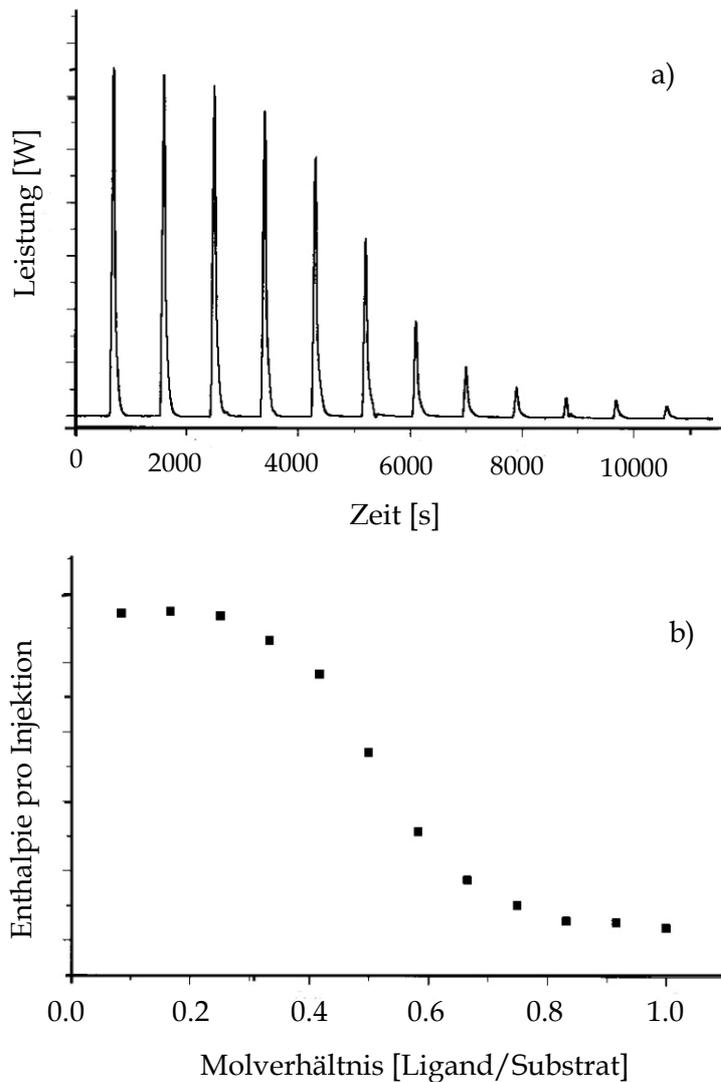


Abb. 2: Typisches Leistungs-Zeit Signal für die sequenzielle Titration eines Liganden zu einer Substratlösung a) und die daraus resultierenden Bindungsisotherme b).

2.1.4.4 Bindungsaffinitäten

Die Kalorimetrie ist eine Methode, mit der Bindungskonstanten bestimmt werden können, deshalb soll hier ein Überblick über die mittleren Assoziationskonstanten einiger Wirtsklassen aufgeführt werden. Die Affinitätskonstanten verschiedener Wirtsklassen lassen sich in mehrere Energiebereiche gruppieren. In die erste Gruppe gehören Komplexe von Cyclodextrinen, synthetischen Wirten in H_2O , katalytischen Antikörpern und Enzymen mit Substraten ebenso Albumin mit organischen Molekülen die eine Dissoziationskonstante von $10^{-2.4}$ bis $10^{-4.6}$ M besitzen und daher als „millimolare Komplexbildner“ bezeichnet werden. Zur zweiten Gruppe gehören Komplexe katalytischer Antikörper mit Übergangszuständen, Antikörper mit kleinen organischen und Biomolekülen sowie Rezeptor-Wirkstoff- und Enzym-Inhibitor-Komplexe mit einer Bindungskonstante von $10^{-6.6}$ bis $10^{-8.6}$ M. Die Enzym-Übergangszustand-Komplexe sind mit einer mittleren Affinitätskonstante von $10^{16\pm 4}$ M^{-1} die stärksten „Komplexbildner“ in dieser Gruppierung [Hou10]. Allerdings ist anzumerken, dass es experimentelle Grenzen für die Bestimmung von Bindungsaffinitäten gibt. So sind Stoffe mit hohem Molekulargewicht oft schwer löslich und entziehen sich daher einer Untersuchung. Auf der anderen Seite sind Stoffe mit niedrigem Molekulargewicht wie z. B. Gase, für die kleine Affinitäten erwartet werden, bisher kaum untersucht worden. Grundsätzlich sind damit für sehr kleine und sehr große Gastmoleküle, bei denen mit niedriger Affinität gerechnet wird, nur wenige Daten vorhanden [Kun11].

2.2 Ellipsometrie

2.2.1 Wechselwirkung von Licht und Medium

Licht ist eine elektromagnetische Transversalwelle, was bedeutet dass die Welle senkrecht zur Ausbreitungsrichtung schwingt, wobei für jedes Photon die Richtung des Schwingens verschieden sein kann. Diese Eigenschaft wird als Polarisation bezeichnet. Die Transversalwelle wird durch den Wellenvektor, der in Ausbreitungsrichtung zeigt, und den Amplitudenvektor, der senkrecht zum Wellenvektor steht, beschrieben. Betrachtet man in einem dreidimensionalen Raum zusätzlich die Rotation des Wellenvektors, so können drei Polarisationsarten unterschieden werden, die durch den Betrag und die Richtung des Amplitudenvektors beschrieben werden können:

- Lineare Polarisation: Amplitudenvektor zeigt in eine feste Richtung, Betrag und Vorzeichen der Welle ändern sich bei Auslenkung periodisch.
- Zirkulare Polarisation: Amplitudenvektor dreht sich um den Wellenvektor mit voranschreitender Welle und ändert den Betrag dabei nicht.
- Elliptische Polarisation: Amplitudenvektor rotiert um den Wellenvektor und ändert seinen Betrag dabei periodisch.

Die elliptische Polarisation ist somit eine Überlagerung von linearer und zirkularer Polarisation.

Trifft nun linear oder zirkular polarisiertes Licht auf ein Medium, so ändert sich der Polarisationszustand des Lichtes bei Reflexion und wird elliptisch polarisiert. Daher leitet sich der Name Ellipsometrie ab.

Bei Auftreffen des Lichtes auf die Phasengrenze wird der Lichtstrahl nicht nur reflektiert, sondern ein Teil dringt in das neue Medium ein. Diese Phänomene an einer Phasengrenze können durch den komplexen Brechungsindex beschrieben werden:

$$\tilde{n} = n - ik \quad (24)$$

Für transparente Dielektrika ist $k = 0$ als Imaginärteil des Brechungsindex, während $k > 0$ für absorbierende Materialien ist. In

Gleichung 25 ist der Zusammenhang von Imaginärteil k und Absorptionskoeffizienten α beschrieben:

$$k = \frac{\lambda}{4\pi} \alpha \quad \text{oder} \quad k = \frac{n\lambda_m}{4\pi} \alpha \quad (25)$$

dabei ist λ die Wellenlänge im Vakuum und λ_m die Wellenlänge im Medium m .

Die Reflexion und Transmission einer Wellenlänge ist in Abbildung 3 gezeigt.

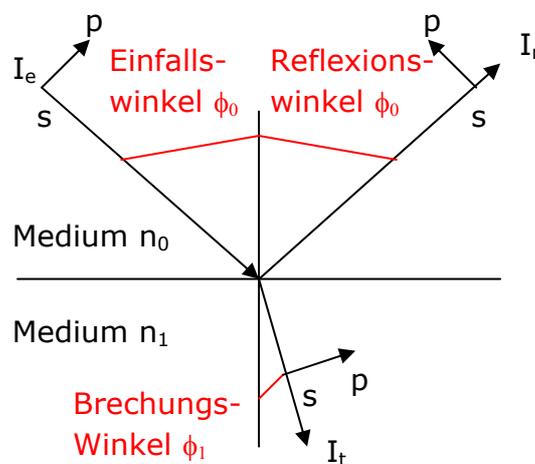


Abb. 3: Reflexion und Transmission eines Lichtstrahls an einer Grenzfläche zweier Medien mit Brechungsindex n_0 und n_1 .

Für die Berechnung der Reflexions- und Transmissionskoeffizienten muss der Polarisationszustand berücksichtigt werden. Parallel (p) polarisiertes eingestrahktes Licht ist auch nach der Reflexion parallel polarisiert. Dies gilt ebenso für das senkrecht (s) zur Einfallsebene polarisierte Licht. Die Fresnelsche Gleichungen (26-29) beschreiben das Verhältnis der reflektierten und transmittierten Amplitude zur Amplitude des einfallenden Lichtstrahles.

Für die parallele Polarisation lauten die Gleichungen:

$$r_p = \frac{E_{r_p}}{E_{ep}} = \frac{n_1 \cos \phi_0 - n_0 \cos \phi_1}{n_1 \cos \phi_0 + n_0 \cos \phi_1} = |r_p| e^{i\delta_p} \quad (26)$$

$$t_p = \frac{E_{t_p}}{E_{ep}} = \frac{2n_0 \cos \phi_0}{n_1 \cos \phi_0 + n_0 \cos \phi_1} = |t_p| e^{i\delta_p} \quad (27)$$

Für die senkrechte Polarisation lauten die Fresnelgleichungen:

$$r_s = \frac{E_{r_s}}{E_{es}} = \frac{n_0 \cos \phi_0 - n_1 \cos \phi_1}{n_0 \cos \phi_0 + n_1 \cos \phi_1} = |r_s| e^{i\delta_{rs}} \quad (28)$$

$$t_s = \frac{E_{t_s}}{E_{es}} = \frac{2n_0 \cos \phi_1}{n_0 \cos \phi_0 + n_1 \cos \phi_1} = |t_s| e^{i\delta_{ts}} \quad (29)$$

δ_{rp} , δ_{rs} , δ_{tp} und δ_{ts} sind die Phasenverschiebungen der elektromagnetischen Welle und r_p , r_s , t_p und t_s stellen die Amplitudenverhältnisse dar. Durch den Reflexions- bzw. Transmissionsgrad (Gl. 30 und 31) wird der Anteil des Lichtes beschrieben, der reflektiert oder transmittiert wird:

$$R_p = |r_p|^2 \quad \text{und} \quad R_s = |r_s|^2 \quad (30)$$

$$T_p = \frac{n_1 \cos \phi_1}{n_0 \cos \phi_0} |t_p|^2 \quad \text{und} \quad T_s = \frac{n_1 \cos \phi_1}{n_0 \cos \phi_0} |t_s|^2 \quad (31)$$

Für den Fall einer Luft/SiO₂-Grenzfläche ist in Abbildung 4 der Reflexionsgrad in Abhängigkeit des Einfallswinkels des Lichtstrahls bei einer Wellenlänge dargestellt.

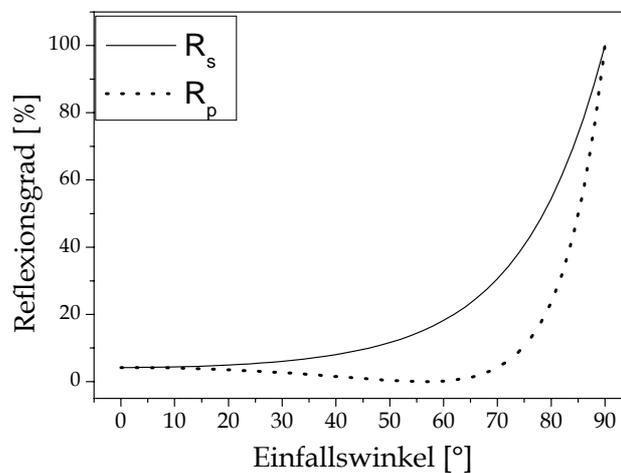


Abb. 4: Reflexionsgrad für das parallel (R_p) und senkrecht (R_s) polarisierte Licht.

Es handelt sich hierbei um ein nicht absorbierendes System, dessen Reflexionsgrad für das senkrecht polarisierte Licht von kleinem zu größerem Einfallswinkel hin ansteigt und seinen Maximalwert von 100% bei einem Winkel von 90° erreicht. Der Reflexionsgrad des parallel polarisierten Lichtes hingegen erreicht bei einem Winkel von 60° zuerst einen Minimalwert bei $R_p = 0$, bevor es

ebenfalls den Maximalwert von 100% bei einem Winkel von 90° erreicht. Das Minimum beim Winkel von 60° wird als Brewster-Winkel bezeichnet. Das reflektierte Licht ist dabei vollständig polarisiert und es gilt:

$$\tan \phi_B = \frac{n_1}{n_2} \quad (32)$$

Der Kurvenverlauf ist für absorbierende Stoffe ähnlich, allerdings sinkt der Reflektionsgrad des p-polarisierten Lichtstrahls nicht auf null.

In Abbildung 5 ist die Phasenverschiebung des senkrecht und parallel polarisierten Lichtstrahls bei Reflexion an einer Grenzfläche von optisch dünnerem zu optisch dichterem Material gezeigt.

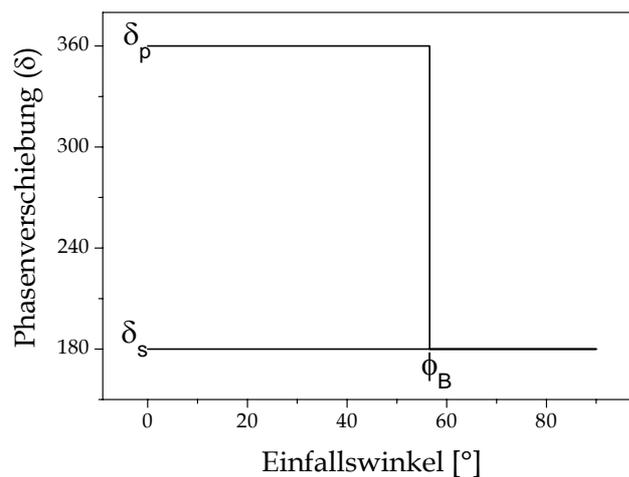


Abb. 5: Phasenverschiebung von p- und s-polarisiertem Licht in Abhängigkeit des Einfallswinkels.

2.2.2 Dispersion

Als Dispersion wird die Wellenabhängigkeit des Brechungsindex \tilde{n} bezeichnet. Die Sellmeier-Gleichung (Gl. 33) beschreibt in der Optik die Abhängigkeit der Brechzahl n eines Mediums von der Wellenlänge des Lichtes.

$$n^2(\lambda) = 1 + \frac{B_1 \lambda^2}{\lambda^2 - C_1} + \frac{B_2 \lambda^2}{\lambda^2 - C_2} + \frac{B_3 \lambda^2}{\lambda^2 - C_3} \quad (33)$$

Daneben existiert eine einfachere Formulierung, die durch die Gleichung nach Cauchy (Gl. 34) beschrieben wird. Diese wird häufig verwendet und stellt eine nützliche Parametrisierung für den spektralen Verlauf des Brechungsindex dar [Ber12]. Außerdem kann diese Form von Gleichung auch für den Imaginärteil k des komplexen Brechungsindex (Gl. 35) verwendet werden [Tom13]:

$$n(\lambda) = \sum_{l=0}^{\infty} \frac{a_l}{\lambda^{2l}} = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} \quad (34)$$

$$k(\lambda) = \sum_{l=0}^{\infty} \frac{b_l}{\lambda^{2l}} = E + \frac{F}{\lambda^2} + \frac{G}{\lambda^4} \quad (35)$$

Dabei ist $\lambda > \lambda_0$ mit λ_0 als Absorptionswellenlänge für die normale Dispersion.

Oftmalig handelt es sich bei den zu untersuchenden Materialien nicht um reine Phasen, sondern um Gemische oder verunreinigte Substanzen. Durch die Approximation effektiver Medien (EMA) besteht die Möglichkeit, die physikalischen Konstanten der heterogenen Phasen aus den physikalischen Konstanten der homogenen Phasen zu bestimmen. Die allgemeine Form (Gl. 36) lautet [Asp14]:

$$\frac{\varepsilon - \varepsilon_w}{\varepsilon + 2\varepsilon_w} = f_1 \frac{\varepsilon_1 - \varepsilon_w}{\varepsilon_1 + 2\varepsilon_w} + f_2 \frac{\varepsilon_2 - \varepsilon_w}{\varepsilon_2 - 2\varepsilon_w} + f_3 \frac{\varepsilon_3 - \varepsilon_w}{\varepsilon_3 + 2\varepsilon_w} + \dots \quad (36)$$

Für spezielle Annahmen des zu untersuchenden Mediums können weitere Approximationen formuliert werden wie Lorenz-Lorenz, Maxwell-Garnett- und die Bruggemann-Medien-Approximation, die formell alle auf Gleichung 36 aufbauen.

Die Ellipsometrie ist also ein optisches Messverfahren der Materialforschung, das zur Bestimmung des Real- und Imaginärteils der dielektrischen Funktion und/oder der Schichtdicke dünner Filme eingesetzt wird. Das Grundprinzip des Verfahrens besteht darin, dass sich der Polarisationszustand von Licht bei Reflexion (oder Transmission) an der optischen Schichtdicke einer Probe ändert. Dabei wird das linear oder zirkular polarisierte Licht nach Reflektion elliptisch polarisiert. Mit diesem Messverfahren werden die sogenannten ellipsometrischen Winkel Ψ und Δ , bzw. $\tan\Psi$ und $\cos\Delta$ gemessen. Die Änderung des Polarisationszustandes kann dabei durch das komplexe Verhältnis ρ der Fresnel-Reflexionskoeffizienten beschrieben werden:

$$\rho = \frac{R_p}{R_s} = \tan \Psi \exp(i\Delta) \quad (37)$$

dabei ist die Phasendifferenz Δ durch die Differenz der Phasenverschiebungen δ , die sich aus den parallel und senkrecht polarisierten Komponenten des Lichtes vor $\delta_1 = \phi_1 - \phi_2$ und nach der Reflexion $\delta_2 = \phi_1 - \phi_2$ ergeben, gegeben:

$$\Delta = \delta_1 - \delta_2 \quad (38)$$

Der Amplitudenquotient der parallel und senkrecht zur Einfallsebene orientierten elektromagnetischen Strahlung nach der Reflexion ist:

$$\tan \Psi = \frac{|R_p|}{|R_s|}. \quad (39)$$

Die Verknüpfung zwischen experimentell ermittelten Werten und den physikalisch interessanten Größen, Schichtdicke d und komplexer Brechzahl n , stellt dabei Gleichung (39) dar.

Mit diesen ellipsometrischen Messungen können aber maximal zwei unbekannte Größen bestimmt werden. Bei größerer Anzahl unbekannter Größen als zwei müssen entsprechen mehr Ψ - und Δ -Werte zur Ermittlung herangezogen werden. Es stehen folgende Möglichkeiten dafür zur Verfügung:

- Fester Winkel und spektroskopische Messung (spectroscopic ellipsometrie, SE).
- Monochromatische Lichtquelle und variierende Winkel (variable angle spectroscopy, VAE).
- Winkel und Wellenlänge werden geändert (variable angle spectroscopic ellipsometrie, VASE).

2.3 Untersuchte Systeme

2.3.1 Untersuchte Polymersysteme

2.3.1.1 Polydimethylsiloxan (PDMS)

PDMS (Abb. 6) ist ein Standardpolymer das unter anderem in der Gaschromatographie als stationäre Phase verwendet wird. Es ist ein Material mit besonderen chemischen und physikalischen Eigenschaften [Hau15], dessen Gebrauch z. B. in der Fluidik zur Anwendung kommt. Charakteristisch für dieses Polymer ist seine Beständigkeit gegenüber vielen Lösungsmitteln ebenso wie seine Elastizität, optische Durchsichtigkeit, flexible Oberflächenchemie, niedrige Durchdringbarkeit für Wasser und niedriges elektrisches Leitvermögen [Ng16]. Bei Raumtemperatur liegt PDMS praktisch im amorphen, gummiartigen Zustand vor, was die Diffusion der Analyten in bzw. aus der sensitiven Schicht erleichtert und somit die Gleichgewichtseinstellung beschleunigt. Insbesondere der reversible Quelleffekt gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln wird in der Sensorik zur Erkennung von Umweltschadstoffen eingesetzt [Zho17]. Ausführliche Beschreibungen des Polymers sind unter folgenden Literaturen zu finden [Ark18, Zim19, May20, Rös21, Zho22, Abu23].

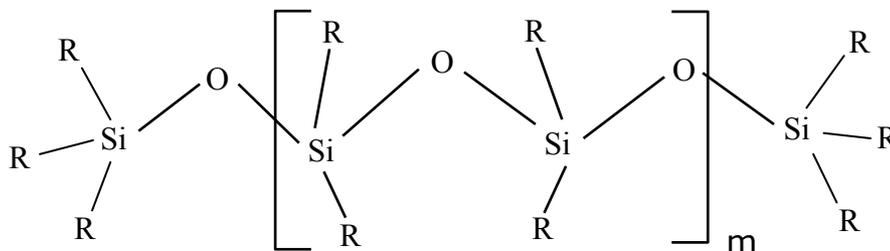


Abb. 6: Polydimethylsiloxan-Grundgerüst mit der charakteristischen Si-O-Si-Kette. R kann dabei ein beliebiger organischer Rest sein.

2.3.1.2 Resorcin[4]aren-PDMS-System

Um die Selektivität eines Polysiloxan-Systems zu erhöhen, besteht die Möglichkeit einer Anbindung oder Einbindung von supra-molekularen Erkennungsstrukturen. In der Gaschromatographie (GC) werden solche Anbindungen an Polysiloxane als Trägermaterial angewendet. Genauer untersucht wurde in der vorliegenden Arbeit das Resorcin[4]aren-PDMS-Systems, dessen Grundbau-

stein aus vier Resorcineinheiten besteht, die in ortho-Stellung zu den Hydroxylgruppen über Alkylmethylengruppen verbrückt sind [Rud24]. Das Resorcin[4]aren gehört zu den Calixarenen (lat. Vase), einer Gruppe von organischen Makromolekülen [Oci25]. In Abbildung 7 ist das Resorcin[4]aren-System dargestellt. Die Struktur dieser achiralen supramolekularen Erkennungsstruktur ähnelt einem vasenartigen Gefäß, die zu Einlagerung von Molekülen dienen kann und damit ein weites Anwendungsfeld bietet [Nop26, Gut28].

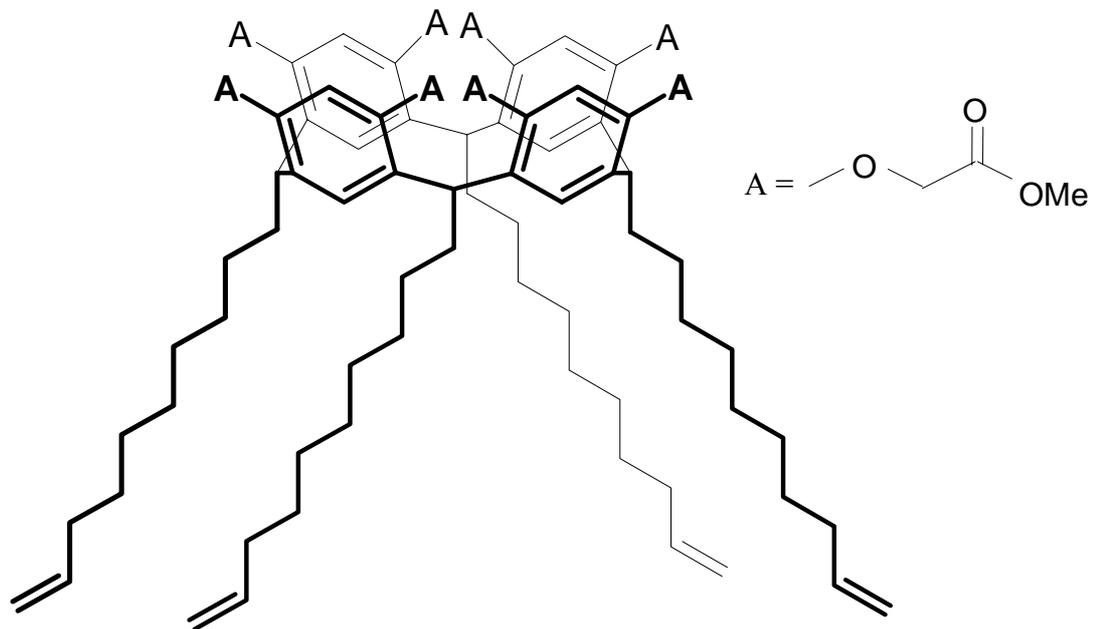


Abb. 7: Struktur des Resorcin[4]aren mit A als achiralem Selektorteil.

Während in vorangegangenen Arbeiten die Calixaren-Systeme entweder direkt auf Trägermaterialien durch kovalente bzw. adsorptive Anbindung oder über Membrane gebracht wurden [Gut25], wird im Gegensatz dazu in dieser Arbeit das Calix[4]aren kovalent in das oben beschriebene Polydimethylsiloxan (PDMS) eingebunden.

Kovalente Anbindung

Die Synthese des Resorcin[4]aren-PDMS-Systems erfolgte durch eine Platin-katalysierte Hydrosilylierungsreaktion. Das Polymer wird dabei durch eine reaktive Si-H-Gruppierung an ein divinylisiertes Siloxan durch Hilfe eines Pt-Katalysators addiert [Vol26, Noll27, Kri28]. Diese Synthese kann auch dafür genutzt werden, um

funktionelle Gruppen in das Polymer mit einzubinden, die ebenfalls endständige Doppelbindungen besitzen. Diese Methode ist in der folgenden Abbildung 8 dargestellt. Grau unterlegt sind die reagierenden Atomgruppen. Eine ausführliche Charakterisierung und Diskussion des mit dieser Methode dargestellten Resorcin[4]aren-PDMS-System ist im Kapitel 4.1.2 zu finden.

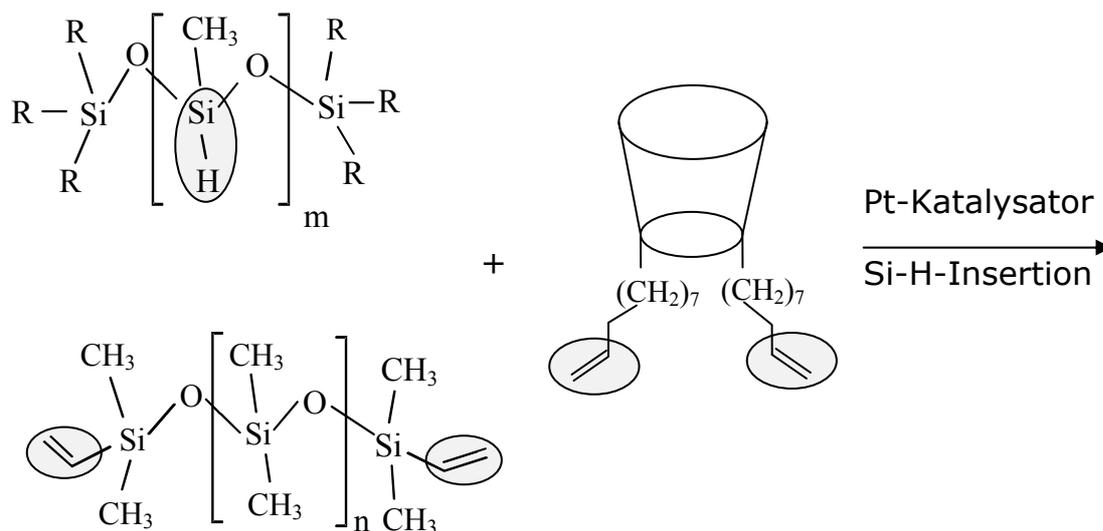


Abb. 8: Hydrosilylierungsvariante für den Einbau funktioneller Gruppen in das PDMS-Grundgerüst.

2.3.1.3 Molekular geprägte Polymere (MIP)

Ein weiteres Polymer-System, das untersucht wurde, war ein sogenanntes „Molecularly Imprinted Polymer (MIP)“, das ebenfalls als sensitive Schicht in der optischen Sensorik genutzt wird [Nop26, Bel33]. Dieses Polymer-System verfügt über spezielle Eigenschaften und findet Verwendung in der Festphasenextraktion und als Immunoassay. Es handelt sich bei den MIPs um robuste bzw. starre Polymere, die mit Poren durchsetzt sind und die für die Erkennung einer Vielzahl von Zielmolekülen strukturiert werden können. Sie weisen antikörperähnliche Affinitäten und Selektivitäten auf und besitzen aufgrund der Robust- und Starrheit des Polymergerüsts eine hohe Stabilität im Vergleich zu biologischen Erkennungsstrukturen. Molekular geprägte Polymere werden durch die Anwesenheit von Gastmolekülen (Templaten) hergestellt. Durch dieses Gastmolekül werden die gewählten funktionalen Monomere wie gewünscht ausgerichtet und erst danach durch eine Copolymerisation starr miteinander verknüpft. Nach Entfernen des Templates erhält man quervernetzte Polymere mit Bindungstaschen, deren Anordnung im

Polymer von den Gastmolekülen vorgegeben worden ist. Auf diese Art und Weise lassen sich hochspezifische Rezeptoren mit speziell gewählten funktionellen Gruppen in bestimmter Form und Anordnung, künstlich und einfach herstellen. Für die Anordnung der funktionellen Monomere im Templat gibt es zwei Möglichkeiten, einmal das kovalente Prägen und das nicht-kovalente Prägen. Eine ausführliche Beschreibung über die Thematik Molekular geprägter Polymere ist in [Inf30, Wul31, Hau32] zu finden. Für die in dieser Arbeit verwendeten MIPs wurde die Variante des nicht-kovalenten Prägens gewählt (Abb. 9) [Bel33]. Als funktionelles Monomer wurde MAA (Methacrylsäure) und als Copolymere für die Polymerisation EGDMA (Ethylenglycoldimethacrylat) und TRIM (Trimethylpropan-trimethylacrylat) verwendet. Als Referenzmaterial dienten ungeprägte MIPs, die sich von den geprägten MIPs lediglich durch das Fehlen des Templates unterschieden. Die Synthese der ungeprägten MIPs erfolgt auf dieselbe Weise wie bei den geprägten MIPs.

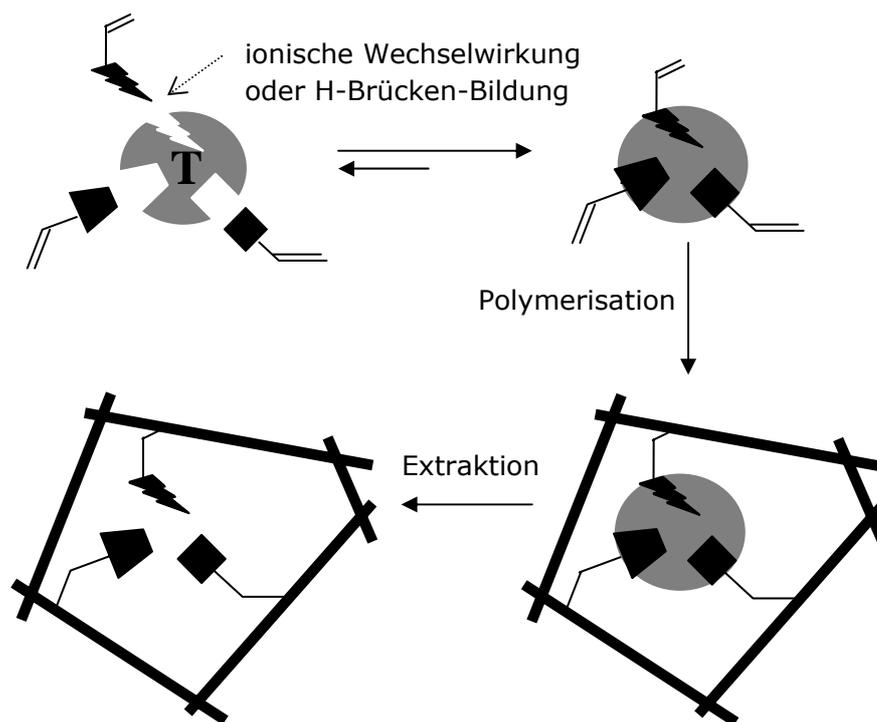


Abb. 9: Graphische Darstellung des nicht-kovalenten Prägens. T = Templat oder Gastmolekül.

2.3.1.4 Quellung von Polymeren

Bringt man ein Polymer in Kontakt mit einem Lösungsmittel, kommt es bis zur Einstellung eines Gleichgewichts zu einer Diffusion von Molekülen in das Innere des Polymers. Das Polymer quillt dadurch und das Netzwerk wird gestreckt. Dabei ändern sich die physikalischen Parameter wie Schichtdicke (d), Masse (m) und der Brechungsindex (n) [Zho34, Hau35, Spa36]. In Abbildung 10 ist die Quellung eines Polymers durch einen Analyten schematisch dargestellt. Der Effekt der Polymerquellung kann also durch einen Materietransport der Analytmoleküle aus dem Umgebungsmedium in das Polymer beschrieben werden. Die Konzentration der Analytmoleküle ändert sich dabei ständig bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist. Die Beschreibung eines solchen Diffusionsvorgangs erfolgt über das zweite Fick'sche Gesetz [Bra37]:

$$\left(\frac{\partial c}{\partial t}\right)_x = D \cdot \left(\frac{\partial^2 c}{\partial x^2}\right)_t \quad (40)$$

Aus der Differentialgleichung (40) ergibt sich damit die Abhängigkeit der Konzentration im Polymerfilm von Ort und Zeit. Dieser Quelleffekt von Polymeren wird in der Analytik für den Nachweis von organischen Verbindungen in Abwasser oder Luft genutzt [Kra38].

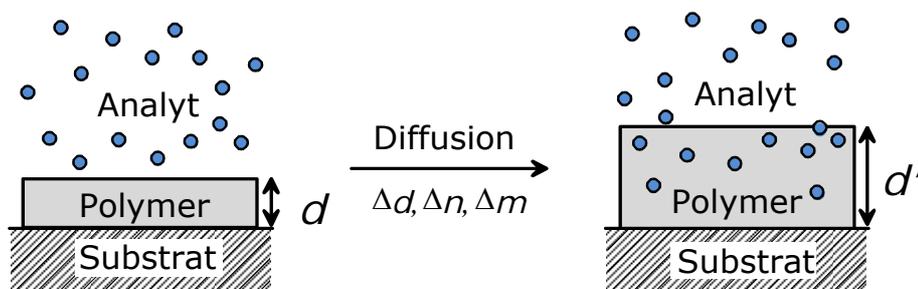


Abb.10: Polymerquellung unter Einfluss von Lösungsmittelmolekülen.

Die Quellung des Polymers hängt dabei unter anderem vom Vernetzungsgrad des jeweiligen Polymers ab. Bei steigender Vernetzung des Polymers, zeigt sich, dass die Quelleigenschaft abnimmt [Eli39]. Bei nicht vernetzten Polymeren kann es dagegen mit konzentrierten Lösungsmitteln zur Auflösung des Polymers kommen [Heh40]. Die Zunahme des Polymervolumens durch die Aufnahme von Lösungsmittelmolekülen wird als Sorption bezeichnet. Man findet in der Literatur [Nay41] verschiedene Typen

für das Sorptionsverhalten von Analytmolekülen in Polymeren. Die wichtigsten für diese Arbeit werden folgend kurz eingeführt:

Sorption nach Langmuir

Anhand dieses Modells werden Sorptionsvorgänge beschrieben, die zu einer Sättigung führen. Dieses Verhalten wird beobachtet, wenn das Polymer nur eine begrenzte Anzahl von Poren oder Bindungsstellen besitzt, welche durch die Analytmoleküle besetzt werden können. Die Sorption nach Langmuir wird durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$c = \frac{c' \cdot b \cdot p}{1 + b \cdot p} \quad (41)$$

c entspricht der Konzentration an sorbiertem Lösungsmittel, c' ist die Sättigungskonzentration, p der eingestellte Partialdruck und b ist die Affinitätskonstante.

Sorption nach Henry

In diesem Fall der Sorption ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der sorbierten Stoffmenge c im Polymer und dem Partialdruck p des Lösungsmittels mit der Proportionalitätskonstanten S , bei der es sich um einen Löslichkeitskoeffizienten handelt.

$$c = S \cdot p \quad (42)$$

Dieses Sorptionsverhalten wird beobachtet, wenn die Wechselwirkungskräfte zwischen Lösungsmittel/Polymer und Lösungsmittel/Lösungsmittel geringer sind als zwischen Polymer/Polymer.

Sorption nach Flory-Huggins

Dieses Sorptionsmodell wird beobachtet, wenn die Wechselwirkungskräfte zwischen Lösungsmittel/Lösungsmittel stark gegenüber den Kräften zwischen Lösungsmittel/Polymer sind. Folgende Gleichung lässt sich für unpolare Systeme formulieren:

$$\ln \frac{p}{p_c} = \ln \phi_1 + (1 - \phi_1) + \chi(1 - \phi_1)^2 \quad (43)$$

Das System wird dabei über den Dampfdruck p_c , den Volumenbruch des Lösungsmittels im Polymer ϕ_1 , den Dampfdruck des

Lösungsmittels p und über den Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ beschrieben. Der Löslichkeitskoeffizient nimmt dabei mit zunehmendem Partialdruck zu.

In Abbildung 11 ist die Abhängigkeit an sorbierter Stoffmenge vom Partialdruck des Lösungsmittels, für die oben genannten Sorptionsmodelle, schematisch dargestellt.

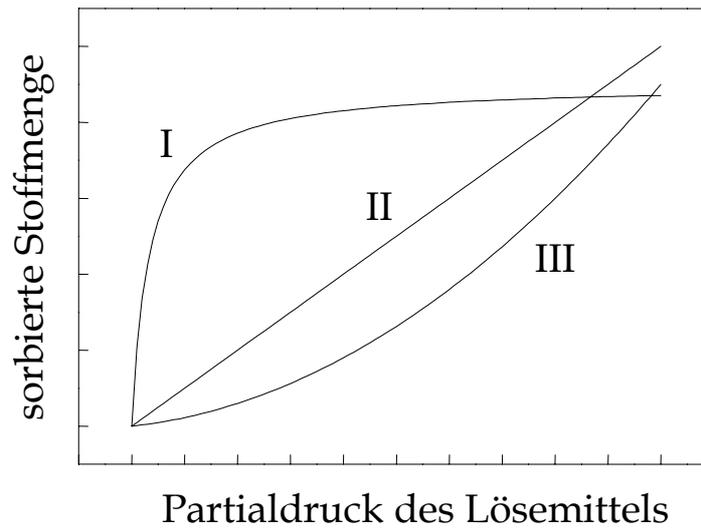


Abb.11: Schematische Darstellung des Sorptionsverhaltens nach Langmuir (I), Henry (II), Flory-Huggins (III).

2.4 Untersuchte biochemische Systeme

2.4.1 Progesteron Immunoassay

Das Progesteron (Gelbkörperhormon) ist das weibliche Sexualhormon (Abb. 12 a)) aus der Wirkungsgruppe der Gestagene. Es wird bei Frauen und Männern in geringen Mengen in der Nebennierenrinde synthetisiert. In größeren Mengen kommt es bei der Frau in der zweiten Phase des Menstruationszyklus und vor allem in der Schwangerschaft vor.

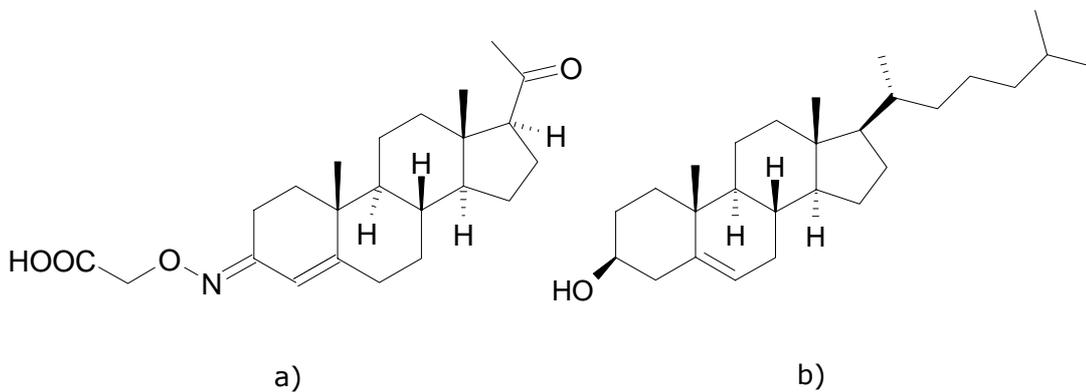


Abb. 12: Verwendetes Progesteronderivat in Kapitel 4.2.2 a) und Cholesterin b).

Im Körper des Menschen wird das Progesteron aus Cholesterin (Abb. 12 b)) synthetisiert. Es ist ein C₂₁-Steroid Pregnan.

2.4.2 PSA Immunoassay

PSA ist die Abkürzung für prostataspezifisches Antigen. Das PSA ist ein Eiweißstoff (Glykoprotein) von 34 kDalton, welches in der Vorsteherdrüse des Mannes (Prostata) produziert wird. Die Bildung des Proteins wird von den Androgenen kontrolliert. Die Halbwertszeit des freien PSA beträgt im Körper 2-3 Stunden, während das gebundene PSA eine Halbwertszeit von 48-72 Stunden hat. In der Urologie gehört das PSA mittlerweile zum wichtigsten Gewebemarker bei der Untersuchung von Prostatakrebs.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Schichtdickenänderung bei Aufbringen des PSA-Antigens und des PSA-Antikörpers auf Silizium-Wafer untersucht werden und diene zur Charakterisierung eines PSA Immunoassays [Käp74].

2.4.3 Perfluorierte Verbindungen und Lipide

Im Rahmen des von der EU geförderten Projektes BBMO (Biosensorysysteme basierend auf molekularer Organisation) stand die Grundentwicklung von Biosensoren, die später einmal anstatt von Tierversuchen in wissenschaftlichen Laboren zum Einsatz kommen sollten, im Mittelpunkt. Die sensitiven Bioschichten sollten dabei speziell für die Untersuchung von perfluorierten Verbindungen wie Perfluorooctansulfonsäure (PFOS) und Perfluoroactansäure (PFOA) eingesetzt werden.

Membranlipide

Die Bioschichten sollten dabei aus Membranlipiden wie den Phospholipiden bestehen. Der wichtigste Bestandteil der Biomembrane ist ihre Lipiddoppelschicht, speziell bei den Phospholipiden sind es phosphorhaltige Lipide (griechisch: lipos „Fett“). Die Lipide setzen sich dabei aus zwei hydrophoben Kohlenwasserstoffketten und einem hydrophilen Kopfteil zusammen (Abb. 13), und sind somit amphiphil. Der Aufbau der Phospholipide lässt sich in zwei Gruppen, Phosphoglyceride und Sphingomyelin, unterteilen.

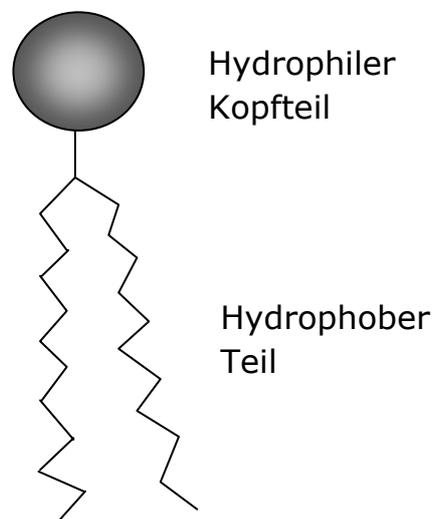


Abb. 13: Skizze eines Phospholipids mit hydrophilem und hydrophobem Teil.

In dieser Arbeit wurden speziell die zwei Phospholipide DMPE (1,2-dimyristoyl-sn-glyzerol-phosphatidylethanolamin) und DPPC (Dipalmitoyl-phosphatidylcholin) untersucht. Die polaren funktionellen Gruppen der beiden Phospholipide sind in Abbildung 14 dargestellt.

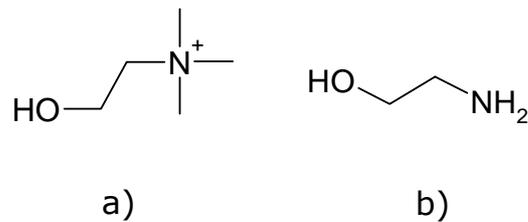


Abb. 14: Abgebildet ist die funktionelle Gruppe des Cholins (DPPC) a) und die des Ethanolamins (DMPE) b).

Perfluorierte Tenside

PFOS gehört zu den perfluorierten Tensiden (Abb. 15). Die besonderen Eigenschaften des PFOS liegen darin, dass der perfluorierte Teil des Moleküls sowohl hydrophob als auch lipophob ist, während der polare Teil hydrophil ist. PFOS dient in der Industrie aufgrund seiner Eigenschaften hauptsächlich dazu, Materialien, wie zum Beispiel Teppiche, Textilien und Papier wasser-, öl- und fettabweisend zu machen. Aufgrund der Umweltpersistenz, und Anreicherung in der Umwelt und in der Nahrungskette von Lebewesen wird PFOS als giftig eingestuft.

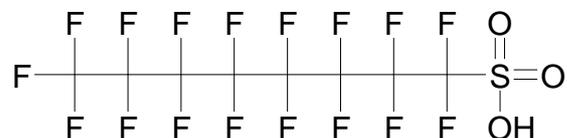


Abb. 15: Struktur des PFOS ($C_8HF_{17}O_3S$)

PFOA ist eine perfluorierte Alkylcarbonsäure und gehört zu den perfluorierten Carbonsäuren innerhalb der perfluorierten Tenside (Abb. 16). Das PFOA wird vor allem bei der Herstellung von Polymeren wie Teflon oder als fett- und wasserabweisende Beschichtung bei Karton- und Papierwaren eingesetzt. Ebenso wie das PFOS ist PFOA in der Umwelt persistent und bioakkumulativ.

Erst vor kurzen wurden hohe PFOS- und PFOA-Werte in Flüssen wie Rhein und Ruhr nachgewiesen, die von dort ins Grundwasser gelangten [Sku42].

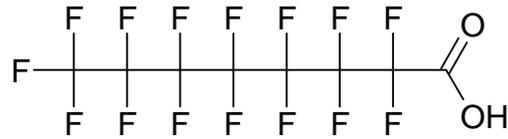


Abb. 16: Struktur des PFOA ($C_8HF_{15}O_2$)

2.4.4 SV40 VP1 und GM1

Affenvirus 40

Das Virus allgemein (lat. *Virus*, Gift) ist ein intrazellulärer Parasit in Zellen von Lebewesen. Viren sind kleinste Krankheitserreger, die aber keinen eigenen Stoffwechsel besitzen und somit nicht fähig sind sich selbst zu vermehren. Dafür brauchen sie die Zelle eines sogenannten Wirtes (eines Lebewesens). Das Virus enthält als Erbsubstanz entweder Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA), die in die Wirtszelle eingeschleust und damit gezwungen werden, neue Viren zu produzieren [Onm43].

Das SV40 Virus gehört zu einer der am häufigsten untersuchten Viren. SV40 ist die Abkürzung für "Simian vacuolating virus 40" und ist ein Poliomavirus, das zur Familie der Papovaviridae gehört. Poliomaviren sind kleine nicht umhüllte DNA-Viren. Im Jahre 1960 wurde das SV40 erstmals aus Affennierenzellen isoliert. Es wurde voraussichtlich Millionen von Menschen durch SV40-kontaminierten Kinderlähmungs-Impfstoff (Polio-Impfung) verabreicht, bevor es mit der PCR-Methode zuverlässig nachgewiesen werden konnte. Bisher sind beim Menschen direkt keine Krankheiten verursacht durch das SV40 bekannt, allerdings könnte es möglicherweise bei der Entstehung von Tumoren mitwirken. Bei Tieren verursacht SV40 nachgewiesen eine Vielzahl von Tumoren [Kur43].

Das SV40 besteht aus einer ikosaedrischen Proteinhülle mit einem Durchmesser von 45 nm, welche aus drei viralen Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 aufgebaut ist. Während VP1 das Hauptprotein ist, kommen die Proteine VP2 und VP3 nur in geringen Mengen vor. Es handelt sich um ein sogenanntes "nacktes" Virus, dessen Proteinhülle die äußere Schicht darstellt, welche auch die antigenen Eigenschaften des Virus bestimmt. Umhüllte Viren besitzen zusätzlich eine Membran auf der Proteinhülle. [Che44, Neu45]

Struktur von GM1 Gangliosid Rezeptor

Die Ganglioside sind über ihren Lipidanteil in der Zellmembran verankert und gehören zu der Gruppe der Glykosphingolipide mit einer oder mehreren Sialinsäuren. Das Hauptvorkommen der Ganglioside ist das Nervensystem, in dem eine große Anzahl an verschiedenen Gangliosiden angereichert ist. Die Mehrheit befindet sich dabei in der grauen Substanz des Gehirns. Außer der physiologischen Funktion, ist der GM1-Rezeptor auch die Bindungsstelle für das Cholera-Toxin. Der GM1-Ligand, beinhaltet fünf Kohlenhydrat-Reste. Die Form des GM1-Rezeptors ähnelt einem Ypsilon (Abb. 17), dabei bildet das Gal-(β 1-4)-Glc den Stamm des Gerüsts und NeuNAc (α -5-N-Acetyl-Neuraminsäure) und Gal-(β 1-3)-GalNAc die beiden Verzweigungen. Verknüpft werden die Komponenten dabei wie folgt: Gal-(β 1,3)-GalNAc-(β 1,4)-[NeuNAc-(α 2,3)]-Gal-(β 1-4)-Glc. Während das GM1 des Affen ein terminales α -5-N-Glycolyl-Neuraminsäure (NeuNGc) enthält, besitzt das menschliche GM1 an derselben Stelle die α -5-N-Acetyl-Neuraminsäure. Beide GM1-Varianten können als Rezeptor für das SV40 fungieren, wobei die Präsenz von NeuNGc die Bindung an GM1 erhöht [Cam46].

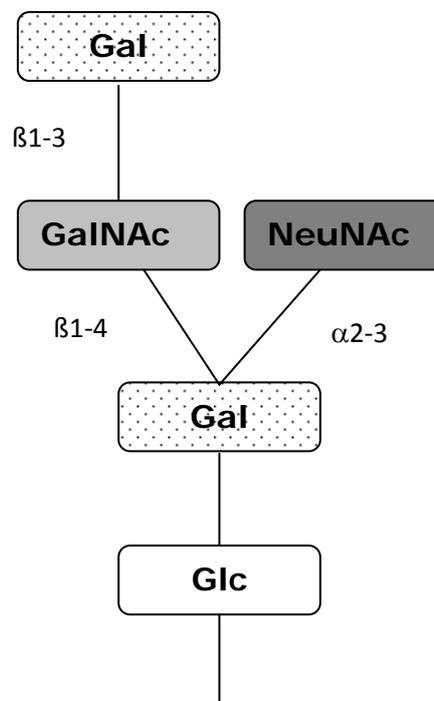


Abb. 17: Schematische Darstellung des GM1-Rezeptors.

SV40 VP1-GM1 Komplex

Die Kristallstruktur des VP1-Pentamers zeigt im Komplex mit dem GM1-Rezeptor, dass VP1 mit einer taschenförmigen Struktur an der Oberflächenaußenkante des Kapsids an den Oligosaccharidteil des Gangliosids bindet (Abb. 18) [Ste47, Ste48, Ste49]. Die Oberfläche des VP1-Hauptproteins besteht in diesem Bereich aus verbundenen β -Strängen mit einer B- und C- (BC-Schleife), D- und E- (DE-Schleife) und schließlich aus einer H- und I- (HI-Schleife) Schleife, (Abb. 18 vergrößert) [Lid51, Ste50]. Die Struktur wurde bei einer Auflösung von 2.25 Å bestimmt.

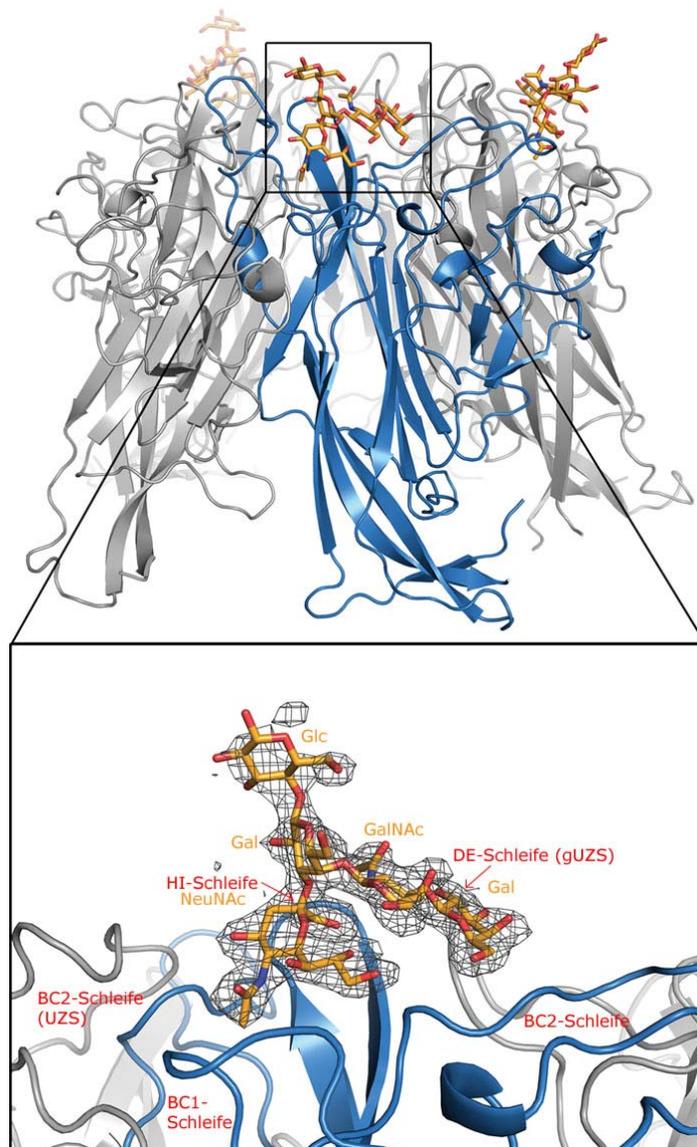
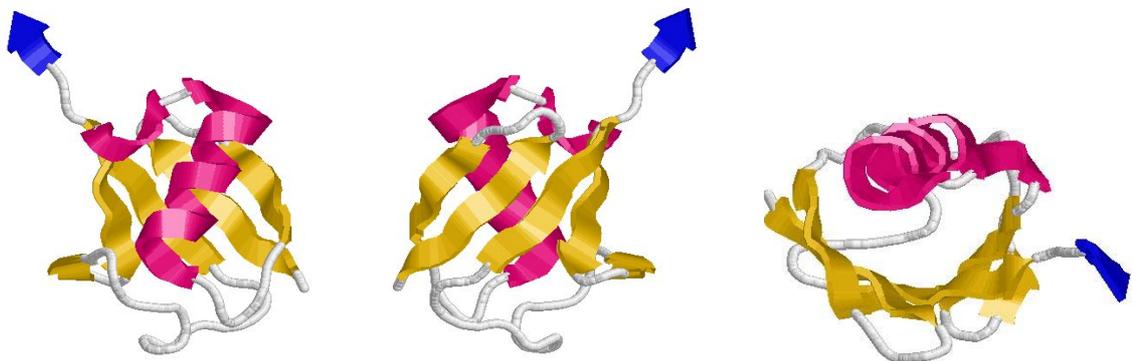


Abb. 18: Struktur des SV40 VP1-GM1 Komplexes (oben). Im unteren Teil ist vergrößert die Bindung des GM1 (orange Stäbe) an das VP1 (blaue und graue Bänder) dargestellt. (siehe Abbildungsverzeichnis)

2.4.5 Ubiquitin

Ubiquitin (Abb. 19) ist ein kleines hitzebeständiges Protein, das allgegenwärtig (ubiquitär) in eukaryotischen Zellen vorkommt. Es besteht aus 76 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 8,5 kDa und hat eine globuläre Struktur. Es wird nur langsam proteolytisch abgebaut. Das Ubiquitin ist ein starres Molekül, nur die funktionellen Reste des C-Terminus mit dem Glycin und dem Lysin der Aminosäurekette treten flexibel hervor. Durch kovalente Bindung von Ubiquitin an ein Protein wird dieses Protein zum Abbau im Proteasom markiert. Durch weitere Anbindung von Ubiquitin (Ubiquitinylierung) wird das markierte Protein schließlich abgebaut. Das Glycin dient dabei der Anbindung an das abzubauenende Protein. Über das Lysin können mehrere Ubiquitinmoleküle binden [Kum52, Fin53]. Das Ubiquitin des Menschen unterscheidet sich dabei von dem der Hefepilze nur um 3 Aminosäuren, zudem ist mittlerweile bekannt, dass Ubiquitin mit mehr als 1000 Enzymen interagiert und damit eine bedeutende Rolle in der Zelle spielt [May55, Gli56].



#Abb. 19: Darstellung von humanem Ubiquitin, das über 5 β -Faltblätter (ockerfarbig) und 2 α -Helices (magentafarbig) verfügt. Der C-Terminus, mit 2 Glycinen in blauer Farbe gezeigt, wird an andere Proteine geknüpft. Die 5 Faltblätter und die längere Helix bilden eine Struktur, die einem Fass ähnelt. (# siehe Abbildungsverzeichnis)

Es werden Proteine markiert, die fehlerhaft synthetisiert wurden, so dass der Abbau der Entsorgung von defekten und „alten“ Aminosäuren dient. Die bisher erzeugten Antikörper gegen Ubiquitin besitzen nur eine geringe Affinität im mittleren mikromolaren Bereich. Mit diesen markierten Antikörpern ist es nicht möglich, Ubiquitin ausreichend quantitativ zu bestimmen und damit Informationen über den Ubiquitinylierungsstatus zu beziehen [Rot54]. In allen Lebewesen wird der Proteinabbau und die Proteinhomöostase durch

das Ubiquitin geregelt und bei der Entwicklung degenerativer Krankheiten wie Formen von Alzheimer, dem Huntington-Syndrom oder Parkinson eine wichtige Rolle zugeordnet. Eine Beteiligung von Ubiquitin wird bei allen Krankheiten, bei denen die Proteinhomöostase nicht richtig funktioniert, angenommen [Col57-Wad64].

Aus diesem Grund sind Ubiquitinbinder mit hoher Affinität für die Forschung und für die Diagnostik von hohem wissenschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse.

2.4.6 Kooperativität

Die Kooperativität von biochemischen Systemen charakterisiert die Funktion von Carrier-Proteinen, darunter befinden sich Rezeptoren und Enzyme, die aus mehreren Untereinheiten (oligomere Proteine) bestehen. Das Phänomen der Kooperativität ist kinetisch gesehen sehr komplex. Besteht zwischen Untereinheiten eine Wechselwirkung, und zwar derart, dass die Bindung eines Substratmoleküls eine Konformationsänderung in den Untereinheiten induziert und diese Änderung auf benachbarten Untereinheiten übertragen wird, bezeichnet man dies als Kooperativität. Man unterscheidet zwischen positiver und negativer Kooperativität. Positive Kooperativität liegt vor, wenn die Untereinheiten so zusammenwirken, dass durch die Bindung des ersten Substratmoleküls die Bindung weitere Moleküle begünstigt und die Affinität eines Proteins bzw. Enzyms erhöht wird. Hemmt die Bindung des ersten Substratmoleküls die Bindung der weiteren Moleküle, spricht man von negativer Kooperativität. Die positive kooperative Bindung von Proteinen folgt, in einem V/S-Diagramm (enzymatische Umsatzgeschwindigkeit v (Y-Achse) als Funktion der Substratkonzentration $[S]$ (X-Achse)) einem sigmoiden Kurvenverlauf [Che44, Lüt65, Wik66, Bis67].

3. Material und Methoden

3.1 Geräteaufbau und Messverfahren

3.1.1 Verwendete Kalorimeter und Arbeitsweise:

In dieser Arbeit wurde das Mikrokalorimeter "Thermal Activity Monitor (TAM 2277)" der Firma TA Instruments (früher Thermometric AB, Schweden) verwendet. Es handelt sich um ein Gerät in Zwillingbauweise mit Probenzelle und Referenzzelle vom Typ 2277-201 und arbeitet im isoperibolen Betrieb, welcher sich zur Untersuchung von exothermen und endothermen Prozessen eignet, die im Temperaturbereich zwischen 275-368 K ablaufen. Reaktionen verursachen in der Messzelle (Abb. 18) einen Wärmefluss zwischen der Probe und dem äußeren Wärmebad. Dies hat eine Temperaturdifferenz ΔT zur Folge. Da die Wärmeleitung ausschließlich über die Halbleiterthermoelemente (Peltier-Elemente, Abb. 20) stattfindet, ist die quantitative Bestimmung der ausgetauschten Leistung $P(t)$ über die generierte Spannung $U(t)$ in den Halbleitern gegeben. Aus dem Integral des Spannungs-Zeit-Signals wird dann die ausgetauschte Wärmemenge ΔQ bestimmt. ε ist eine systemspezifische Kalibrierkonstante.

$$P = \frac{d(\Delta Q)}{dt} = \varepsilon * \frac{dU}{dt} \quad (44)$$

$$\Delta Q = \int P d(t) = \varepsilon \int U d(t) \quad (45)$$

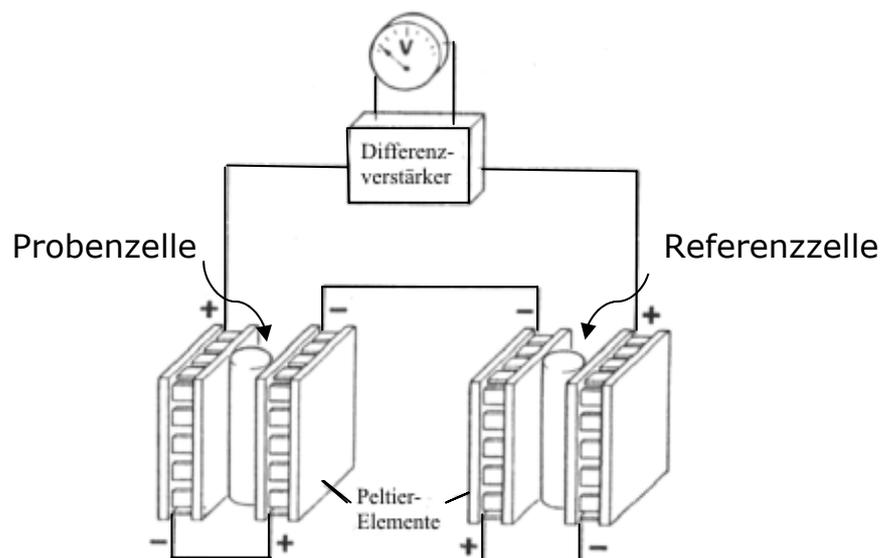


Abb.20: Halbleiterthermophile (Peltier-Elemente).

Die generierte Spannung U ist dabei proportional zur Temperaturdifferenz ΔT und dem Seebeck-Koeffizienten (Thermokraft des Metalls) g , dessen Einheit V/K ist:

$$U = g\Delta T = g(T_p - T_U) \quad (46)$$

Zusätzlich muss eine Zeitverzögerung, zwischen Wärmeaufnahme bzw. -abgabe und der Wärmemessung über die Thermophile, berücksichtigt werden.

$$\frac{dQ}{dt} = k(T_p - T_U) + C \frac{dT}{dt} \quad (47)$$

k mit der Einheit W/K ist dabei der Wärmeübergangskoeffizient. C ist die Wärmekapazität der Probe und des Probengefäßes. $C \cdot dT/dt$ repräsentiert damit die Wärmeänderung (bzw. Wärmeanreicherung) im Probengefäß während einer Reaktion. Aus

$$(T_p - T_U) = \frac{U}{g} \quad (48)$$

ergibt sich damit

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{k}{g} U + \frac{C}{g} \frac{dU}{dt}$$

bzw.

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{k}{g} \left(U + \frac{C}{k} \frac{dU}{dt} \right) \quad (49)$$

Folgend kann nun definiert werden:

$\varepsilon = \frac{k}{g}$ als systemspezifische Kalibrierkonstante und $\tau = \frac{C}{k}$ als Zeit-

konstante des Gerätes. Durch Einsetzen dieser beiden Konstanten in Gleichung (49) erhält man die Tian-Gleichung (50):

$$\frac{dQ}{dt} = \varepsilon \left(U + \tau \frac{dU}{dt} \right) \quad (50)$$

Die Einheit von ε ist W/V und liegt üblicherweise zwischen 2-6 W/V, während die Zeitkonstante die Einheit 1/s besitzt. Diese kann für ein Gerät mit einem Volumen von 5 mL ungefähr 0.01 1/s betragen [Gai90].

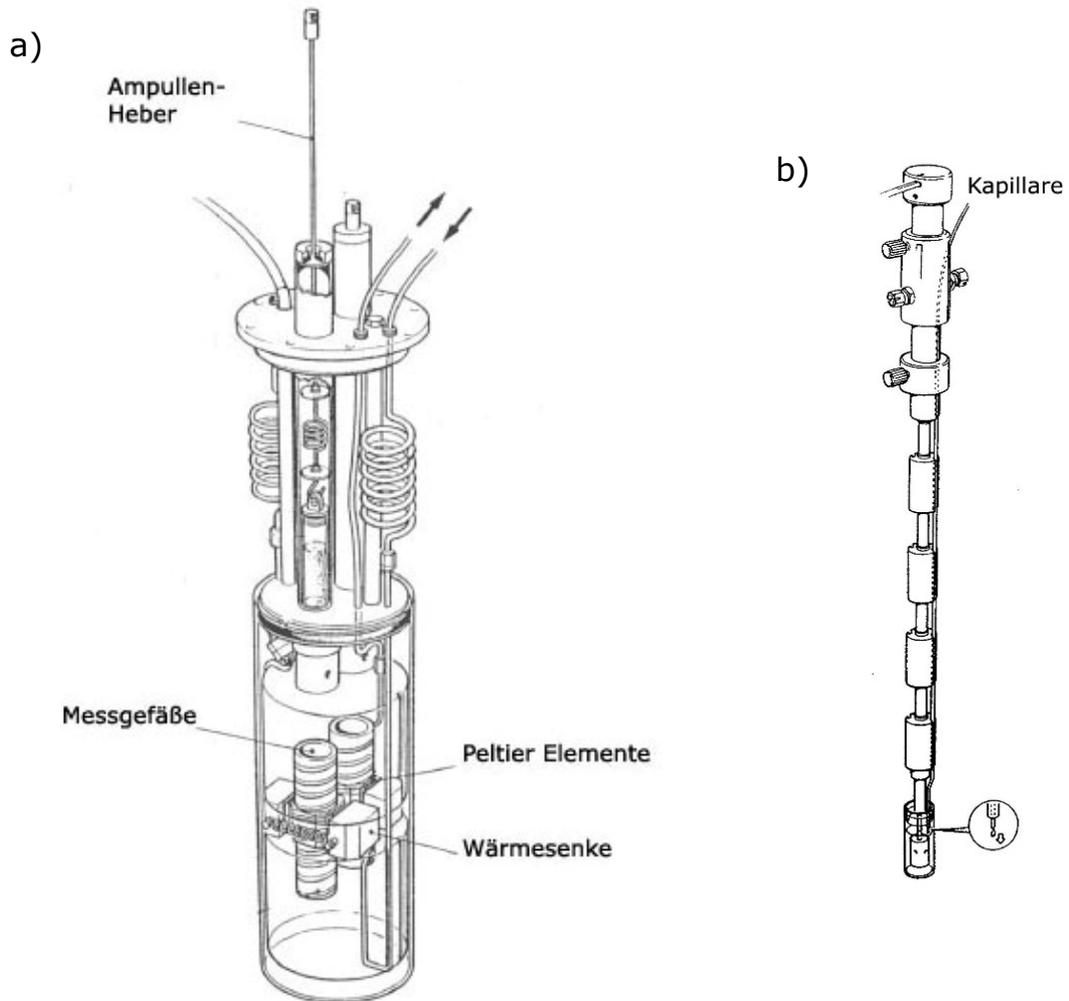


Abb. 21: Messzylinder a) und b) Mess- bzw. Referenzzelle

In Abbildung 21a) ist der Messzylinder des Kalorimeters TAM 2277 gezeigt. Dieser Zylinder taucht in ein sehr genau thermostatisiertes Wärmebad ein und enthält zwei identische Messgefäße, in denen verschiedene Messzellen eingesetzt werden können. In Abb. 21b) ist eine solche Messzelle abgebildet, an deren rechter Seite sich eine Kapillare befindet, durch die z. B. ein Ligand in die Zelle titriert werden kann. In einer der beiden Messgefäße findet der zu untersuchende Prozess statt, während sich im zweiten Messgefäß ein inertes Material befindet und es so als Referenzgefäß dient. Findet in der Messzelle ein chemischer oder biochemischer Prozess statt, so wird ein Wärmefluss zwischen dem äußeren Wärmebad (Wärmesenke) und der Messzelle verursacht. Die dadurch entstandene Temperaturdifferenz zwischen Wärmebad und Messzelle wird, mit einer hohen Empfindlichkeit, durch elektrische Spannung von thermophilen Elementen (Peltier Elemente) gemessen.

3.1.1.1 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit S_E eines Kalorimeters ist gegeben durch die erzeugte Spannung pro Wärmemenge:

$$S_E = \frac{\Delta U}{\Delta Q} \quad (51)$$

Dies bedeutet also, dass die Empfindlichkeit des Gerätes von der Wärmeaufnahmefähigkeit des Probengefäßes abhängt, da der Wert der Spannung U von der Temperaturdifferenz zu den Thermoelementen abhängt. Je kleiner die Wärmeaufnahmefähigkeit, desto größer ist ΔT und somit ΔU und S_E .

3.1.1.2 Kalibrierung

Elektrische Kalibrierung

Durch die elektrische Kalibrierung des Gerätes wird eine Proportionalitätskonstante, die sogenannte Kalibrierkonstante ε , bestimmt. Diese Konstante macht es möglich, aus der Summe der Thermospannungen (U) zwischen der Probenzelle und der Umgebung, die ausgetauschte Leistung (P) zu bestimmen. Dafür muss zuerst ein geeigneter Messbereich für ein geplantes Experiment gewählt werden. Das verwendete Kalorimeter besitzt folgende Messbereiche (3, 30, 100, 300, 1000, 3000 μW). Für den ausgewählten Bereich erfolgt mit Proben- und Referenzzelle (beide Gefäße sind mit demselben inerten Material gefüllt) dann die Kalibrierung. Dafür wird die Thermospannung zunächst auf Null und nachfolgend auf die maximal detektierbare Leistung des gewählten Messbereichs abgeglichen. Die maximale Leistung P_{kal} wird durch einen Heizwiderstand von $R = 50 \Omega$ und eine konstante Stromquelle I erzeugt:

$$P_{\text{kal}} = \frac{dQ}{dt} = I^2 R \quad (52)$$

Ist der Stromfluss I über eine bestimmte Zeit (t) bekannt, kann die Gesamtmenge der erzeugten Wärme bestimmt werden:

$$Q = I^2 R t \quad (53)$$

Diese Messbereichskalibrierung ist allerdings sehr aufwendig und erfolgte daher nur alle zwei Monate.

Dynamische Kalibrierung

Durch die dynamische Kalibrierung wird die Zeitkonstante τ des Kalorimeters bestimmt, siehe Gleichung (50). Die dynamische Korrektur wird vor allem bei kurzzeitig ablaufenden Experimenten wie z. B. Titrationsexperimenten wichtig, wo die Reaktionskinetik durch die Verzögerungszeit des Gerätes bedeutsam betroffen ist. Bei dem verwendeten Kalorimeter wird diese Kalibrierung automatisch von der verwendeten Software (DigiTAM 4.1) vorgenommen und erlaubt somit Titrationsexperimente innerhalb kurzer Zeiträume durchzuführen.

3.1.2 Verwendete Ellipsometer

Zur Charakterisierung dünner Polymer- und Biofilme wurde die Ellipsometrie verwendet. Dazu standen zwei Ellipsometermodelle zu Verfügung. Bei dem ersten verwendeten Ellipsometer handelt es sich um ein Spektraellipsometer der Firma SOPRA (Paris, Frankreich). Das Modell ES4G ist zur Bestimmung der optischen Konstanten über den gesamten sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums geeignet. Dabei erzeugt eine Xenonhochdrucklampe (210-2500 nm) ein nahezu unpolarisiertes Licht, das nach Durchlaufen des Polarisators (dieser rotiert bei einer Frequenz von 40 Hz) auf die Probe trifft. Das Gerät besitzt außerdem einen Doppelmonochromator mit Prisma und Gitter. Bei dem zweiten Ellipsometer handelt es sich um ein sogenanntes Null-Ellipsometer, der Firma Dr. Riss Ellipsometerbau (Deutschland, Ratzeburg). Es ist ein Polarisator moduliertes Modell ELX-02-C, mit monochromatischer Lichtquelle eines HeNe-Lasers.

In Abbildung 22 ist der Aufbau für das spektrale Ellipsometer schematisch dargestellt. Der Lichtstrahl wird von der Probe reflektiert und der Polarisationszustand des eingestrahlichten Lichtes ändert sich dabei. Danach durchläuft das Licht den Analysator und trifft auf den Monochromator, wo eine Wellenlängenselektion stattfindet.

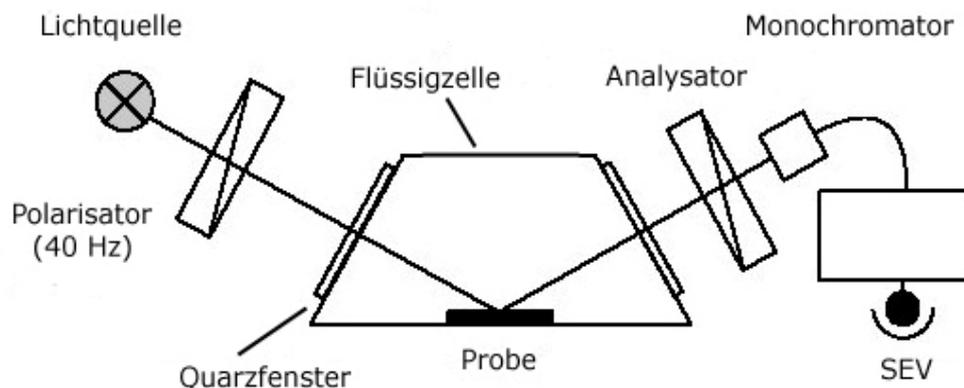


Abb. 22: Schematischer Aufbau der verwendeten Ellipsometeranordnung.

Über einen Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) wird das reflektierte Licht dann detektiert. Durch den rotierenden Polarisator wird das Licht linear polarisiert und führt zu einer periodisch modulierten Intensität im Detektor (Abb. 23).

Die Aufwärmphase des SEV im Sopra Gerät ES4G beträgt ungefähr eine Stunde. Der Einstrahlwinkel wurde für Messungen an Luft bei einem Wert von 70° gewählt. Die Messkammerfenster der Flüssigzelle, bestehend aus 2 mm dickem Suprasil II, sind ebenfalls unter einem Winkel von 70° angeordnet. Dabei wurde über einen Wellenlängenbereich von 400-800 nm mit 20-200 Messpunkten gemessen. Das Gerät wurde dabei mit dem Programm ELLI452 gesteuert. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software FilmWizard 32 der Firma Scientific Computing International (USA).

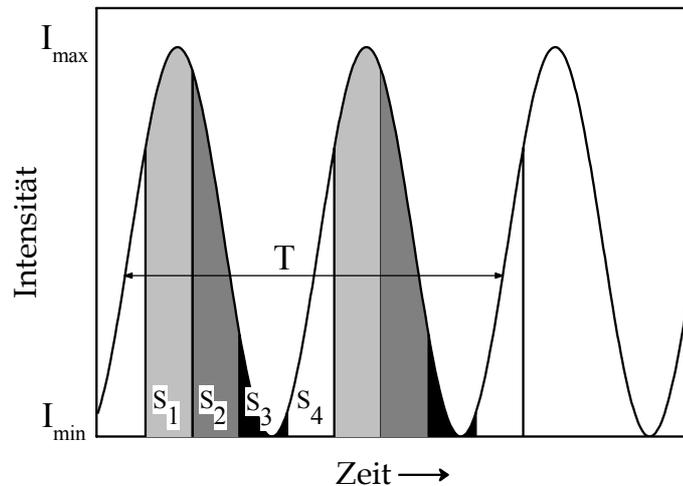


Abb. 23: Sinusförmige Intensitätsmodulation im Detektor. T steht für die Zeit, die der Polarisator für eine Rotation benötigt.

S_1 bis S_4 sind die aufsummierten Intensitäten. Die Intensitätsmodulation lässt sich wie folgt beschreiben:

$$I(t) = I_0(1 + a_2 * \cos(2\omega t) + b_2 * \sin(2\omega t)) \quad (54)$$

Bei einer Polarisatorumdrehung werden zwei Maxima und Minima der Intensität durchlaufen. Die Fouriergrößen a_2 und b_2 sind intensitätsunabhängig, während I_0 die mittlere Intensität darstellt. Durch Integration der Gleichung (54) über die Zeit können die Fouriergrößen a_2 , b_2 und die Intensität I_0 wie folgt bestimmt werden:

$$S_1 = \int_0^{T/8} I(t) dt \quad S_2 = \int_{T/8}^{T/4} I(t) dt \quad S_3 = \int_{T/4}^{3T/8} I(t) dt \quad S_4 = \int_{3T/8}^{T/2} I(t) dt \quad (55)$$

Daraus ergibt sich als Funktion von zeitlich summierten Intensitäten:

$$a_2 = \frac{1}{2I_0}(S_1 - S_2 - S_3 + S_4) \quad (56)$$

$$b_2 = \frac{1}{2I_0}(S_1 + S_2 - S_3 - S_4) \quad (57)$$

$$I_0 = \frac{1}{\pi}(S_1 + S_2 + S_3 + S_4) \quad (58)$$

Die gesuchten ellipsometrischen Winkel Ψ und Δ lassen sich aus den oben bestimmten Größen berechnen:

$$\tan \Psi = \frac{\sqrt{1+a_2}}{\sqrt{1-a_2}} * \tan A \quad \text{und} \quad \cos \Delta = \frac{b_2}{\sqrt{1-a_2^2}} \quad (59)$$

Der Faktor $\tan A$ berücksichtigt dabei die Abhängigkeit der Größen a_2 und b_2 von der Analysatorstellung.

Da die Werte im zu untersuchenden Wellenbereich nacheinander gemessen werden, kann es je nach Einstellung zu sehr langen Messzeiten kommen. Außerdem sind die Materialien dabei permanent dem Licht der Xenonlampe ausgesetzt. Dies kann zu einer stetigen Veränderung der zu untersuchenden Probe führen.

Die Aufwärmphase des Lasers des Null-Ellipsometers ELX-02-C beträgt ebenso eine Stunde. Da mit monochromatischer Lichtquelle gemessen wird, werden die unbekanntes Proben unter drei verschiedenen Winkeln, 65° , 70° und 75° , gemessen. Der Präfix „Null“ ergibt sich aus dem instrumentellen Aufbau. Die Winkelbereiche des Polarisators und Analysators werden so eingestellt, dass minimale Intensität („Null“) bei der Detektion resultiert.

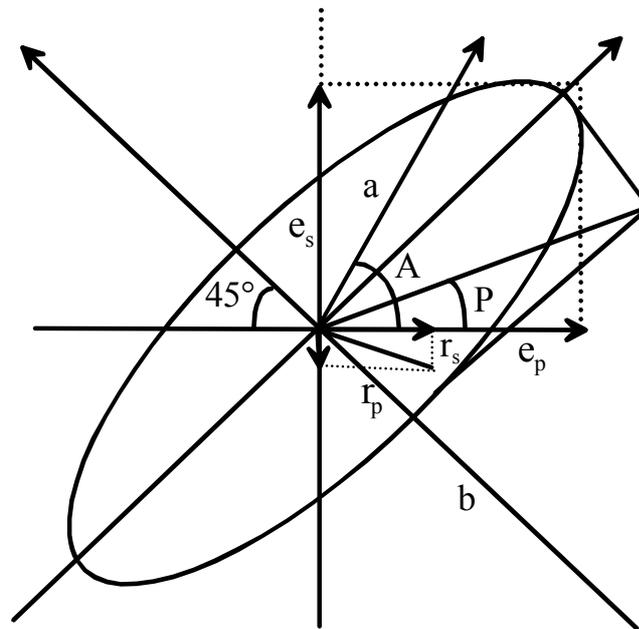


Abb. 24: Der Durchgang von Licht durch ein Null-Ellipsometer.

Die Zusammenhänge zwischen Ψ und Δ und den gemessenen Winkeln P und A aus Abbildung 24 sind gegeben durch:

$$\rho = \frac{r_p / e_p}{r_s / e_s} = \left(\frac{r_p}{r_s} \right) \left(\frac{e_s}{e_p} \right) = \tan \Psi \exp(i\Delta) \quad \text{mit} \quad (60)$$

$$\frac{r_p}{r_s} = \tan(A) \quad \text{und} \quad (61)$$

$$\frac{e_s}{e_p} = (b + ia)(b - ia) = \exp \left\{ 2i \tan^{-1} \left(\frac{a}{b} \right) \right\} \quad \text{wobei} \quad (62)$$

$$\frac{a}{b} = \tan(P + 45^\circ) \quad \text{ist und damit} \quad (63)$$

$$\rho = \tan \Psi \exp(i\Delta) = \tan(A) \exp(i(2P + 90^\circ)) \quad (64)$$

Am Beispiel der Beschreibung eines Dreischichtsystems (Abb. 25) wird die Verknüpfung der ellipsometrischen Winkel mit den optischen Konstanten deutlich.

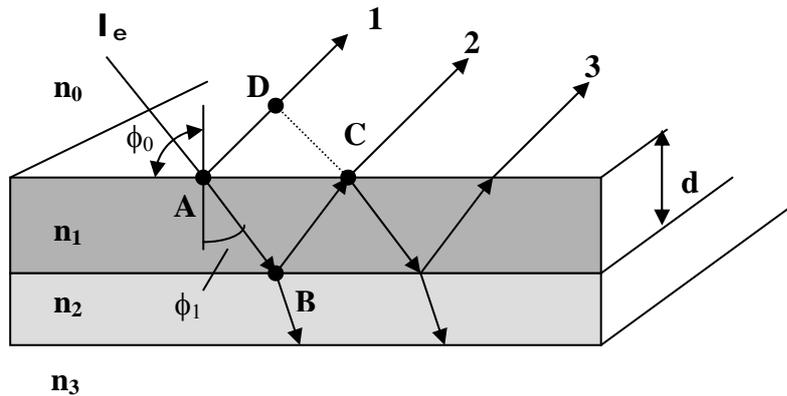


Abb. 25: Modellierung eines optischen Dreischichtsystems unter Berücksichtigung der Reflexion und Transmission.

$$\tan \Psi \cdot e^{i\Delta} = \frac{r_{12}^p + r_{23}^p e^{-i\beta_2}}{1 + r_{12}^p r_{23}^p e^{-i\beta_2}} \cdot \frac{1 + r_{12}^s r_{23}^s e^{-i\beta_2}}{r_{12}^s + r_{23}^s e^{-i\beta_2}} \quad (65)$$

$$\beta_2 = 4\pi \frac{d_2}{\lambda} \tilde{n}_2 \cos \Theta_2 \quad (66)$$

$$\tilde{n} = n \cdot (1 - ik) \quad (67)$$

Dabei entspricht r einem Fresnelschen Reflexionskoeffizienten, die Indizes p und s entsprechen dem parallel- bzw. senkrecht-polarisierten Licht, die Indices 0 bis 3 stehen für die verschiedenen optischen Medien, d_2 entspricht der Schichtdicke des Mediums 2, λ ist die Wellenlänge, Θ_2 der Transmissionswinkel in Medium 2, \tilde{n} die komplexe Brechzahl, n der Realteil und k ist der Imaginärteil der komplexen Brechzahl.

3.1.2.1 Ellipsometrische Messungen

Folgendes muss bei der Charakterisierung von Oberflächen mittels Ellipsometrie beachtet werden:

- Die Filme müssen homogen sein.
- Die Filmoberfläche muss sauber sein.
- Die Probe muss exakt im Lichtstrahl ausgerichtet sein.
- Die optische Konstante des umgebenden Mediums muss bekannt sein (z. B. $n_{\text{Luft}} = 1$).

- Bei Verwendung einer Messzelle muss diese ebenso exakt ausgerichtet sein und die Anisotropie der Kammerfenster muss berücksichtigt werden.
- Bei Multischichtsystemen empfiehlt es sich, jeweils die einzelnen Schichten nach jeder Präparation zu messen.

Nur unter diesen Voraussetzungen können die Ψ - und Δ -Werte ordnungsgemäß ausgewertet werden.

3.1.3 Weitere Geräte

- FT-Infrarot Spektrometer von Bruker, Equinox55, Karlsruhe.
- Spin-Coater, Convac 1001 von Convac, Wiernsheim.
- Oberflächenprofilmessgerät, Alphastep 500 von Tencor Instruments, Mountain View, Californien.
- Kontaktwinkelmessgerät CAM 200, KSV, Helsinki.
- AFM (Rasterkraftmikroskopie). Für die AFM-Abbildungen wurde ein Multimode TM SPM-Gerät der Firma Digital Instruments, Santa Barbara, Kalifornien, USA, verwendet. Die Proben wurden jeweils im Tapping-Mode vermessen. Je nach Oberfläche wurde ein Scanbereich zwischen 1 und 5 μm gewählt. Alle Messungen wurden an Luft durchgeführt.

3.2 Chemikalien

- Verwendete Analyten sowie Lösungsmittel und Puffer die hier nicht gesondert aufgeführt werden, wurden von den Firmen Fluka (Neu Ulm), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Seelze) bezogen.
- Die MIPs wurden messbereit aus Lund, Schweden, geliefert.
- Vollentsalztes Wasser (18,2 M Ω /cm) wurde mittels einer Filtrationsanlage MilliQ erhalten (Millipore, Eschborn).
- Die Siloxane und Silane wurden von ABCR (Karlsruhe) bezogen.
- Das GM1-Oligosaccharid-Natriumsalz stammt von Alexis Biochemicals, Schweiz.
- Polyklonaler Antikörper gegen Progesteron wurden vom King's College in London, Großbritannien, bezogen.
- AMD (Aminodextran), mit 100K Dalton, Innovent e. V., kam von Jena, Deutschland.
- α -PSA (Exbio) Monoklonaler Antikörper (Maus, IgG1) gegen Prostata-spezifisches Antigen, A67-B/E3, markiert mit Dyo-mics 647 (D0010506 (Dy/IgG=4,0), D0020506 (Dy/IgG = 2,2), D0030506 (Dy/IgG=6,6)), Exbio, Prag, Tschechien.
- GOPTS ((3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilan), MG: 236,3 g/mol, CAS: 2530838, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland.
- OVA (Ovalbumin), CAS: 9006591, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland.
- PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), besteht aus einem Teil des 10fach-PBS und neun Teilen deionisiertem Wasser. Der pH wird auf 7,4 eingestellt.
- Progesteronderivat, 4-Pregnene-3,20-dione 3-(O-carboxymethyl)oxime, MG: 387.51 g/mol, CAS: 50909-89-2, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schelldorf, Deutschland.
- PSA (Prostata Spezifisches Antigen), welches aus menschlicher Samenflüssigkeit durch Ionen-Austauschchromato-

graphie und Gelfiltration gewonnen wurde, MG: 33 kDa, Ex-bio, Prag, Tschechien.

- SDS, Natriumdodecylsulfat (10 %), MG: 288.4 g/mol, CAS: 151213, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland.
- Ubiquitin, aus rotem Rinderblutkörperchen, 25 mg, Sigma-Aldrich Holding AG, Buchs, Schweiz.

3.3 Substrate

3.3.1 Silizium-Wafer

Es wurden zwei verschiedene Phosphor- und Bordotierte Silizium-Wafer mit der Orientierung (111) eingesetzt. Zum einen native Wafer mit einer SiO_2 -Schicht von 2 nm der Firma Wacker (München) und zum anderen bedampfte Wafer mit einer SiO_2 -Schicht ca. 260 nm der Firma Silchem (Freiberg). Die Durchmesser der Wafer lagen bei 100 mm, die Dicke betrug 450 μm . Die Wafer wurden vor der Präparation in ca. 1 cm^2 (native Wafer) große Quadrate bzw. ca. 2 cm^2 große Rechtecke (bedampfte Wafer) geschnitten.

3.3.2 Glas-Wafer

Goethe-Glas

Für die RIfS-Messungen mit PDMS und PDMS-R4A wurde reflexionsverstärkendes Glas der Firma MSO (Mikroschichtoptik), Jena verwendet. Bei diesen Glasträgern handelt es sich um ein Mehrschichtsystem aus 45 nm Ta_2O_5 und 20 nm SiO_2 auf 1 mm D 263, die in 10 mm x 10 mm große Wafer geschnitten wurden.

Interferenz-Glas

Die RIfS-Messungen mit den MIPs erfolgte auf Interferenztransducern 10 x10 mm und 1 mm Dicke (D 273) und 10 nm Ta_2O_5 und 330 nm SiO_2 , von MSO (Mikroschicht Optik), Jena.

3.4 Präparation der sensitiven Chemoschichten

Die Arbeiten zur Präparation der sensitiven Schichten wurden unter Reinraumbedingungen durchgeführt.

3.4.1 Reinigung und Aktivierung

Die Reinigung der Silizium-Wafer war zugleich eine Aktivierung der Oberfläche für die folgende Silanisierung. Als Reinigungslösung wurde eine sogenannte Piranha-Lösung eingesetzt. Diese wurde im Verhältnis 2:1 aus konzentrierter Schwefelsäure und 30%-iger Wasserstoffperoxid-Lösung hergestellt. In dieser Lösung wurden die Silizium-Wafer 15 min im Ultraschallbad inkubiert, anschließend mit vollentsalztem Wasser gespült und darauf im Stickstoffstrom getrocknet.

3.4.2 Silanisierung der Oberfläche

Für die Silanisierung wurde eine 1%-ige Methacryloxypropyltrimethoxysilanlösung verwendet. Das Silan wurde durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Rütteltisch kovalent an die aktivierte Oberfläche gebunden und diente zur Kopplung für die kovalente Fixierung der sensitiven Polymerschicht. Die Silanisierung wurde durch Waschen in reinem Lösemittel (Toluol) gestoppt. Danach wurden die Wafer im Stickstoffstrom getrocknet.

3.4.3 Polydimethylsiloxan (PDMS)

Zur Herstellung der sensitiven Polydimethylsiloxan-Schicht (PDMS) wurde der Polymerisationsansatz aus Einzelkomponenten hergestellt (Abb. 26). In eine Lösung aus 333 μL Toluol und 167 μL getrocknetem Tetrahydrofuran wurden 75 μL DMS-V31 (Polydimethylsiloxan mit 0,18 – 0,26 % (w/w) endständigen Vinylgruppen) und 8,3 μL HMS-301 (Copolymer mit 25% SiHMe-Gruppen) pipettiert. Bevor die Polymerisation mit circa 70 μL des Katalysators SIP 6831 (1% (v/v) in Toluol) gestartet worden ist, wurde der Ansatz 3 min im Ultraschallbad inkubiert. Zusätzlich wurde nach jeder Zugabe 1 min von Hand geschüttelt.

Die Zusammensetzung des Polymerisationsansatzes wurde so gewählt, dass die Polymerisationszeit ca. 30 min beträgt. Während dieser Zeit können die Silizium-Wafer mittels Spin-Coating (On-Chip-Polymerisation) beschichtet werden.

Bei der Polymerisationsreaktion handelt es sich um eine Polyaddition, so dass die Freisetzung von Wassermolekülen während der Reaktion vermieden werden kann.

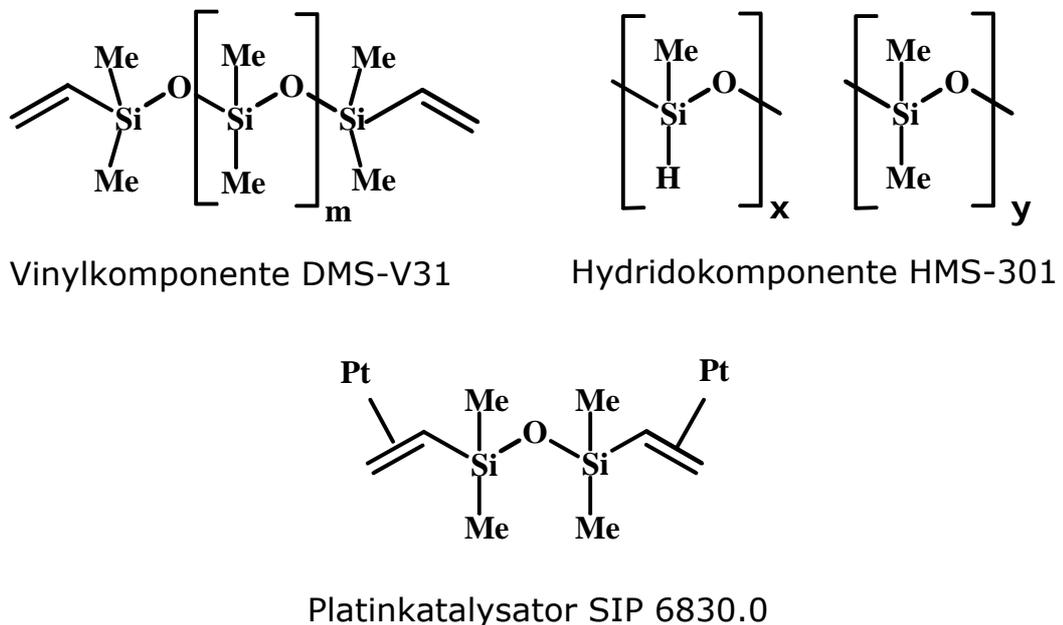


Abb. 26: Einzelkomponenten des On-Chip-Polymerisationsansatzes für die PDMS-Synthese.

3.4.4 Präparation der MIP-Interferenzschichten*

Das Interferenz-Glas wurde als erstes für 1 Stunde in einer wässrigen Lösung von 2.5 g/L PEI inkubiert und 3 mal mit bidestilliertem H₂O gespült und anschließend im Stickstoffstrahl getrocknet. Danach wurden die Wafer in einer wässrigen Lösung von 1 mg/15 mL Nanopartikeln inkubiert, folgend wieder gespült und mit Stickstoff getrocknet.

* (Synthese und Anbindung der geprägten und ungeprägten Polymere auf die Glassubstrate wurden von Frau Dr. A.-S. Belmont bzw. Dipl. Chem. S. Jäger durchgeführt.)

3.5 Präparationen der biochemischen Systeme

3.5.1 Vorbereitungen für ITC-Messungen

*SV40 VP1-GM1**

Der verwendete Puffer war 70 mM HEPES mit pH 7.55, 150 mM NaCl und 5 mM DTT. Der letzte Schritt der Reinigung des SV40 VP1 Proteins war eine Gelfiltration in den obengenannten Puffer. Danach wurde das Protein konzentriert, indem es durch eine halbdurchlässige Membran zentrifugiert wurde, die hochmolekulare Substanzen wie Proteine zurückhält und niedermolekulare Substanzen wie z. B. Pufferbestandteile durchlässt. Im Durchfluss der Proteinkonzentration wurde das GM1 Oligosaccharid gelöst.

Für die ITC-Messung wurden 23 x 12 µL GM1 Oligosaccharid (3.78 mM) zu 270 µL VP1 (0.9 mM) titriert. Es wurde dafür eine 250 µL Hamilton-Spritze und Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 1 mL verwendet. Das Protein wurde im Reaktionsgefäß vorgelegt und die Spritze mit dem Zucker gefüllt. Für die Referenzmessung wurden ebenso 23 x 12 µL mit einer Konzentration von 3.72 mM GM1 zur Pufferlösung getropft. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit der Software DigiTAM 4.1 und Origin 7.0.

*(Die Zucker- und Proteinlösungen wurden von Dipl. Biochem. Ursula Neu hergestellt.)

Ubiquitin-Peptide

Für die ITC-Messungen wurden fluoreszente Peptide synthetisiert.* Es wurde eine 500 µL Hamilton-Spritze sowie Reaktionsgefäße von 1 mL Volumen verwendet. Das Ubiquitin wurde in 1-40 µM und die

Peptide in 20-40 μM in PBS gelöst. Danach wurde eine der Lösungen im Reaktionsgefäß vorgelegt und mit jeweils der anderen Lösung die Hamilton-Spritze gefüllt. Es erfolgte eine thermische Äquilibration bis eine konstante Basislinie gemessen wurde. Darauf wurde die Messung gestartet und es erfolgte wiederholt die Zugabe eines Tropfens (20-30 μL) aus der Hamilton-Spritze in das Reaktionsgefäß unter Vermessung des zeitlichen Temperaturverlaufes. Die Auswertung der gemessenen Werte erfolgte mit der mitgelieferten Software DigiTAM 4.1 und Origin 7.0.

*(Die Synthese der Peptide erfolgte durch Dr. G. Roth)

3.5.2 Präparation der Lipidschichten *

Die Lipidschichten DMPE und DPPC wurden mit einem Druck von 50 mN/m auf die Glassubstrate aufgebracht. Die Präparation erfolgte anhand der Langmuir-Blodgett Technik [Blo68] durch mehrmaliges Eintauchen der Substrate in die jeweiligen Lipide. Eine ausführliche Beschreibung ist in [Bil69] und [Zaw70] zu finden.

*(Die Präparation der Schichten erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. R. Bilewicz.)

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchte Polymersysteme

4.1.1 Polydimethylsiloxan (PDMS)

4.1.1.1 Untersuchung mittels Ellipsometrie

Es soll die Beeinflussung des Polymers PDMS durch aromatische Verbindungen wie chlorierte Kohlenwasserstoffe sowie Toluol und Phenol (Abb.27) mittels spektraler Ellipsometrie untersucht werden. Im Rahmen der DFG-Forschergruppe „Reaction in Porous Media“, soll anschließend die untersuchte PDMS-Schicht in einem Tankmodell als optische Sensorschicht für die Schadstoffuntersuchung in Boden und Grundwasser von Flüssen zur Anwendung kommen. Chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW) sind vielseitig einsetzbare Verbindungen und finden bzw. fanden daher z. B. als Lösungs- und Reinigungsmittel Anwendung. Sie sind Ausgangsprodukte für bzw. Neben-, Zwischen- oder Endprodukte von Synthesen. Daneben findet bzw. fand man sie in Pflanzen-, Holzschutz- und Desinfektionsmitteln oder als Weichmacher. Alte Industriestandorte sind oft mit Überresten dieser Verbindungsklasse aus früheren Aktivitäten in Boden und Grundwasser verunreinigt [Ste70]. Nicht in die Reihe der CKW passen Phenol und Toluol. Phenol wurde ebenso als Desinfektionsmittel und Unkrautbekämpfungsmittel bekannt und Toluol ist ein wichtiges Lösungsmittel in Industrieproduktionen. Beide Chemikalien sind dadurch ebenfalls in Grund und Boden als Verunreinigung zu finden [Wik66].

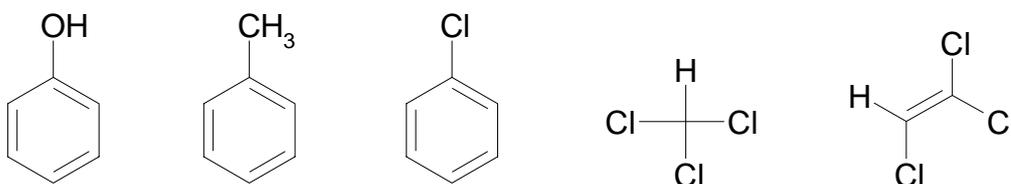


Abb. 27: Verwendete Analyte für die Charakterisierung des Wechselwirkungsverhaltens von PDMS.

Zusätzlich wurde als Analyt Salzsäure vermessen, da HCl bei der katalytischen Dechlorierung chlorierter organischer Lösemittel freigesetzt wird und somit deren Gegenwart in den zu untersuchenden Analyseproben zu erwarten ist. Bei jeder Messreihe wurden eine Wasserprobe und fünf Analytlösungen am Spektralellipsometer gemessen.

Analyte	Wasserlöslichkeit [g/L]	Eingesetzter Konzentrationsbereich [ppm]
Chloroform	8,3	100 bis 1000
Chlorbenzol	0,488	10 bis 50
Trichlorethylen	1,1	25 bis 125
Toluol	0,47	10 bis 90
Phenol	87	100 bis 1000
HCl	825	100 bis 1000

Tabelle 1: Eingesetzte Analyte mit Angabe der Wasserlöslichkeit und des eingesetzten Konzentrationsbereichs.

Für die Bestimmung der Schichtdicke und des Brechungsindex des Polymerfilms PDMS wurde folgendes Schichtmodell (Abb. 28) für die Anpassung an die gemessenen Werte erstellt:

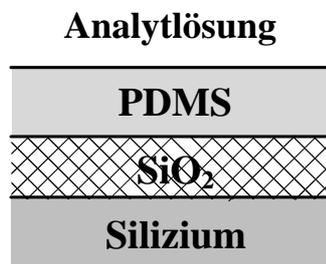


Abb. 28: Schichtmodell für die gemessenen Werte.

Die Polymerfilme wurden in eine Flüssigzelle (Abb. 22) mit der jeweils zu vermessenden Analytlösung (ca. 10 mL) eingebaut und im Wellenlängenbereich 400 - 800 nm bei einem Einstrahlwinkel von 70° ellipsometrisch vermessen. Für die Auswertung wurde das Cauchy-Modell verwendet. In den nachfolgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der verschiedenen Analyt-Gradient Messungen der PDMS-Schicht mit Ellipsometrie graphisch dargestellt. In Abbildung 29 sind die Ψ und Δ -Werte für die Messung eines PDMS-Films mit drei unterschiedlich konzentrierten Chloroformlösungen aufgetragen. Durch Analytzufuhr ändert sich die Dicke der Polymer-

schicht und dies zeigt sich in den Spektren von Ψ und Δ durch eine Verschiebung zu höheren Wellenlängen. Mit höher werdender Konzentration des Analyten von 100 ppm auf 1000 ppm Chloroform verschieben sich die Maxima der Ψ - und Δ - Werte um jeweils 65 nm zum langwelligen Spektralbereich hin. Je stärker die Filmdicke mit höherer Analytkonzentration zunimmt, desto stärker verschieben sich die Extremwerte in den Spektren bis sich bei sehr starkem Schichtwachstum neue Maxima bilden. Der Einfluss der Analyten auf die PDMS-Schicht lässt sich also mit den Ψ - und Δ -Spektren bestimmen.

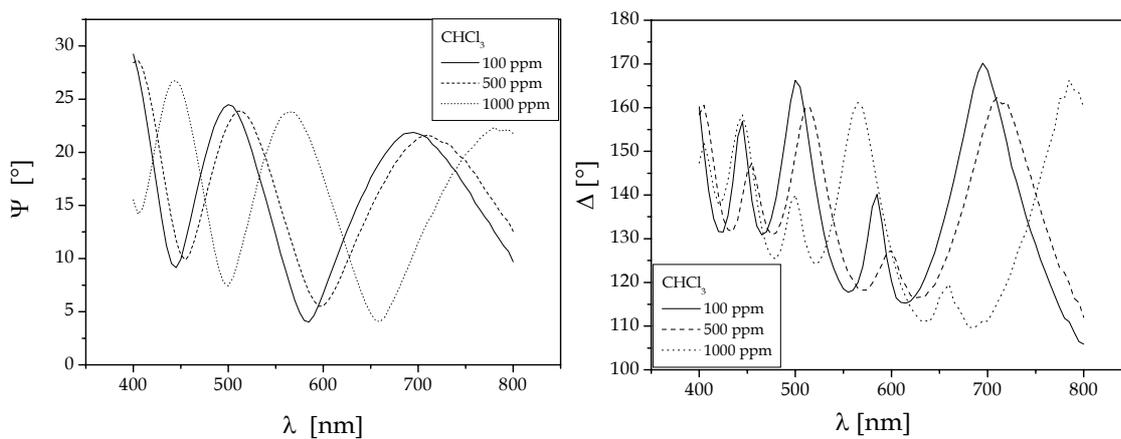


Abb. 29: Ψ und Δ -Werte für die Messung von PDMS mit unterschiedlichen Chloroformkonzentrationen.

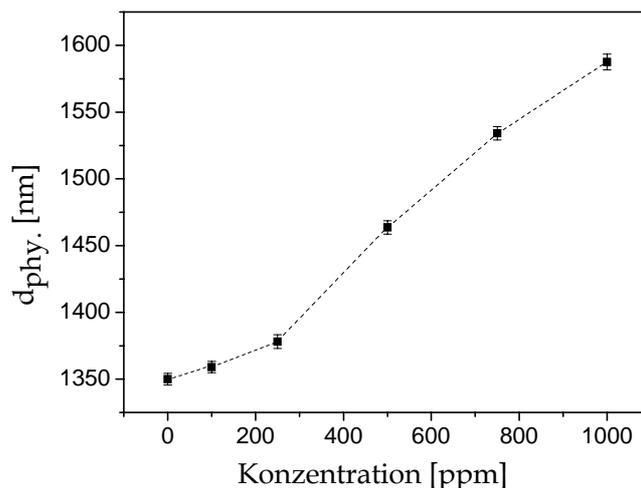


Abb. 30: Physikalische Schichtdicke der sensitiven PDMS-Schicht in Abhängigkeit der Chloroformkonzentration.

In Abbildung 30 zeigt sich für Chloroform in den ersten drei Schichtdickenbestimmungen eine lineare Abhängigkeit der physikalischen Schichtdicken der sensitiven PDMS-Schicht von der Chloroformkonzentration. Bei einer Konzentration von 500 ppm nimmt die physikalische Schichtdicke stärker zu und erreicht den Wert 1463.6 nm und steigt danach wieder linear mit der Analytkonzentration auf 1587.6 nm an. Außerdem erkennt man einen relativ starken Quell-effekt, zwischen der reinen Wasserprobe und der höchsten Chloroformkonzentration, die mehr als 200 nm beträgt. Der Brechungsindex (Abb. 31) von PDMS mit Chloroform zeigt ebenso eine Zunahme, allerdings mit Abweichungen von der Linearität.

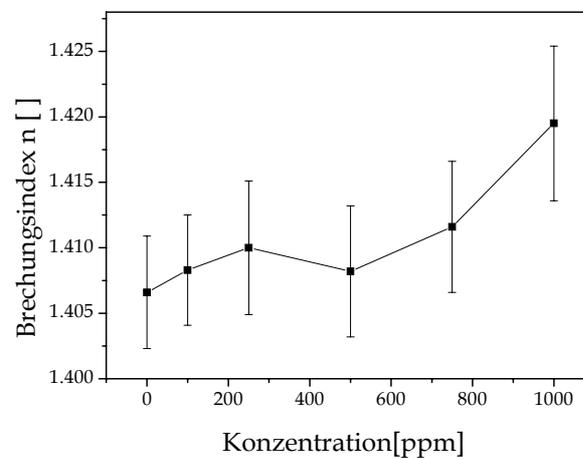


Abb. 31: Realteil des Brechungsindex in Abhängigkeit der Chloroformkonzentration.

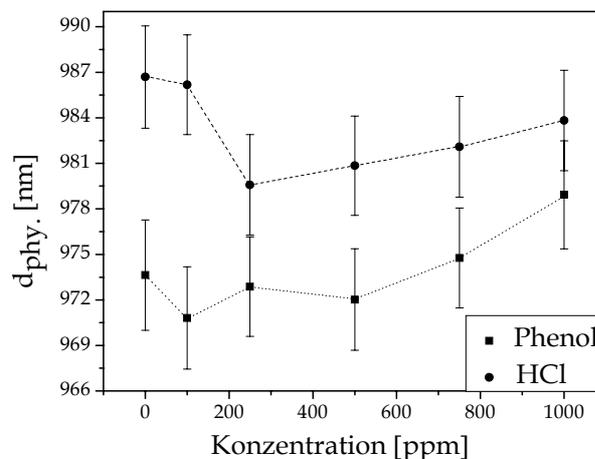


Abb. 32: Physikalische Schichtdicke der PDMS-Schicht in Abhängigkeit der Konzentration von Phenol- und Salzsäurelösungen.

Bei den Lösungen von HCl und Phenol (Abb. 32) ist zunächst eine Abnahme der Schichtdicke zu verzeichnen. Dann allerdings zeigt sich auch hier ein linearer Anstieg mit der jeweiligen Analytkonzentration. Eine Erklärung dafür wäre, dass zunächst eine Verdrängung der eingelagerten Wassermoleküle durch die Wasserstoffionen der Lösung erfolgt und dadurch eine Abnahme der Schichtdicke bewirkt wird. Im Folgenden diffundieren dann Wassermoleküle zur Ausbildung der Hydrathülle in die Polymerschicht.

Chlorbenzol, Trichloräthylen und Toluol in Abbildung 33 zeigen sowohl bei der Schichtdickenänderung als auch im Verhalten des Brechungsindex (Abb. 34) eine Zunahme mit steigender Analytkonzentration. Lediglich der letzte Wert bei Trichloräthylen in Abbildung 34 weicht davon ab.

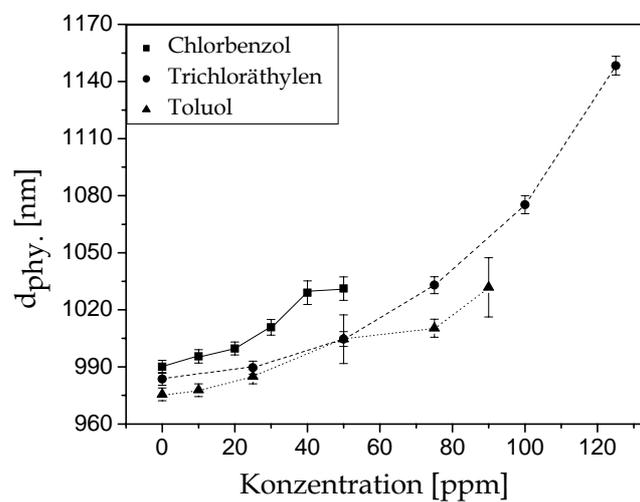


Abb. 33: Physikalische Schichtdicke der PDMS-Schicht in Abhängigkeit der Konzentrationen von Chlorbenzol, Trichloräthylen und Toluol.

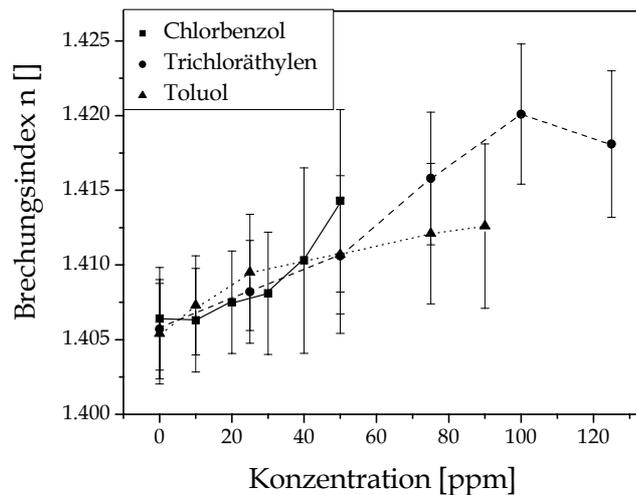


Abb. 34: Realteil des Brechungsindex in Abhängigkeit der verschiedenen Konzentrationslösungen.

Zusammenfassung

Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass sich durch die Quellung der sensitiven PDMS-Schicht die optischen Konstanten des Polymers konzentrationsabhängig ändern. Für Chloroform und Toluol wurde eine annähernd lineare Abhängigkeit der physikalischen Schichtdicke des Polymers PDMS von der Analytkonzentration gefunden. Dies entspricht einem Sorptionsverhalten nach Henry, siehe dazu Kapitel 2.3.1.4. Der Kurvenverlauf von Chlorbenzol könnte hingegen auf ein Sättigungsverhalten hindeuten, was hinsichtlich der Molekülgröße von Chlorbenzol denkbar ist und einem Sorptionsverhalten nach Langmuir entspricht. Der exponentielle Anstieg der PDMS-Schichtdicke durch die Einwirkung von Trichlorethylen spiegelt das Sorptionsverhalten nach Flory-Huggins wieder. Ganz anders verhält sich die PDMS-Schicht durch einwirken der HCl- und Phenol-Lösung. Dieses Quellverhalten entspricht keinem der erwähnten Sorptionsmodelle. Die Abweichungen der Brechzahlen von der Linearität sind u.a. auf die Cauchy-Parametrisierung zurückzuführen. Für dieses Modell muss eine gewisse Variabilität toleriert werden.

4.1.2 PDMS-R4A System

4.1.2.1 Untersuchung mittels ITC

Die Kalorimetrie ist eine Methode, die sich für die thermodynamische Charakterisierung von intermolekularen Wechselwirkungen eignet. Sie ist daher für ein besseres Verständnis chemischer und biochemischer Vorgänge von großer Bedeutung. In diesem Teil der Arbeit soll die Eignung des Polymersystems PDMS-Calixaren als sensitive Schicht mit speziell ausgewählten polaren Analyten (Abb. 35) untersucht werden.

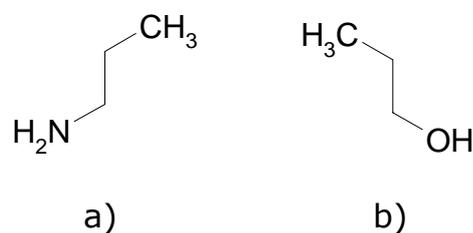


Abb. 35: Die polaren Analyten Propylamin a) und Propanol b) zur Charakterisierung des Wechselwirkungsverhaltens des PDMS-R4A Systems.

In den folgenden Experimenten wurden dabei je Messung 25 Titrationsschritte mit jeweils 4 μL der entsprechenden Analytlösung in H_2O (25 Vol-%) aus einer 250 μL Spritze zu

- 1) 2.7 mL reinem Wasser,
- 2) in 2.7 mL Wasser gequollenem PDMS-Polymer und,
- 3) ebenso in 2.7 mL Wasser gequollenem PDMS-R4A System,

titriert.

Zuerst wurde eine Lösung von Propylamin (0.031 mmol) in bidestilliertem Wasser getropft. Das resultierende Wärmesignal ist in Abbildung 36 dargestellt. Bei Zugabe der Propylaminlösung zum PDMS-Polymer, das über eine Woche in Wasser gequollen hat, erhält man das entsprechende Signal gezeigt in Abbildung 37. Dabei ist das erste positive Signal (Peak A) wiederum das Leistungssignal mit Wasser, während der zweite negative Peak B (Abb. 37 rechts) aus der Wechselwirkung mit dem PDMS-Polymer resultiert. Als nächstes wurde Propylamin zum Resorcin[4]aren-PDMS System titriert. Die resultierenden Leistungssignale lassen sich wie in Abbildung 38 mit der Wechselwirkung von Propylamin mit Wasser, mit dem PDMS-System und anschließend mit dem R4A beschreiben

(Peak C, Abb. 38 rechts). Mit positiven Signalen sind hier exotherme Reaktionen verbunden. Die zeitliche Verschiebung der Reaktionen lässt sich dadurch erklären, dass die Polymer-Systeme als Tablettenform am Boden des Probengefäßes fixiert wurden und mit 2.7 mL bidestilliertem H_2O aufgefüllt wurde. Dadurch muss der Analyt das Polymer erst erreichen.

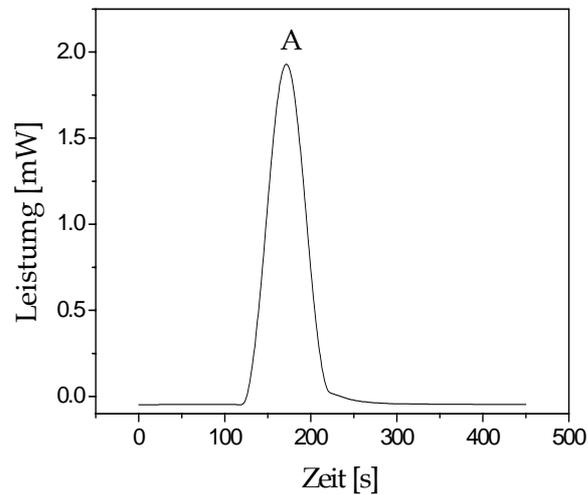


Abb. 36: Zeit-Leistungssignal für die Titration von Propylamin zu bidestilliertem H_2O .

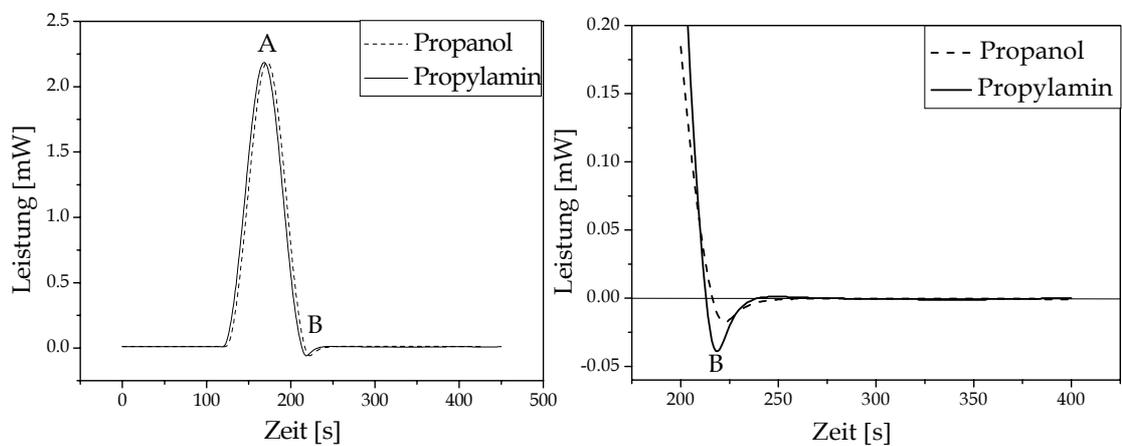


Abb. 37: Zeit-Leistungssignale für die Titration von Propylamin und Propanol zum PDMS-System. Rechts sind die entscheidenden Signale vergrößert dargestellt.

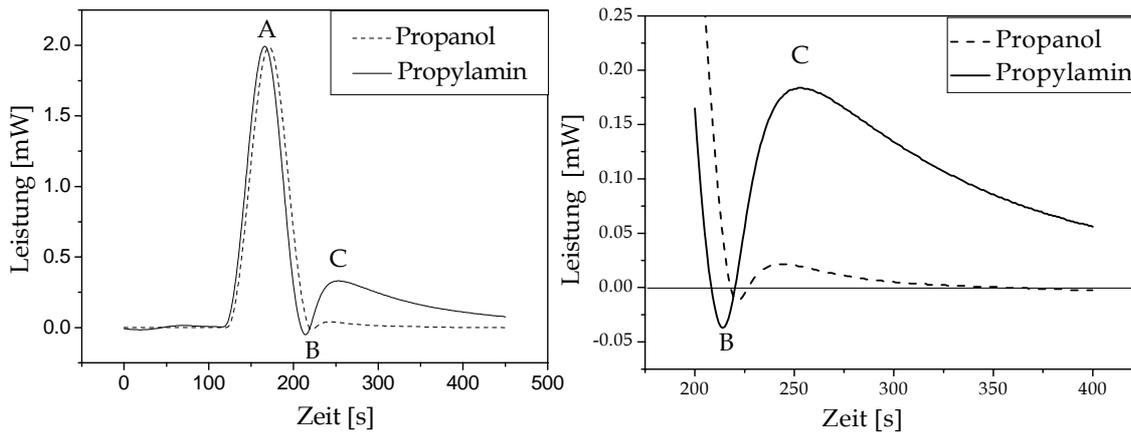


Abb. 38: Zeitabhängige Leistungssignale für die Titration von Propylamin und Propanol zum Resorcin[4]aren-System. Rechts vergrößert die Signale B und C.

Für die genauere Betrachtung der Wechselwirkung zwischen Propylamin und dem Selektor R4A wurden die resultierenden Wärmesignale integriert und als Funktion der Propylaminmenge aufgetragen (Abb. 39).

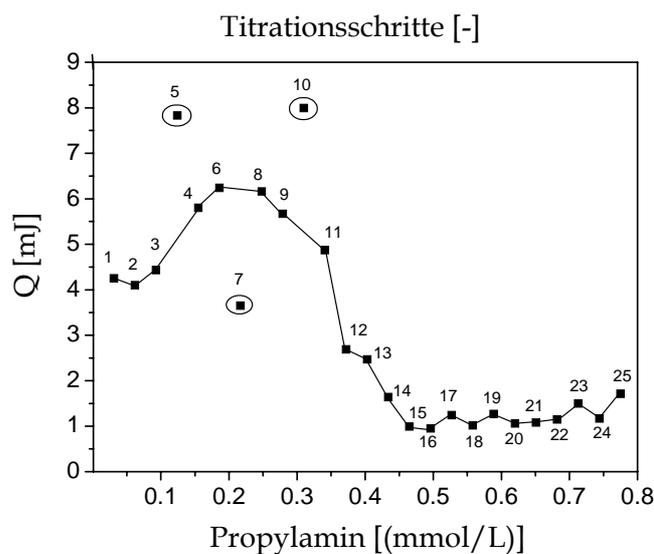


Abb. 39: Integrierte Titrationssignale von Peak C je Injektion Propylamin. Die Titrationsschritte sind in der Graphik einzeln vermerkt.

In den ersten 11 Titrationsschritten (0.031 mmol Propylamin) resultiert eine Wärmemenge im Bereich von 3 bis 8 mJ durch Wechselwirkung von Propylamin mit dem Selektor R4A. Mit steigender Belegung der Bindungsstellen des Polymers (Titrationsschritte 11-14) ist eine Abnahme der Wärmemenge bis zur vollständigen Sättigung der Bindungsstellen zu erkennen. Weitere Titrationen führten nur zu schwachen und unspezifischen Wärmesignalen. Die eingekreisten Werte sind durch die Geräteempfind-

lichkeit entstandene Werteschwankungen die überwiegend durch äußere Einflüsse entstehen.

Auf die gleiche Art und Weise wie für Propylamin wurde die Wechselwirkung von Propanol und dem PDMS-R4A Polymer bestimmt. Ebenso wurden 4 μL (0.04 mmol) Propanol zu

- 1) 2.7 mL bidestilliertem Wasser,
- 2) in 2.7 mL H_2O gequollenem PDMS-System und,
- 3) in 2.7 mL H_2O gequollenem PDMS-R4A System

titriert.

Wie in Abbildung 37 (gestrichelt) gezeigt, resultiert durch Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel Peak A, Peak B aus der Interaktion mit PDMS und die Wechselwirkung mit dem Selektor R4A ergibt Peak C (Abb. 38, gestrichelt). Die Wärmemenge der integrierten Titrationssignale wird dabei nicht größer als 2 mJ pro Injektion der Propanollösung (Abb. 40). Im Vergleich mit der Wärmeentwicklung von zirka 6 mJ bei Propylamin lässt sich daraus eine stärkere Wechselwirkung von Propylamin mit dem Selektor R4A schließen. Aus stöchiometrischer Sicht mit 0.04 mmol Propanol und 0.031 mmol Propylamin, zeigt sich dass pro Sauerstoffatom des R4A mehr Propanol also Propylamin zu Verfügung steht.

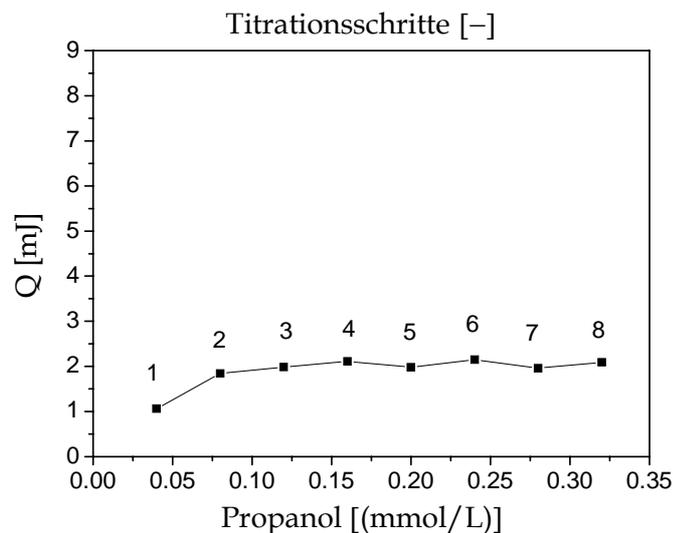


Abb. 40: Integrierte Titrationssignale von Peak C pro Injektion Propanol. Die Titrationsschritte sind in der Graphik einzeln vermerkt.

Durch die zeitliche Verschiebung des Wärmeflusses lässt sich erkennen, dass die Wechselwirkung mit dem PDMS-Polymer für beide Analyten stattfindet und entscheidend für die Sorption des Analyten ist. Eine Wechselwirkung beider Analyten mit dem Selektor R4A konnte mit der ITC sehr gut nachgewiesen werden.

4.1.2.2 Untersuchung mittels RfS

Für die Untersuchung von drei unterschiedlichen PDMS-R4A Schichten und dem nicht modifizierten PDMS wurden acht Analytkonzentrationen zwischen 0 und 20 g/L eingesetzt. Die Konzentration des Selektors R4A wurde dabei unterschiedlich gewählt. In Abbildung 41a) und b) sind die Kalibrierkurven für n-Propanol und n-Propylamin mit unterschiedlichen Polymerschichten dargestellt. Während in Abbildung 41a) ein lineares Sorptionsverhalten (Sorption nach Henry) mit Propanol erhalten wird, ergibt sich bei Wechselwirkung von Propylamin und den gewählten Polymerschichten ein Kurvenverlauf, der in eine Sättigung übergeht (Abb. 41b)). Dieses Sorptionsverhalten nach Langmuir lässt auf eine vollständige Besetzung der Bindungsstellen bei hoher Analytkonzentration schließen.

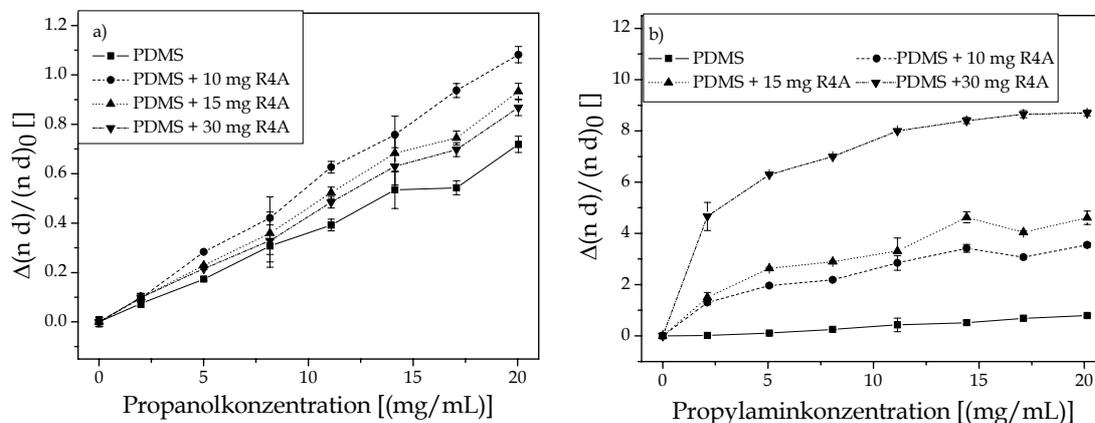


Abb. 41: Mit RfS in flüssiger Phase erhaltenen Kalibrierkurven für a) n-Propanol und b) Propylamin.

Die Empfindlichkeiten (S) der PDMS-Schichten sind als Steigung der Kalibrierkurven gegeben. Zusätzlich wird eine normierte Empfindlichkeit eingeführt, um speziell die Wechselwirkung des Selektors R4A von der Wechselwirkung des PDMS-Grundgerüsts zu trennen. Dabei ist die normierte Empfindlichkeit durch

$$S_{normiert} = \frac{S_{Selektor}}{S_{PDMS}} \quad (68)$$

gegeben. In Abbildung 42 ist die Empfindlichkeit (S) für das PDMS-R4A System, im Vergleich zum nicht modifizierten PDMS für die Analyten n-Propanol und Propylamin gezeigt.

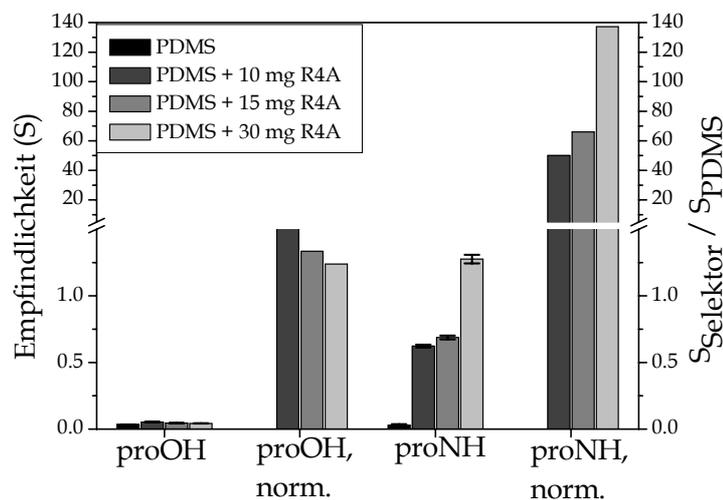


Abb. 42: Empfindlichkeit und normierte Empfindlichkeit für n-Propanol und Propylamin.

Bei n-Propanol ist mit Zunahme der R4A-Konzentration eine leichte Abnahme der Empfindlichkeit zu erkennen, während bei Propylamin hingegen eine Zunahme mit steigender R4A-Konzentration zu verzeichnen ist. Auf der rechten Seite der Abbildung 42 sind jeweils die normierten Empfindlichkeiten (Gl. 68) aufgetragen, und es wird verdeutlicht, dass die normierte Empfindlichkeit umso stärker ist je höher die R4A-Konzentrationen im Polymer wird.

Um die Wechselwirkungskinetik zwischen sensitiver Polymerschicht und Analyten zu bestimmen wurde die zeitaufgelöste RfS-Messung herangezogen. Dafür wurde ein sogenannter Austauschfaktor R bestimmt. Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis der maximalen Desorptions- zur maximalen Sorptionsgeschwindigkeit. Somit ist

$$R = \frac{v_{\max \text{ Desorption}}}{v_{\max \text{ Sorption}}} \quad (69)$$

In der folgenden Abbildung 43 sind die zeitlichen Änderungen der optischen Schichtdickenänderungen für den nicht modifizierte

PDMS-Sensor und dem PDMS-R4A-Sensor gezeigt. Nach ungefähr 16.1 Minuten wurden die Ventile des Lösungsmittelflusses auf die jeweiligen Analyten Propanol und Propylamin umgeschaltet und über die sensitive Polymerschicht geleitet. Das Sorptions- und Desorptionsverhältnis für das nicht modifizierte PDMS-System ergab für beide Analyten mit 0.987 für Propanol und 1.103 für Propylamin annähernd gleiche Austauschraten (Abb. 43a)). In Abbildung 43b) ist eine vergleichbare Sorption wie für das Resorcin[4]aren-PDMS-System erkennbar. Nach ungefähr 32.5 Minuten wird der Analytfluss abgeschaltet und eine deutliche langsamere Desorption von Propylamin mit einer Austauschrate vom 0.306 im Vergleich zum Propanol mit 1.046 wird beobachtet. Dies lässt sich, wie schon bei den Ergebnissen mit der Mikrokolorimetrie, auf eine stärkere Bindung der funktionellen NH_2 Gruppe des Analyten Propylamin mit dem Reaktionszentrum des Selektors R4A zurückzuführen. In Abbildung 44 wird das Verhältnis der Austauschraten im Vergleich gegenüber gestellt, und die stärkere und spezifische Bindung der NH_2 Gruppe des Propylamins an die funktionelle Gruppe des Selektors verdeutlicht.

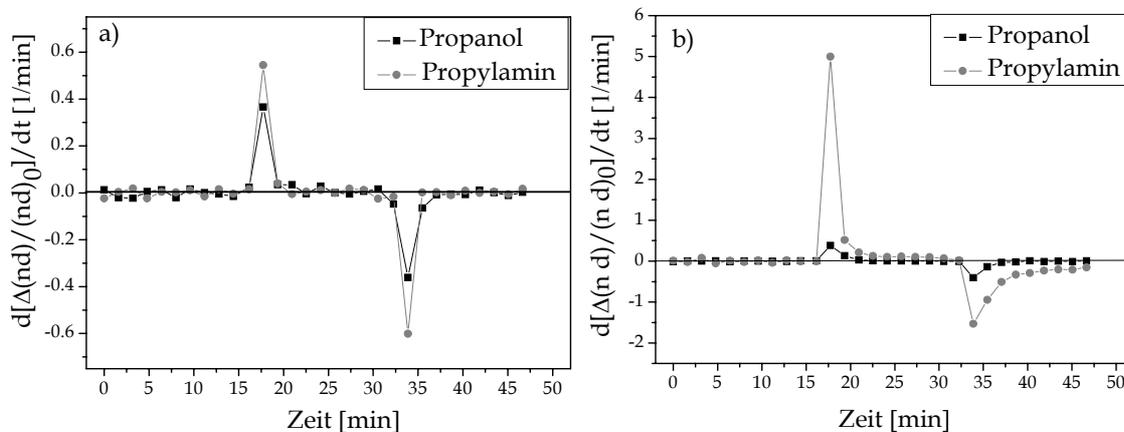


Abb. 43: Kinetik der Analytwechselwirkung mit a) PDMS und b) PDMS + 30 mg R4A.

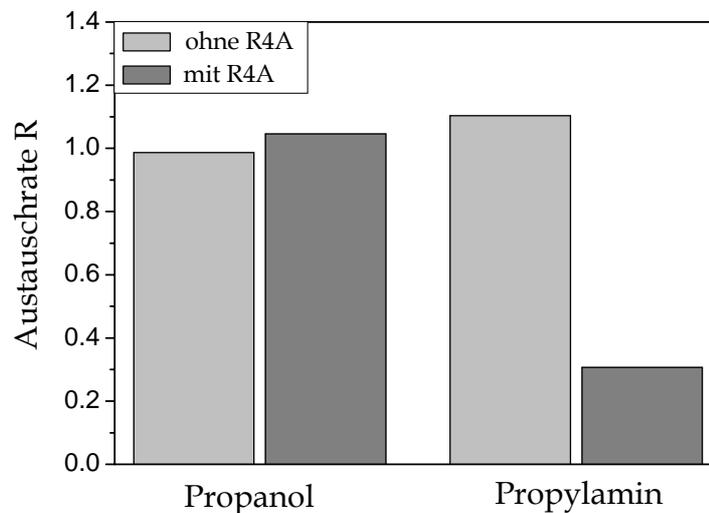


Abb. 44: Austauschrate R von Propanol und Propylamin bei Wechselwirkung mit PDMS und PDMS + 30 mg R4A.

4.1.2.3 Untersuchung mittels IR

Die Infrarotspektroskopie fand in den letzten Jahren mehrfach Anwendung im Bereich der Sensorik [Mas71] und wurde für die strukturelle Charakterisierung der Sensoroberflächen eingesetzt [Coz71]. Anhand von IR-spektroskopischen Messungen sollte nun auch die strukturelle Änderung des Selektors R4A bei Wechselwirkung mit Propylamin und Propanol bestimmt werden. Allerdings zeigte sich gleich am Anfang der Messreihe, dass die Signale mit Propanol zu schwach für eine aussagekräftige Interpretation der Spektren waren. Daher werden in diesem und im folgenden Kapitel 4.1.2.4 ausschließlich die Wechselwirkungen des Selektors mit Propylamin beschrieben. In Abbildung 45 sind die ATR FT-IR Spektren für das Lösungsmittel Chloroform, für den Analyten Propylamin, dem Selektor R4A und zwei Spektren des Analyt-R4A-Komplexes mit zwei unterschiedlichen Volumen an Propylamin gezeigt. Für die Beschreibung der Wechselwirkung des Selektors R4A mit dem Propylamin Molekül, wird sich im Folgenden die Diskussion insbesondere auf die C=O Streckschwingungsbande des Selektors R4A und die Aminogruppe des Analyten Propylamin konzentrieren. Die C=O Streckschwingung der Carbonylgruppe ist bei 1760 cm^{-1} (Abb.45) als breite Bande mit einer ausgeprägten Schulter bei 1737 cm^{-1} zu beobachten. Die Breite der Bande resultiert dabei aus der intermolekularen Wechselwirkung zwischen den R4A Molekülen

(Abb. 7). Im IR-Spektrum wird weder von Chloroform noch von Propylamin in diesem Bereich eine Absorptionsbande erhalten. Das IR-Spektrum des R4A-Propylamin-Komplexes wird in Abbildung 45d) gezeigt. Die molekulare Wechselwirkung wird dabei durch eine Abnahme der Intensität der Bande bei 1760 cm^{-1} und durch Entstehung einer neuen Bande bei 1673 cm^{-1} angedeutet. Die neue Bande bei 1673 cm^{-1} kann dabei der C=O Streckschwingung zugeordnet werden, die sich aufgrund der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem O Atom der Carbonylgruppe und dem H Atom von Propylamin zu niedrigeren Wellenzahlen verschiebt. Die Verschiebung um 87 cm^{-1} weist auf eine starke Wasserstoffbrückenbindung hin. Die Intensitätsabnahme der Bande bei 1760 cm^{-1} deutet außerdem daraufhin, dass nicht alle Bindungsstellen des Selektors R4A besetzt wurden. Bei dieser Konzentration von 0.0058 mmol R4A und $0.44\text{ mmol Propylamin}$, entsprechen jedem Carbonyl-O-Atom des Selektors R4A aus stöchiometrischer Sicht, 10 Propylamin Moleküle. Bei höherer Propylaminkonzentration nimmt die Intensität der Streckschwingung zu und die Bande erscheint bei 1678 cm^{-1} (Abb. 45e)), eine weitere Bande der Carbonylgruppe des Selektors ist in diesem Spektrum nicht mehr zu sehen. Daraus lässt sich schließen dass alle O Atome der Carbonylgruppe von R4A an der Wechselwirkung mit den Propylamin Molekülen beteiligt sind.

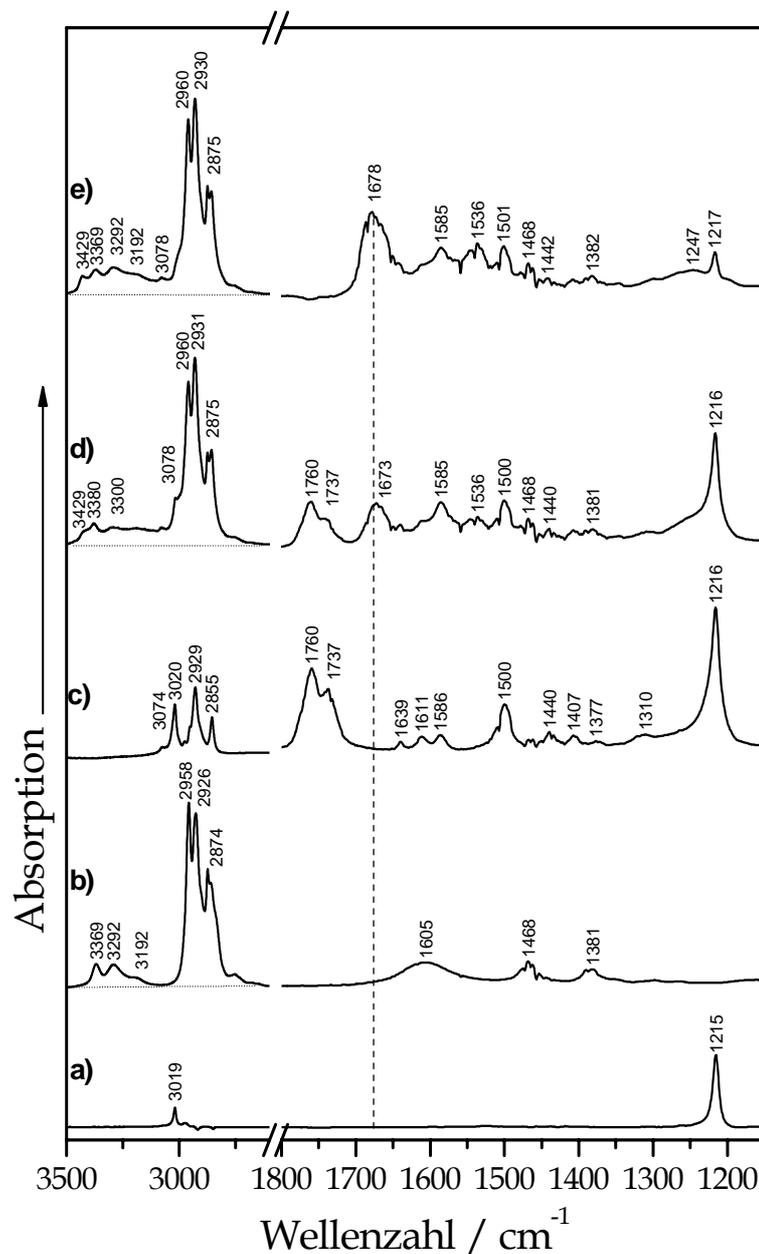


Abb. 45: ATR FT-IR Spektrum von a) Chloroform, b) Propylamin, c) 10 mg R4A gelöst in 20 μL Chloroform, d) 10 mg R4A in 50 μL Chloroform und 36.5 μL Propylamin und e) 10 mg R4A gelöst in 50 μL Chloroform und 73 μL Propylamin. Die gestrichelte Linie zeigt die Verschiebung der C=O Streckschwingung des Selektors R4A bei 1760 cm^{-1} bei Wechselwirkung mit Propylamin mit unterschiedlichen Konzentrationen d) 36.5 μL und e) 73 μL .

Auch über die H Atome der Aminogruppe des Propylamins lässt sich die Wechselwirkung mit R4A im ATR FT-IR Spektrum im hohen Wellenzahlbereich nachweisen. Die symmetrischen und un-

symmetrischen Streckschwingungen der NH_2 Gruppe sind im Spektrum b) bei 3292 und 3369 cm^{-1} zu finden. Aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen der Propylamin Moleküle befindet sich die Bande, die bei 3074 cm^{-1} endet, bei niedriger Wellenzahl als erwartet. In der Gegenwart von R4A Molekülen zeigt die Streckschwingungsbande eine Ausbreitung zu niedrigeren und höheren Wellenzahlen (Abb. 45d)), welche sich aber allgemein zu einer höheren Wellenzahl bei 3429 cm^{-1} verschiebt. Diese Verbreiterung der Bande ist auf die Wechselwirkung der H Atome von Propylamin mit den O Atomen der Carbonylgruppe von R4A zurückzuführen. Zusätzlich erscheint eine Bande mit zwei schwachen Spitzen bei 3300 und 3380 cm^{-1} , die durch die Überlappung der Absorptionsbande der NH_2 Gruppe in Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe entsteht und der Absorptionsbande von NH_2 Molekülen welche nicht an der Wechselwirkung mit R4A beteiligt sind. Bei Betrachtung des Spektrums e) mit höheren Volumen an Propylamin sind die charakteristischen Absorptionsbanden von Propylamin bei 3292 und 3369 cm^{-1} nach wie vor vorhanden. An der Intensitätszunahme der Bande die bei 3429 cm^{-1} endet, lässt sich eine Erhöhung an Propylamin welches nicht an der Wasserstoffbrückenbindung mit der Carbonylgruppe von R4A beteiligt ist im Vergleich zum Spektrum d), erkennen.

4.1.2.4 Untersuchung mittels ^1H NMR

Auch mit der Kernresonanzspektroskopie lässt sich die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Propylamin und R4A nachweisen. In Abbildung 46 ist das ^1H NMR Spektrum von Propylamin gezeigt a) und in b) der Mischlösung aus R4A und Propylamin. Die Protonen der Aminogruppe des Propylamins sind im Spektrum a) bei $\delta = 1.19$ ppm zu sehen. In Anwesenheit des Selektors R4A erscheinen die Protonen der NH_2 Gruppe bei $\delta = 1.09$ ppm. Die Verschiebung der Bande um $\Delta\delta = -0.1$ ppm rührt von der Abschirmung der Protonen der NH_2 Gruppe durch die Wasserstoffbrückenbindung mit den O Atomen der funktionellen Gruppe A von R4A her (Abb. 7). Die Elektronendichte nimmt aufgrund der freien Elektronenpaare an den Sauerstoff- und Stickstoffatomen, die an der Bildung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Protonen der NH_2 Gruppe und den O Atomen von R4A beteiligt sind, zu.

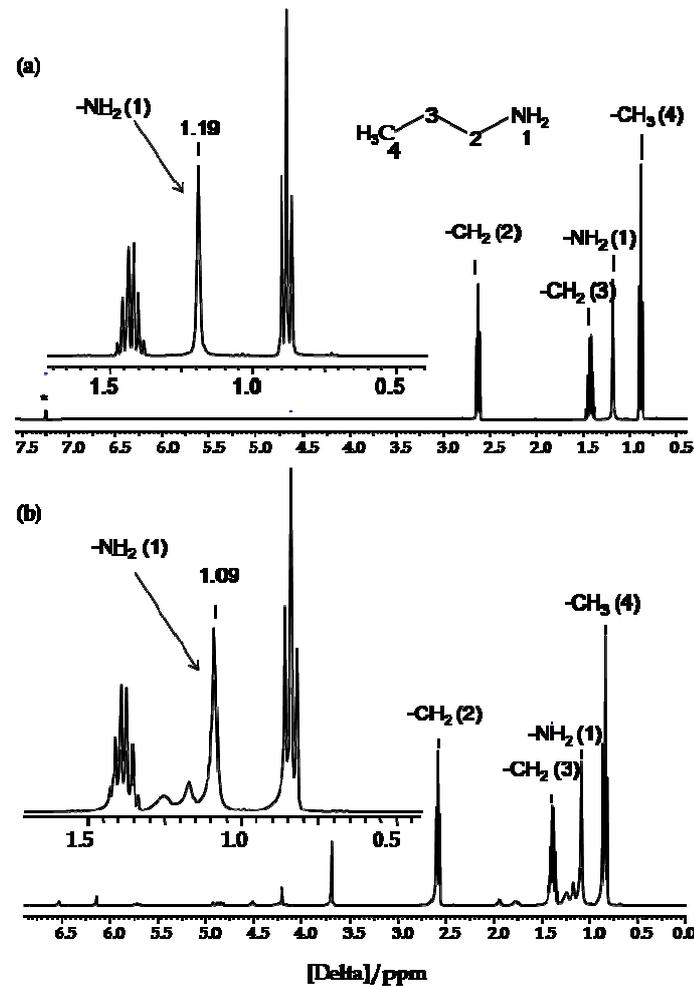


Abb. 46: ¹H NMR Spektrum von a) 14 µL Propylamin gelöst in 2 mL Chloroform und b) 10 mg R4A gelöst in 20 µL Chloroform und 36.5 µL Propylamin (1:76).

Zusammenfassung

Eine umfangreiche Untersuchung des PDMS-R4A Systems mittels Mikrokalorimetrie und spektroskopischen Methoden wurde durchgeführt, um das Wechselwirkungsverhalten des Polymers besser zu verstehen. Die Charakterisierung der Wechselwirkungskinetik mittel RIfS zeigt, dass die Stärke der Wechselwirkung durch die funktionellen Gruppen und strukturelle Umgebung des Analyten bestimmt wird. Insbesondere Oberflächen mit einer funktionellen Gruppe, die zur Wasserstoffbrückenbindung geeignet sind, binden bevorzugt stark mit dem Reaktionszentrum von R4A. Aber eine genauere Bewertung der Bindungsstärke war mit RIfS alleine nicht möglich, deshalb wurden weitere Methoden für ausführlichere Quantifizierungen herangezogen.

Um die Wärmeentwicklung bei Wechselwirkung zwischen dem R4A und den Analyten Propylamin und Propanol zu bestimmen, wurde die ITC gewählt. Dabei zeigten die Kalorimetriemessungen, dass die Wechselwirkungen von R4A mit Propylamin um einiges stärker sind als die von R4A und Propanol. Somit konnten anhand der Kalorimetrie die RIfS Messungen bestätigt werden.

Die Tatsache, dass mit IR- und ^1H NMR-Spektroskopie keine klar erkennbaren Signale der Wechselwirkung von R4A mit Propanol erhalten wurden, bekräftigen zusätzlich, dass Propylamin eine stärkere Bindung mit R4A eingeht als mit Propanol. Die C=O und NH_2 Streckschwingungen lieferten nützliche Informationen über die Formation zwischen den O Atomen der Carbonylgruppe von R4A und den H Atomen der Aminogruppe von Propylamin. Die deutliche Verschiebung der Carbonylgruppe zeugt von einer starken Wasserstoffbrückenbindung. Die Bandenverschiebung der Protonen der Aminogruppe von Propylamin im ^1H NMR Spektrum kann, ebenso durch die Anwesenheit der R4A Carbonylgruppe durch die Wasserstoffbrückenbindung mit den Protonen interpretiert werden.

Die umfangreiche Charakterisierung des PDMS-R4A Systems mit den polaren Analyten Propanol und Propylamin mittels ITC, IR, ^1H NMR und RIfS zeigten sehr gut, dass die Wechselwirkung der C=O Gruppe von R4A und die Protonen der Analyten entscheidend für die Sensitivität des Polymers sind. Insbesondere durch die Funktionalisierung des PDMS konnte die Sensitivität des Polymers erhöht werden.

4.1.3 Molekular geprägte Polymere (MIP)

4.1.3.1 Untersuchungen mittels ITC

In diesem Kapitel wird die Sensitivität der MIPs für Atrazin mittels ITC und RfS untersucht. Atrazin (Abb. 47) ist ein Herbizid, das zur Familie der Chlortriazine gehört und in Unkrautbekämpfungsmitteln, chemischen Reinigungsmitteln oder bei der Kunststoffherstellung als Nebenprodukt zu finden ist. Atrazin gehört zur Gruppe der endokrin wirksamen Substanzen (EDCs). Endokrine Disruptoren sind Stoffe, die als künstliche Hormone wirken und somit das empfindliche Gleichgewicht des hormonbildenden endokrinen Systems der Tiere stören können. Die EDCs werden auch als "Umwelt-hormone" bezeichnet und sind meist von Menschen produzierte Stoffe [She71]. Bei männlichen Fischen führen diese Stoffe beispielsweise zur Feminisierung und bei Reptilien und Vögeln zur anomalen Entwicklung [Bel72]. Die weite Verbreitung dieser Substanz in der Umwelt und die noch weitgehend unerforschte Wirkung auf den Menschen macht eine schnelle und hoch sensitive Detektion erforderlich, so dass die optische Sensorik eine geeignete analytische Methode für die Erkennung und Selektion solcher EDCs darstellt.

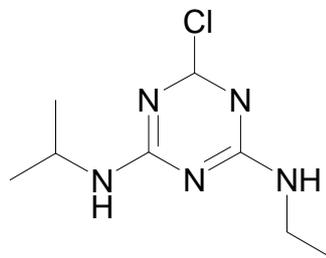


Abb. 47: Strukturformel von Atrazin ($C_8H_{14}ClN_5$).

Zunächst wurde anhand der ITC die Wechselwirkungsstärke von Atrazin mit den MIPs untersucht. Atrazin kann als wasserlösliche Chemikalie ins Grundwasser gelangen und wird in der Umwelt nur langsam abgebaut. Da Atrazin ein Gift für Wasserorganismen darstellt, wurden in dieser Arbeit die kalorimetrischen Untersuchungen in wässriger Phase durchgeführt.

Für die zeitaufgelösten Leistungssignale (Abb. 48) der ITC wurden bei einer Temperatur von 293.1 K 19 x 20 μ L (92.72 μ mol) Atrazin

zu einer wässrigen Suspension von geprägten und ungeprägten MIPs (33 mg/l) injiziert.

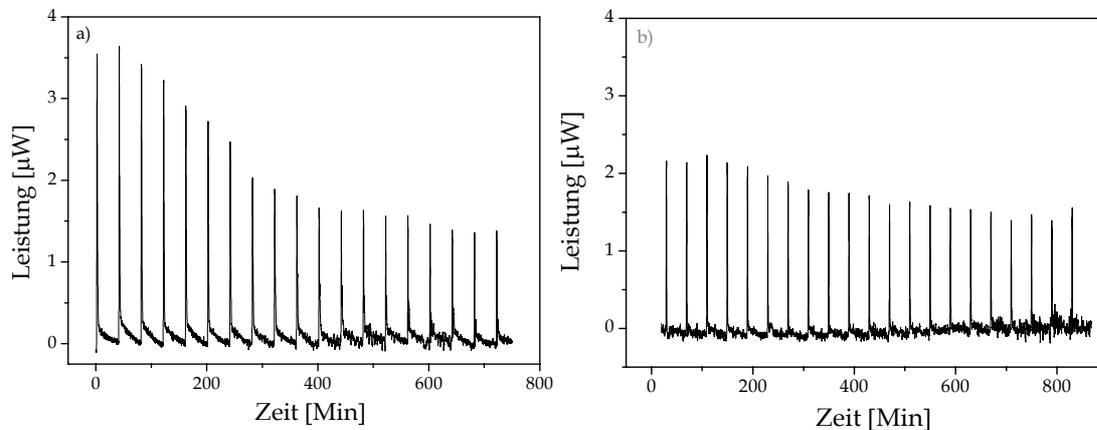


Abb. 48: Zeitaufgelöste Leistungssignale der Messung von a) 20 μL Atrazin zu einer 500 μL Lösung an geprägten MIPs und b) die Referenzmessung mit 21 μL Atrazin zu einer 500 μL Lösung an ungeprägten MIPs.

In Abbildung 48a) ist der Wärmefluss während der Titration von Atrazin zu geprägten MIPs dargestellt. Dabei wird ein Wärmefluss von etwa 3.6 μW erreicht, während bei der Referenzmessung (Abb. 48b), mit den ungeprägten MIPs, kein Signal stärker als etwa 2.2 μW ist. Trägt man nun die integrierten Signalfächen aus Abbildung 48a) pro Titrationsschritt auf, erkennt man eine maximale Wärmemenge von 383.01 mJ mit dem dritten Titrationsschritt. Nach dem zehnten Titrationsschritt ist eine starke Abnahme der gemessenen Wärmemenge Q (Abb. 49) zu beobachten. Ab dem elften Injektionsschritt von Atrazin ist eine Sättigung der Bindungsstellen des Polymers zu erkennen. Die Wärmemenge Q sinkt bei Titrationsschritt 10 auf 157.29 mJ ab.

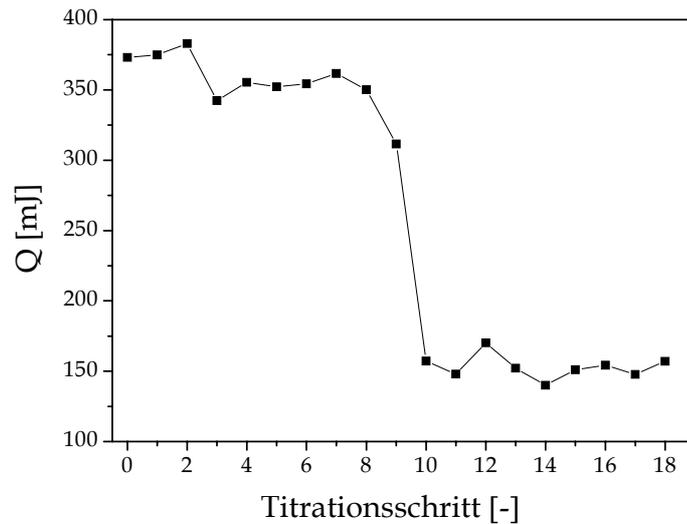


Abb. 49: Integrierte Titrationsignale von Atrazin zu geprägten MIPs.

Somit lässt sich eine Wechselwirkung von Atrazin mit den geprägten MIPs mit Isothermer Titrations-Kalorimetrie nachweisen, obwohl das Molekular geprägte Polymer in bidestilliertem Wasser nur schwer zu lösen war und nur eine Suspension erhalten wurde.

4.1.3.2 Untersuchungen mittels RIfS

RIfS wurde auch hier genutzt um Wechselwirkungsuntersuchungen mit geprägten Polymernanopartikeln und Atrazin durchzuführen [Bel33]. Die MIPs wurden durch ein konventionelles Verfahren (Kapitel 3.4.4) hergestellt. Die Aufbringung des Polymers auf den für die RIfS nötigen Interferenzgläser erfolgte elektrostatisch mit PEI.

Für die Untersuchungen mit RIfS wurden zwei verschiedene Atrazinkonzentrationen, 1.7 und 17 ppm gelöst in Toluol, eingesetzt. In Abbildung 50a) ist eine Änderung der optischen Schichtdicke um $\Delta(nd) = 3.49$ nm bei einer Zeit von etwa 1390 s zu erkennen, während für die Konzentration von 1.7 ppm Atrazin eine Änderung der optischen Schichtdicke um 0.58 nm zu beobachten ist (Abb. 50b)). Die Peaks bei zirka 1340 s und bei 2150 s entstanden beim Umschalten der Ventile auf Analytfluss durch Eindringen von Luft. Davor wurde das Lösungsmittel Toluol über die Polymerschicht geleitet. Die Referenzmessung mit dem ungeprägten Polymerfilm, lässt für die höhere Analytkonzentration beinahe keine Änderung der Schichtdicke erkennen. $\Delta(nd)$ ist hier gerade 0.35 nm für 17 ppm Atrazin in Toluol (Abb. 51). In Abbildung 52 ist die opti-

sche Schichtdickenänderung für die beiden Konzentrationen 1.7 und 17 ppm graphisch gegenübergestellt.

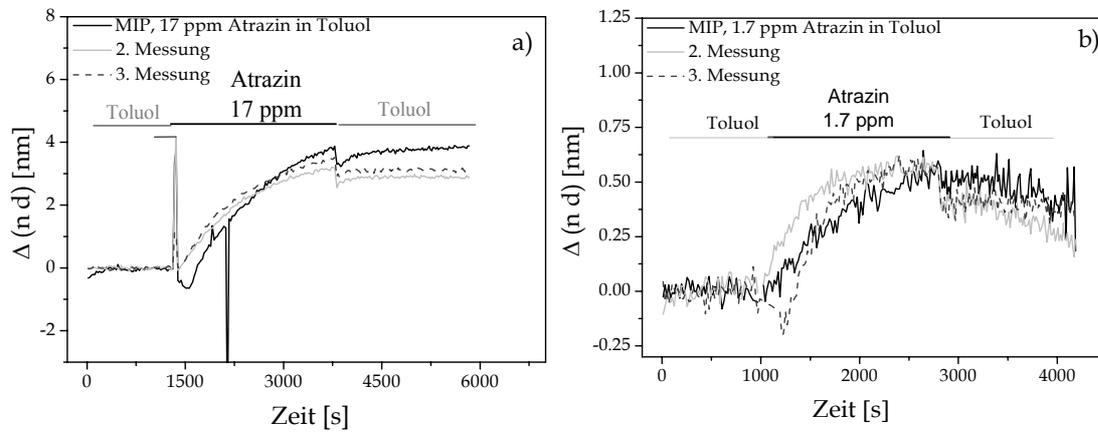


Abb. 50: a) Änderung der optischen Schichtdicken der mit MIP beschichteten RfS-Glästräger nach Injektion von 17 ppm Atrazin in Toluol mit Maximum bei $3.49 \text{ nm} \pm 0.3$ und b) Kurvenverlauf mit Maximum bei $0.62 \text{ nm} \pm 0.05$ nach Injektion von 1.7 ppm Atrazinlösung.

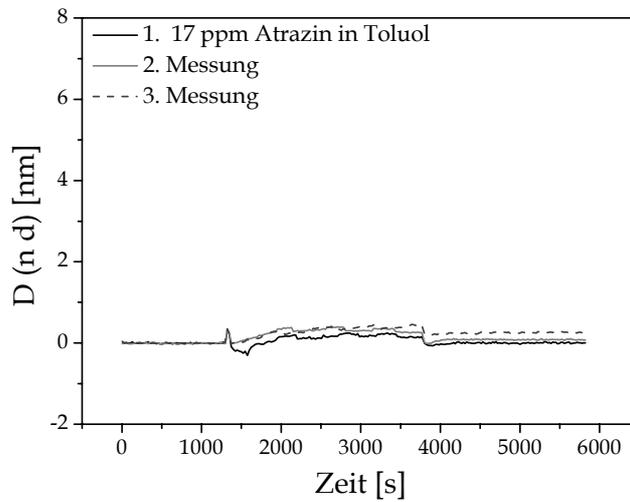


Abb. 51: Kontrollmessung mit 17 ppm Atrazinlösung für nicht geprägtes MIP mit maximaler Schickdickenänderung von $0.35 \text{ nm} \pm 0.032$.

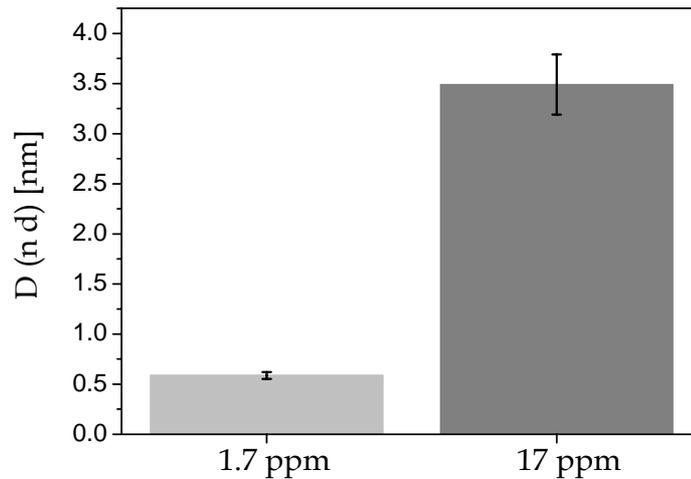


Abb. 52: Optische Schichtdickenänderung der MIPs mit unterschiedlichen Konzentrationen des Atrazins.

Eine Regeneration der sensitiven Polymerschicht wurde durch eine Methanol/Essigsäure Mischung im Verhältnis 4:1 erreicht, allerdings ist diese in Abbildung 50a) und b) nicht zu erkennen. Die Regeneration der Sensoroberfläche wurde offline durchgeführt, da auf Grund des hohen Brechungsindexsprungs zwischen Regenerationslösung und Toluol eine Aufnahme des Interferenzspektrums nicht möglich ist. Nach der Regeneration ging das Signal auf die Lage der Basislinie zurück, und es wurde erneut die Analytlösung über die Polymerschicht geleitet. Somit konnte durch eine Dreifachmessung gezeigt werden, dass die Polymerschicht unter den angewandten Bedingungen beständig ist und reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Zusammenfassung

Es konnte sowohl mit der Kalorimetrie als auch mit der RIfS-Technik eine selektive Wechselwirkung des Atrazins mit den geprägten MIP gemessen werden, allerdings erfolgte dies, aufgrund der schlechten Löslichkeit der MIPs, bei den RIfS-Messungen nur in Toluol. Somit ist kein direkter Vergleich der beiden Ergebnisse möglich.

4.2 Untersuchungen von biochemischen Systemen

4.2.1 Charakterisierung des Progesteron-Antikörpers mittels Ellipsometrie

Ziel war die Entwicklung eines Immunoassays für verschiedene Probenmatrices, da dies für den Nachweis von Progesteron sehr interessant ist [Käp74]. Im Gegensatz zu den Polymer-Systemen besitzen biochemische Moleküle spezielle Bindungsstellen für die Anbindung von Liganden. Die Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren und Liganden sind für diese Systeme somit selektiver als die Wechselwirkung zwischen Polymersystemen und Analyt. Eine grundlegende Beschreibung von Biosensoren ist in [Byf73] gegeben.

Für die Charakterisierung der Oberfläche des Modell-Assays wurde dafür die Ellipsometrie eingesetzt. Dabei wurden die einzelnen Schichten aus denen die Oberfläche aufgebaut wurde, in einem Wellenlängenbereich zwischen 400-800 nm vermessen. Der Schichtaufbau für die verwendeten Assays sah dabei folgendermaßen aus:

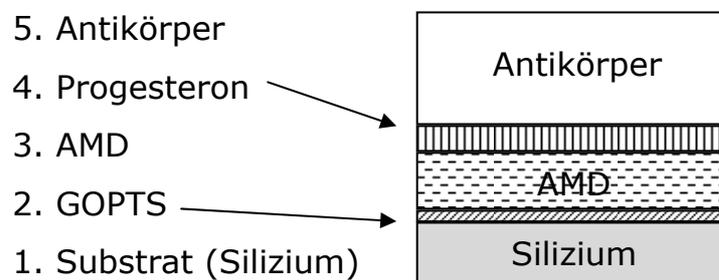


Abb. 53: Schichtmodell für den Progesteron-Assay.

Die Schichten wurden an Luft und in Pufferlösung (PBS) gemessen. Für die PBS-Messungen wurde die Messzelle (Abb. 22) mit etwa 10 mL Pufferlösung gefüllt. Die Wafer wurden darauf in der PBS-Lösung für mindestens eine halbe Stunde inkubiert, um einen Quelleffekt bei den Messungen zu gewährleisten. Als Antikörper wurde in dieser Arbeit ein polyklonaler Antikörper gegen Progesteron eingesetzt. Es wurden die im Kapitel 3.3.1 schon beschriebenen Wafer verwendet. Die Auswertung der Schichtdicke erfolgte durch Cauchy-Parametrisierung. Auf die Messung der Schichtdickenänderung durch Immobilisierung von GOPTS wurde

hier verzichtet, da die GOTPS-Schicht an Luft nicht sehr stabil ist. Für die Puffermessungen wurde ein Brechungsindex von 1.35-1.36 und für die Messungen an Luft ein Brechungsindex von 1.36-1.46 [Heh40, Pie76] verwendet. In Abbildung 54 sind die Spektren von Ψ und Δ für die einzeln aufgebauten Schichten, die unter Pufferlösung gemessen wurde, gezeigt. Über die Anzahl der Maxima in einem Spektrum lassen sich Aussagen über die Schichtdicke machen. Je mehr Extremwerte in einem Spektrum zu sehen sind, umso dicker ist die Schicht. Hier wird jeweils nur ein Maximum beobachtet, so dass es sich um einen dünnen Film handelt. Verändert man die Dicke des Films langsam durch Anbindung einer weiteren Schicht, zeigt sich in den beiden Spektren Ψ und Δ eine Verschiebung zu höheren Wellenlängen. Der Einfluss der Progesteron- und schließlich Antikörperanbindung ist in Abbildung 54 erst mit der letzten Schicht, der Bindung des Antikörpers, mit einer deutlichen Verschiebung zu höheren Wellenlängen zu erkennen. Das Minimum der Ψ -Werte verschiebt sich dabei von 430 nm auf 450 nm, während das Δ -Spektrum um 10 nm zu höheren Wellenlänge verschoben wird. In Abbildung 55 sind die gemessenen Ψ und Δ -Spektren für die Messungen an Luft aufgetragen. Auch hier wird mit zunehmender Schichtdicke das Spektrum zu höheren Wellenlängen verschoben, allerdings nicht in der Deutlichkeit wie bei den Messungen unter Pufferlösung. Die Ψ -Werte verschieben sich gerade um 5 nm und die Δ -Werte um 10 nm für den letzten Immobilisierungsschritt, die Antikörperbindung.

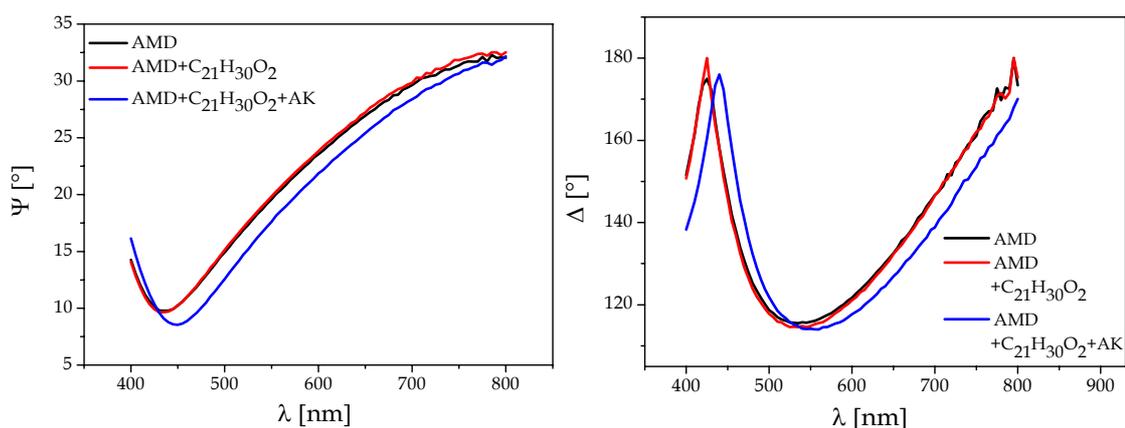


Abb. 54: Gemessene ellipsometrische Winkel Ψ und Δ der einzelnen Schichten unter PBS in Abhängigkeit von λ .

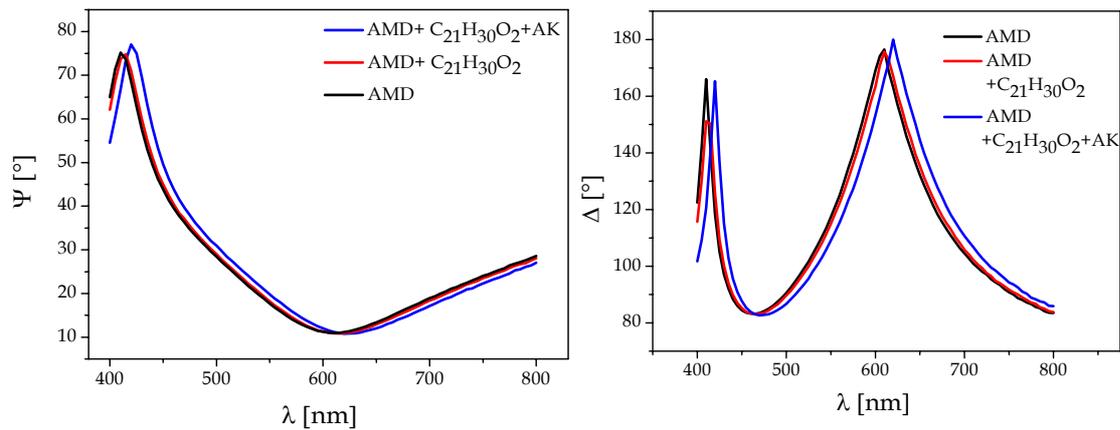


Abb. 55: An Luft gemessene ellipsometrische Winkel Ψ und Δ der einzelnen Schichten in Abhängigkeit von λ .

In Abbildung 56 sind die Schichtdicken für die einzeln aufgebauten Filme mit den oxidierten Wafern an Luft und in PBS gegenübergestellt.

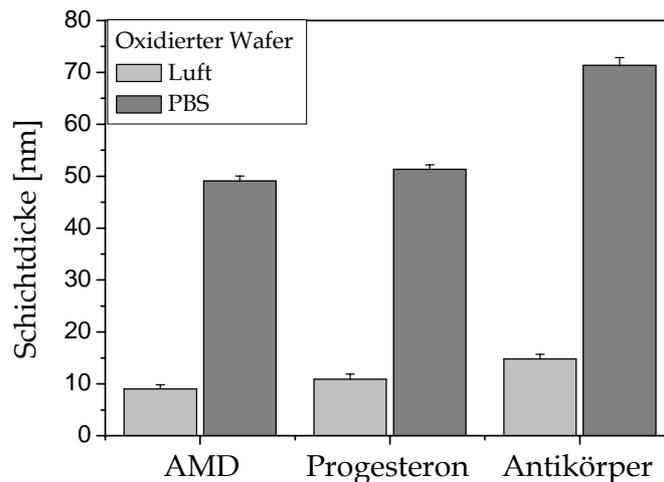


Abb. 56: Ellipsometriemessungen des Schichtenaufbaus eines Immunoassays unter Luft und PBS.

Links mit den hellgrauen Balken sind die an Luft gemessenen Schichtdicken dargestellt, rechts davon mit den dunkelgrauen Balken die unter PBS gemessenen Schichtdicken. Die Messungen an Luft ergaben dabei für den AMD-Film eine Schichtdicke von 9 nm. Die Messungen in Pufferlösung hingegen zeigen eine starke Quellung der AMD-Schicht mit einer Zunahme der Filmdicke auf 49.11 nm. Die darauffolgende Immobilisierung des Progesteronderivates bewirkte bei der Messung an Luft nur eine geringe Zunahme um

1.89 nm auf 10.89 nm. Für die Messung in PBS ergab sich nur eine geringfügig stärkere Zunahme um 2.12 nm auf 51.32 nm. Die kaum merkliche Verschiebung der Spektren Ψ und Δ deutete schon auf eine geringe Zunahme der Schichtdicke hin. Als letzter Schritt konnte nun der Antikörper an das immobilisierte Progesteronderivat anbinden. Dabei wurde für die Messungen an Luft eine Schichtdicke von 14.81 nm erhalten. Dagegen zeigte die Messung in PBS eine starke Zunahme der Schichtdicke auf 71.35 nm. Dies ist auch in den Spektren Ψ und Δ in Abbildung 54 und 55 als deutliche Verschiebung der Spektren zu höheren Wellenlängen zu beobachten.

Der Verlauf der ellipsometrischen Winkel Ψ und Δ in Abhängigkeit von der Wellenlänge ist für den nativen Wafer in Pufferlösung in Abbildung 57 aufgetragen. Für die Ψ -Werte wird mit Immobilisierung des Progesterons eine leichte Zunahme verzeichnet, während die Bindung des Antikörpers mit einer starken Verschiebung klar zu erkennen ist. Bei den Δ -Werten wird hingegen nach Immobilisierung von Progesteron und anschließende Antikörperbindung eine Verschiebung der Spektrum zu kleineren Δ -Werten registriert. Eine Verschiebung zu höheren Wellenlängen kann hier nicht genau erkannt werden, da keine charakteristischen Extremwerte vorhanden sind. Zusätzlich sind in Abbildungen 57 und 58 die simulierten Ψ und Δ -Spektren mit aufgetragen. In Abbildung 58 sind die ellipsometrischen Winkel für die Messungen an Luft abgebildet. Die Verschiebung der Spektren sowohl für die Ψ - als auch für die Δ -Werte ist in den Abbildungen gut zu beobachten. Besonders auffällig ist hier die Änderung der Δ -Werte nach Anbindung des Antikörpers. Auch bei den Messungen an Luft kann keine Verschiebung zu höheren Wellenlängen festgestellt werden, aufgrund des fehlenden Extremum, die wiederum aufgrund der niedrigen Schichtdicke fehlen. In Abbildung 59 sind die elliptischen Messungen für den nativen Wafer an Luft und unter PBS gegenübergestellt. Für die Aminodextranschicht wurde hier an Luft eine Dicke von 7.68 nm gemessen, während unter PBS eine Filmdicke von 8.95 nm erhalten wurde. Nach Immobilisierung des Progesteronderivates wurde für die Luftmessung eine Dicke von 8.76 nm und für PBS eine Dicke von 9.85 nm gemessen. Nach Anbindung des Antigens bzw. Antikörpers wurde sowohl für die Messung an Luft und unter PBS eine gut erkennbare Zunahme der Schichtdicke registriert. Die Messung an Luft ergab dabei eine Dicke von 15.53 nm und für die Flüssigmessung erhöhte sich die Filmdicke auf 19.72 nm.

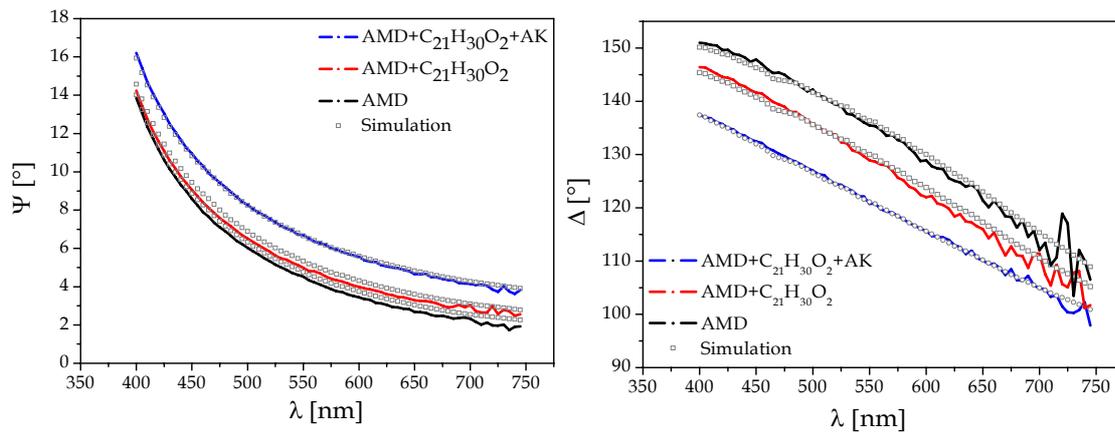


Abb. 57: Gemessene und simulierte ellipsometrischen Winkel unter PBS des nativen Wafers.

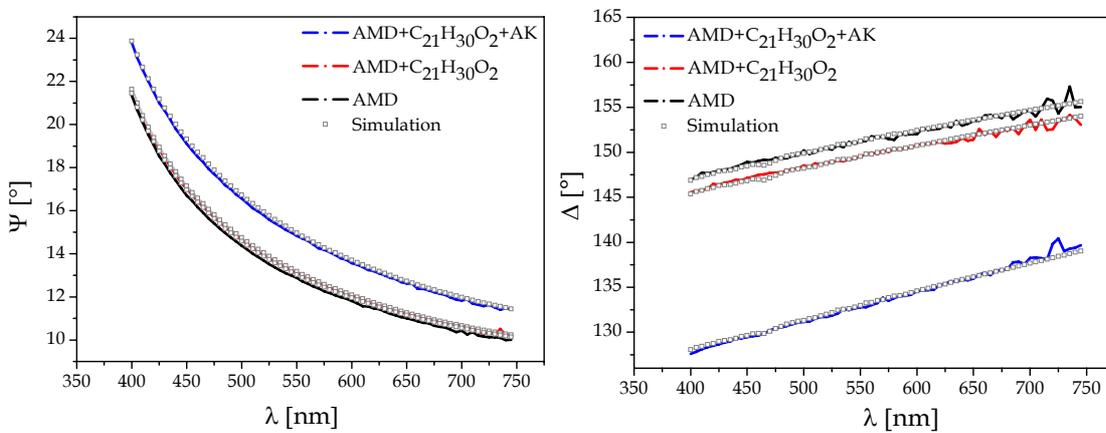


Abb.58: An Luft gemessene und simulierte ellipsometrische Winkel des nativen Wafers.

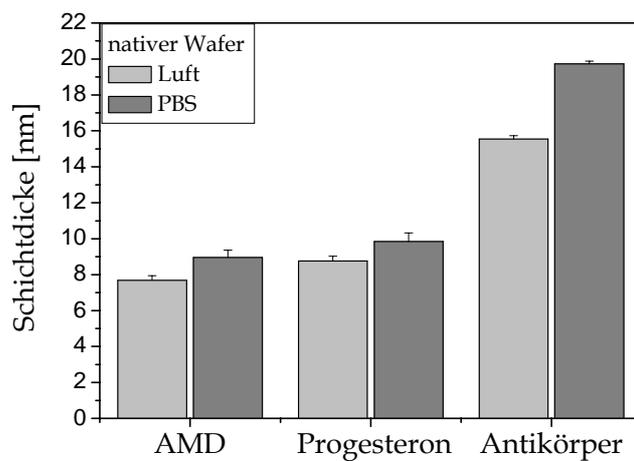


Abb. 59: Ellipsometrische Messungen an Luft und PBS.

Zusammenfassung

Für die oxidierten Wafer ist also eine Zunahme der Schichtdicke mit den einzelnen Immobilisierungsschritten gut zu beobachten. Zudem ist auch gut zu sehen, dass die Aminodextranschicht in flüssiger Phase stark quillt und somit in diesem Fall der Antikörper über das gesamte Volumen binden kann. Auch für den nativen Wafer lässt sich eine gute Zunahme der Schichtdicke mit den einzelnen Immobilisierungsschritten erkennen. Ebenso wie bei den oxidierten Wafern ist auch bei den nativen eine Differenz zwischen den Messungen an Luft und unter PBS zu sehen. Allerdings stellt man beim Vergleich der Abbildungen 59 mit 56 fest, dass die Zunahme der Schichtdicke bei den oxidierten Wafer, vor allem für die Messungen mit PBS, stärker ist als für den nativen Wafer. Der Grund dafür könnte wie schon bei vorigen ellipsometrischen Messungen an einer effektiveren Silanisierung der oxidierten Wafer liegen (vgl. Kapitel 4.2.1) und zum anderen daran, dass für die Messungen mit den nativen Siliziumdioxidfilmen wiederum das Null-Ellipsometer verwendet wurde. Messpunkte oberhalb einer Wellenlänge von 750 nm waren teilweise so stark verrauscht, dass sie hier vernachlässigt wurden. Dies betrifft vor allem die nativen Wafern, hier wurde der Wellenlängenbereich von 750-800 nm vernachlässigt.

4.2.2 Untersuchtes Prostata- spezifische Antigen mittels Ellipsometrie

In diesem Kapitel wurde die Schichtdickenänderung bei der Präparation eines PSA Immunoassays mittels Ellipsometrie untersucht. Der Eiweißstoff PSA wird in der Prostata produziert und dessen Wert dient in der Medizin als Nachweis bei Verdacht bzw. bestehenden Prostatakrebs. Für die Charakterisierung der optischen Schichten eines entwickelten Immunoassays wurden ellipsometrisch Messungen durchgeführt. Dabei wurde eine Oberfläche basierend auf Aminodextran (AMD) gewählt. Für eine Regeneration der Oberfläche wurde eine 0.5 %ige SDS-Lösung mit pH 1.8 in Kombination mit Acetonitril/Propionsäure-Lösung eingesetzt, [Käp74].

Die folgenden Ergebnisse stammen von Messungen mit dem spektralen Ellipsometer und wurden an Luft („trocken“) durchgeführt. In Abbildung 60 sind die Schichtdickenänderungen während des Präparationsverlaufes von jeweils zwei identischen Wafern zu entnehmen. Bei den Wafern mit der Bezeichnung A handelt es sich um native Wafer, während es sich bei der Bezeichnung B um bedampfte Wafer handelt. Nach der Silanisierung wurde ausschließlich ein nativer Wafer mit GOPTS gemessen. Die Zunahme der Schichtdicke durch Immobilisierung von Aminodextrans kann daher nur für den Wafer A₁ quantifiziert werden, und ergab eine Zunahme der Schichtdicke um 2.4 nm. Durch Umfunktionalisieren des Aminodextrans mit Glutarsäureanhydrid ergab sich nur eine geringfügige Änderung der Schichtdicke. Die Kopplung des Antigens hingegen führte zu einer deutlichen Zunahme der Schichtdicke um etwa 10.1 nm. Diese Zunahme lässt sich nur über die Struktur des Antigens (34 kDa) erklären. Da die Immobilisierung des Antigens über Nacht erfolgte, quoll das Dextran auf und das Antigen konnte so über das gesamte Volumen der Oberfläche binden. Dadurch wurden die Antigene in mehreren Schichtlagen übereinander gebunden und dies hatte eine hohe Änderung der Schichtdicke an Luft zuzufolge. Außerdem bewirkt die Einlagerung der Proteine zusätzlich eine starke Änderung des Brechungsindex der sensitiven Schicht (Abb. 61). Der Regenerationsschritt mit SDS-Lösung bewirkte bei den bedampften Wafern eine geringe erkennbare Änderung, für die nativen Wafer ergab sich eine etwas deutlichere Abnahme der Schichtdicke um etwa 2.9 nm. Die Abnahme der Schichtdicke ist damit zu begründen, dass bei der Regeneration nicht gebundene bzw. lose

Antigenmoleküle entfernt werden. Der letzte Schritt der Antikörperbindung lies sowohl bei den nativen als auch bei den bedampften Wafern lediglich eine Schichtenänderung um etwa 2 nm erkennen. Diese Zunahme ist für einen Antikörper mit einer Größe von etwa 150 kDa sehr schwach. Um die Langlebigkeit der sensitiven PSA-Schichten zu überprüfen, wurden die sensitiven Schichten nach 6 Tage erneut gemessen. Aus Abbildung 60 ist zu entnehmen, dass sich die sensitive Schicht in a) im Mittel um etwa 0.4 nm und in b) nur um zirka 0.2 nm, so dass die Schicht als relativ stabil, für den Zeitraum von einer Woche, angesehen werden kann.

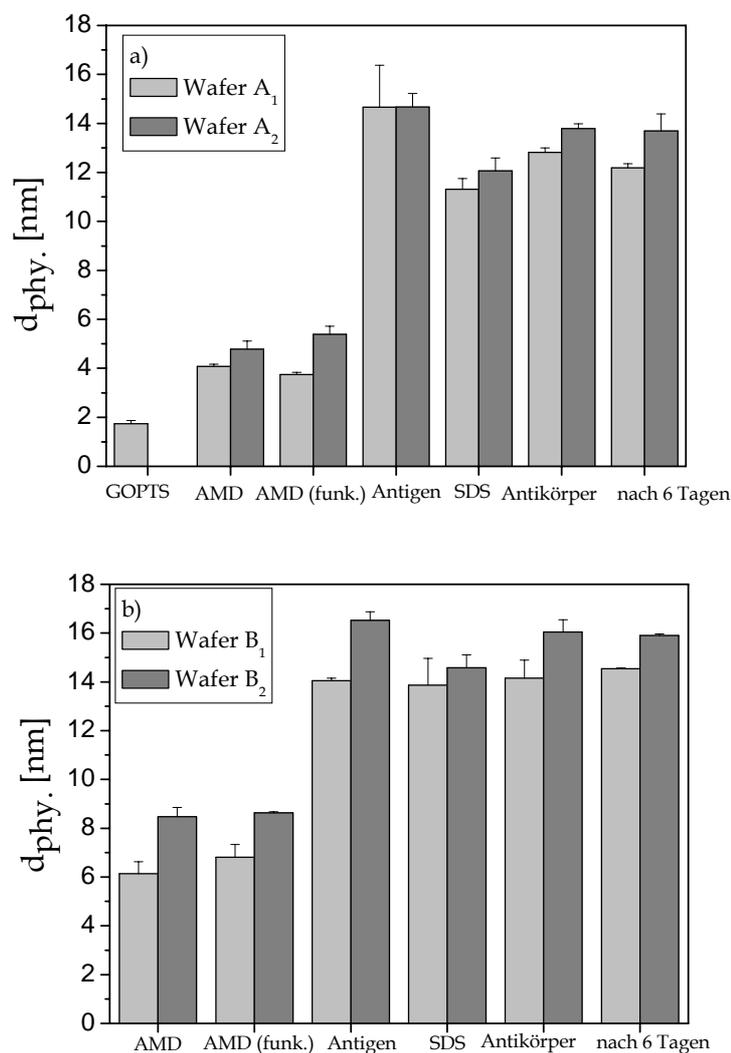


Abb. 60: Änderung der Schichtdicke während der Präparation von jeweils zwei a) nativen Wafern und b) oxidierten Wafern.

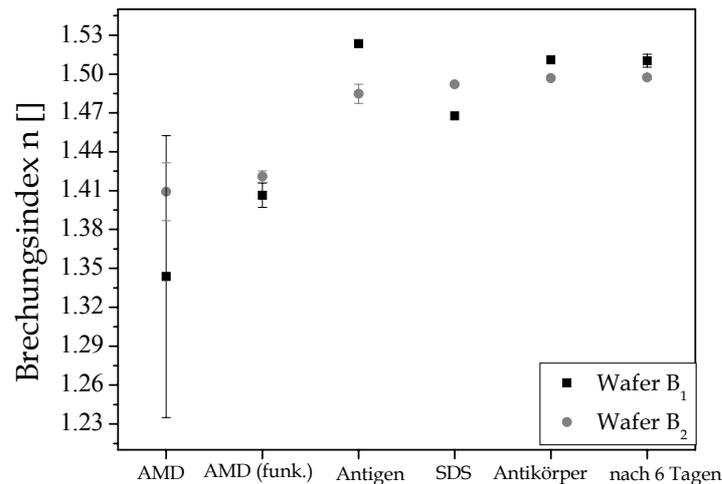


Abb. 61: Realteil des Brechungsindex der bedampften Wafer im Verlauf der Präparation.

Zusammenfassung

Schließlich lässt sich sagen, dass sich für die eingesetzten nativen Wafer allgemein eine etwas geringere Schichtdicke ergab, als bei den mit Oxid bedampften Wafern. Die Schichtdickenschwankungen innerhalb der nativen und oxidierten Wafer sind auf die manuelle Präparation und die damit verbundenen Geschicke der präparierenden Person zurückzuführen. Speziell bei Betrachtung der AMD-Schicht erhält man bei den nativen Wafern eine Schichtdicke im Mittel um 4.4 nm während bei den mit Oxid bedampften Wafern im Mittel um etwa 7.3 nm. Dies kann zum einen an einer effektiveren Silanisierung der bedampften Wafer liegen, was auch schon in vorangegangene Dissertationen beobachtet wurde [Her75], zum anderen wie schon im vorangegangenen Kapitel, dass zur Messung der nativen Wafer das Null-Ellipsometer Anwendung fand, welches bei kleinen Schichtdicken (wie hier der Fall), genauere Ergebnisse liefert (vgl. Messbereich). Letzteres ist eventuell auch eine Erklärung dafür, dass bei den nativen Wafern eine Schichtdickenabnahme nach dem SDS-Schritt zu beobachten war. Eine Erklärung für das Ausbleiben der Schichtdickenzunahme bei Kopplung des Antikörpers könnte sein, dass der Antikörper nicht gebunden hat oder nur im sehr geringen Ausmaß. In Anbetracht der Größe des Antikörpers, die nahezu das zehnfache Maß im Vergleich zum Antigen aufweist, sollte diese Schichtdickenzunahme deutlich zu erkennen sein. Zusätzlich untermauert wird diese Annahme der ausgebliebenen Kopplung des Antikörpers durch den Verlauf des Brechungsindex. Dieser bleibt nach Kopplung des Antigens mit einer Änderung

von 0.0126 für Wafer B₁ und mit 0.0121 für Wafer B₂ nahezu unverändert. Eine andere Erklärung für das Ausbleiben der Schichtzunahme könnte sein, dass die Messungen an Luft durchgeführt worden sind. Dies kann zur Denaturierung bzw. zum Verlust der dreidimensionalen Struktur des Antikörpers führen, z. B. durch „Abknicken“ der Proteinketten. Daraus würde bei der Messung eine geringe Schichtdickenänderung resultieren. Schließlich könnte als letzt genannter Grund für das Ausbleiben der Schichtdickenänderung sein, dass das immobilisierte Dextran mit der Luftfeuchtigkeit ein Hydrogel bildet, in das die Antikörper hinein diffundieren können und damit die Antikörperkopplung nur eine geringe Schichtdickenänderung zur Folge hat.

4.2.3 Bestimmung der Affinität des SV40

Die Bindung des Affenvirus 40 an die Zelloberfläche erfolgt über den Gangliosidrezeptor GM1 [Low77, Tsa78]. In diesem Teil der Arbeit wurden die thermodynamischen Größen von SV40 an den GM1 Rezeptor bestimmt. Dafür kam die Isotherme Titrations-Kalorimetrie zum Einsatz. Die Messungen wurden mit einer Konzentration des Proteinmonomers VP1 von 1 mM durchgeführt. Dies war mit $c = 1$ (Gl. 22) der niedrigste erstrebenswerte Signalbereich, aber gleichzeitig die höchste Konzentration an VP1 Protein, die erzielt werden konnte, ohne Verlust durch Ausfallen des VP1 im Puffer. In Abbildung 62a) ist das zeitabhängige Leistungssignale der Titration von GM1 zu VP1 und in Abbildung 62b) die Referenzmessung von GM1 und Puffer gezeigt. Dabei wurden jeweils 23 x 12 μL an a) 3.78 mM und b) 3.72 mM GM1 zu einem Volumen von jeweils 270 μL Protein- bzw. Pufferlösung titriert.

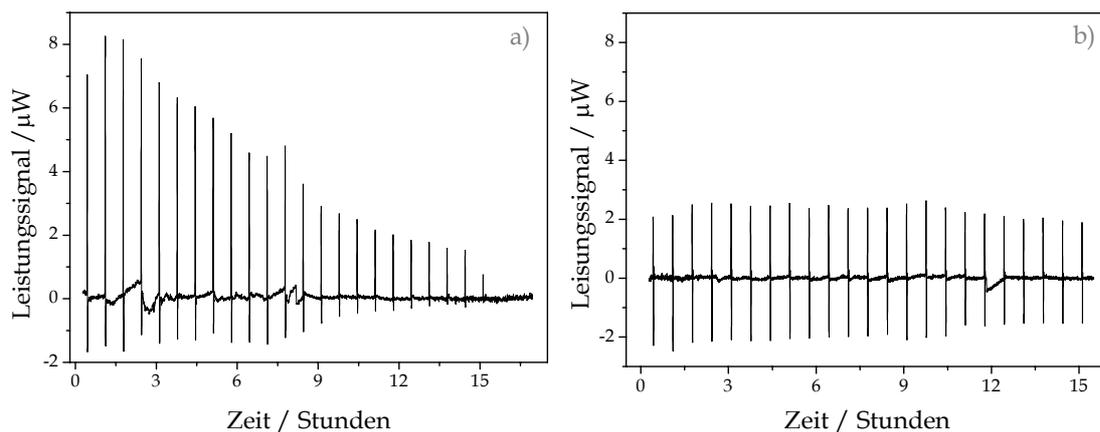


Abb. 62: Zeitabhängige Titrations-signale von GM1 zu a) 0.9 mM SV40 VP1 und b) Puffer bei 293.1 K.

Obwohl die höchstmögliche Proteinkonzentration an SV40 VP1 eingesetzt worden ist, wurden nur etwa 40% aller Bindungsstellen besetzt. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass erst nach Herstellung einer Zuckerpufferlösung von 1 mM GM1 eine Bestimmung der Bindungskonstante möglich war und erst mit einer Lösung an GM1 von 5 mM eine vollständige Besetzung der Bindungsstellen erreicht wurde. In Abbildung 63 sind die integrierten Werte der Titrations-signale aus Abbildung 62a) aufgetragen. Anschließend wurde ein Fit durch die Werte gelegt um die Bindungskonstante zu bestimmen. Die beiden eingekreisten Werte wurden bei der Berechnung der Bindungskonstante und Enthalpiebestimmung nicht

beachtet. Aus dem Kurvenfit wurde dabei Bindungskonstante von etwa 1 mM bestimmt.

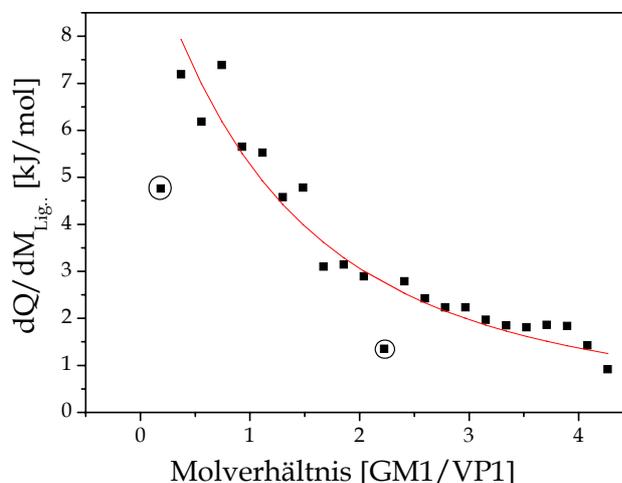


Abb. 63: Integrierte Titrationssignale.

Trotz der schwachen Bindung ist dennoch eine aussagekräftige Bestimmung der Bindungskonstanten möglich [Tur79, Tel79], wenn die Stöchiometrie der Bindung bekannt ist. Im Fall der Wechselwirkung von GM1 und SV40 VP1 haben wir eine 1:1 Stöchiometrie.

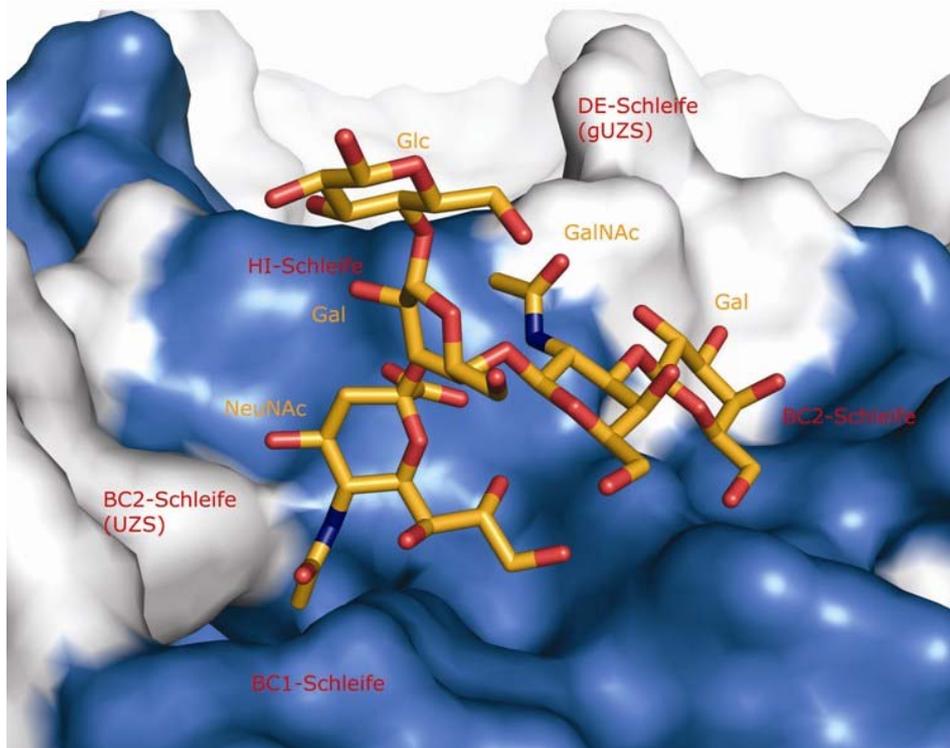
Aus der erhaltenen Enthalpie und Gleichung 23 kann nun auch die freie Standardenthalpie ΔG° und die Entropie ΔS° (Gl. 14) der Reaktion bestimmt werden (Tabelle 2). Für die Messung in Abbildung 62 ergeben sich mit einer Enthalpie von -4.6 J/mol und einer Bindungskonstanten von 1 mM folgende thermodynamischen Werte:

ΔG°	ΔS°
-17.75 kJ	44.89 mJ/mol·K

Tabelle 2: Berechnete thermodynamischen Größen.

Zu beachten ist hier, dass von der Software des Kalorimeters hier eine positive Enthalpie ausgegeben wird (Kapitel 2.1.4.1), obwohl es sich um eine negative Enthalpie, wie oben angegeben, handelt.

Da speziell die Affinität einer Bindungsseite des SV40 VP1 an den GM1-Rezeptor untersucht wurde, soll hier über erhaltene Röntgenstrukturen (gelöst von Frau Dipl. Biochem. Ursula Neu und Herrn Prof. T. Stehle), die genauen Bindungsverhältnisse des SV40 VP-GM1 Komplexes in den folgenden Abbildungen erläutert werden. Dabei werden die Bindungen in den folgenden Abbildungen aus verschiedenen Betrachtungspositionen gezeigt. Wasserstoffbrückenbindungen werden gestrichelt und Molekülen, die mit dem Zucker wechselwirken, stabförmig dargestellt. Grau schattiert ist eine Kavität zwischen einem VP1 Monomer und seinem im Uhrzeigersinn angeordneten Nachbarmolekülen. Der GM1-Ligand bindet dabei an die BC-, DE- und HI-Schleife des VP1 (Abb. 64), die eine Art „Furche“ bilden. Die beiden Zweige des GM1, NeuNAc und Gal- β (1,3)-GalNAc stellen dabei die Bindung zu VP1 her, während der Stamm Gal-(β 1,4)-Glc des GM1, welcher normalerweise in der Zellmembran verankert ist, vom Protein weg zeigt und keinen Kontakt zu VP1 hat. Die beiden Zweige NeuNAc und Gal-(β 1,3)-GalNAc liegen in einer Bogenform über dem VP1, mit einer Bindungsstelle NeuNAc und Gal auf jeweils einer Hälfte. Aus Abbildung 64 lässt sich auch gut die Wechselwirkung des NeuNAc mit der HI-, BC1- und mit einem Rest der BC2-Schleife erkennen.



*Abb. 64: Dargestellt ist ein VP1 Monomer in blau, während die im und gegen den Uhrzeigersinn angeordneten Nachbarmoleküle graufarbig sind.

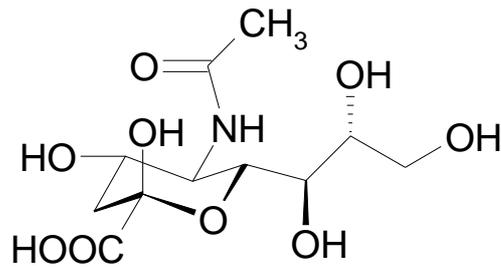
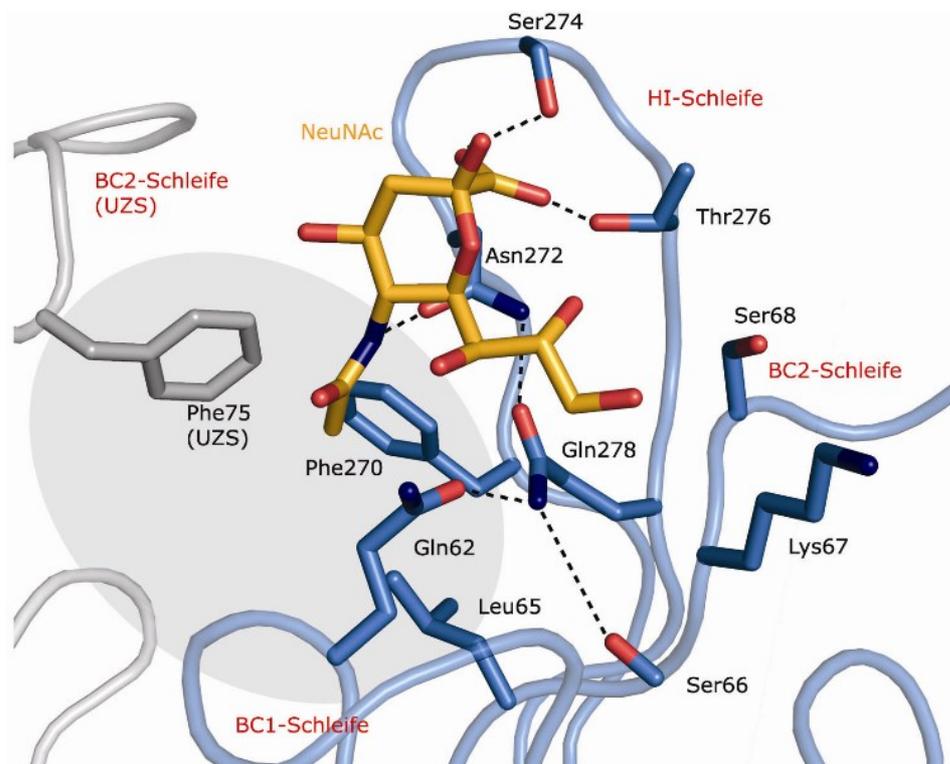


Abb. 65: N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc)

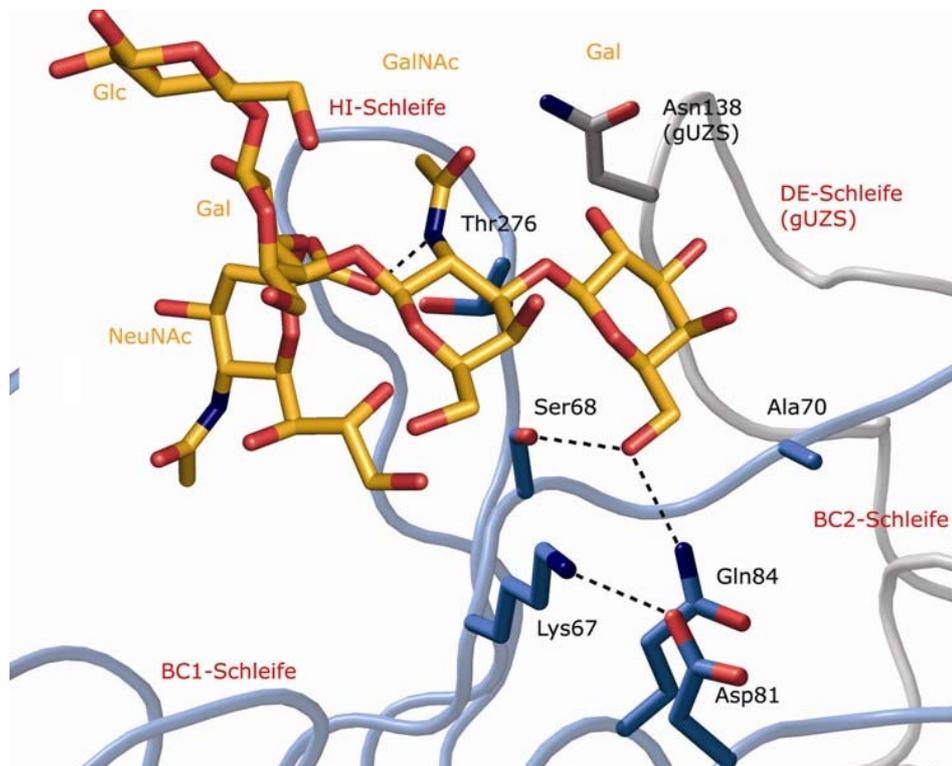
Die Carboxylgruppe des NeuNAc (Abb. 65) zeigt in Richtung der HI-Schleife und bildet mit den proteinogenen Aminosäuren Ser274 und Thr276 Wasserstoffbrückenbindungen (Abb. 66). Die Methylgruppe des N-Acetyls liegt in einer Vertiefung entlang der Aminosäuren Phe270, Leu65 und Phe75. Die Glycerin-Seitenkette liegt hingegen in einer Vertiefung an der Oberfläche und wechselwirkt über die drei Hydroxylgruppen mit den Aminosäuren der BC1- und BC2-Schleife des VP1.



*Abb. 66: Dargestellt ist die Verbindung zwischen NeuNAc und SV40 VP1.

In Abbildung 67 ist das Bindungsverhältnis des Zweiges Gal-(β 1,3)-GalNAc mit dem VP1 sichtbar dargestellt. Dabei besteht eine Wechselwirkung mit der HI-, BC2- und der gegen den Uhrzeiger-

sinn angeordneten DE-Schleife. Die meisten Wasserstoffbrückenbindungen werden dabei von Gal gebildet, das mit Ser68 und Gln84 der BC-Schleife, mit dem Ala70 der BC-Schleife und mit dem Asn138 der DE-Schleife wechselwirkt. Der GalNAc Teil ist nicht direkt an den Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt, jedoch besteht ein Kontakt zwischen der N-Acetyl-Gruppe und den Aminosäuren Ser274 und Thr276.



*Abb. 67: Dargestellt ist die Verbindung zwischen Gal-β1,3-GalNAc und SV40 VP1.

Zusammenfassung

Es kann also gezeigt werden, dass die Affinitätsmessungen mit der Isothermen Titrations-Kalorimetrie eine Wechselwirkung des GM1 mit dem VP1 zeigt. Da es sich um eine schwache Bindung handelt, ergaben sich für wiederholte Messungen etwas abweichende Bindungskonstanten. Somit kann nur ein Bereich von 1-5 mM für die Bindungskonstante des SV40 Virus mit dem GM1 Gangliosid Rezeptor angegeben werden. Die schwache Affinität erlaubt keine Aussage über eine Kooperativität. Der SV40 VP1-GM1 Komplex, wie in den Abbildungen gezeigt, weist außerdem dabei verblüffende Parallelen zum Cholera-Toxin auf, welches denselben Zellzugangspfad benutzt und das GM1 in derselben Konformation bindet [Acq79, Bro80, Mer81].

4.2.4 Charakterisierung der Membranlipide

4.2.4.1 Untersuchungen der Lipide mittels AFM

Zwei unterschiedliche Membranlipide DMPE und DPPE wurden im Bezug auf die Wechselwirkung mit den perfluorierten Verbindungen PFOS und PFOA untersucht. Dazu wurden Methoden wie AFM (Rasterkraftmikroskopie) und RIfS eingesetzt, sowie die thermodynamische Methode ITC.

Die Rasterkraftmikroskopie ist eine Methode die topographische Informationen über die Rauigkeit der Oberfläche einer Probe anhand atomarer Kräfte auf der Nanometerskala liefert. Dabei wird eine Nadel, die sich an einer Feder, dem sogenannten Cantilever, befindet in einem definierten Raster über die Oberfläche der betrachteten Probe geführt. Abhängig von der Oberflächenstruktur und der Position wird die Feder ausgelenkt. Durch das punktweise Aufzeichnen der Auslenkung lässt sich ein Bild der Oberflächenstruktur der betrachteten Probe erzeugen [Bin80].

Die Phospholipidschichten wurden auf Interferenzglas, das später für die RIfS-Messungen benötigt wurde, aufgebracht. Um einen Eindruck über die Beschichtung der Glas-Wafer zu bekommen, wurde die Rasterkraftmikroskopie eingesetzt. Auf den Abbildungen 68 und 69 sind jeweils zwei AFM-Aufnahmen der Membranlipide DMPE und DPPE dargestellt. Für die Aufnahmen wurden jeweils zwei verschiedene Scanbereiche gewählt. Für beide Schichten konnte wie auf den Abbildungen zu erkennen ist, eine erfolgreiche Beschichtung der Glas-Wafer festgestellt werden. Dies bestätigt vor allem der Vergleich der AFM-Aufnahmen mit einem nicht beschichteten Glas-Wafer (Abb. 70). Vergleicht man die beiden Phospholipidschichten miteinander (Abb. 68 mit Abb. 69), so erscheint die DPPC-Schicht für den ausgewählten Scanbereich etwas inhomogener als die DMPE-Schicht. Im Scanbereich der DPPC-Schicht (Abb. 69) sind abwechselnd einige helle und dunkle Stellen zu erkennen, während auf dem Scanbereich der DMPE-Schicht durchgehend dunkle Stellen zu beobachten sind (Abb. 68). Allgemein ist aber für beide Membranlipidschichten eine eher ungleichmäßige Oberflächenstruktur in den aufgenommenen AFM-Scanbereichen zu erkennen.

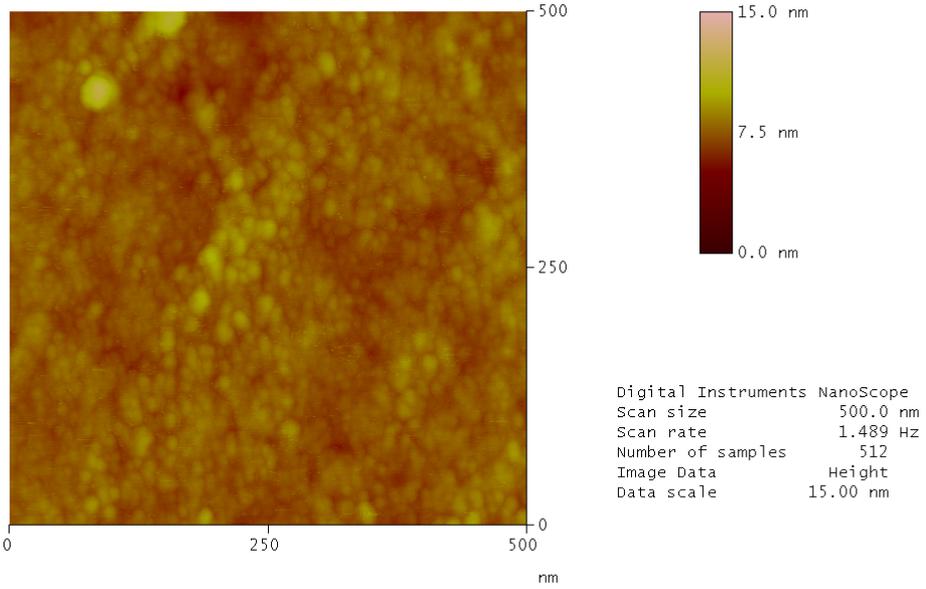
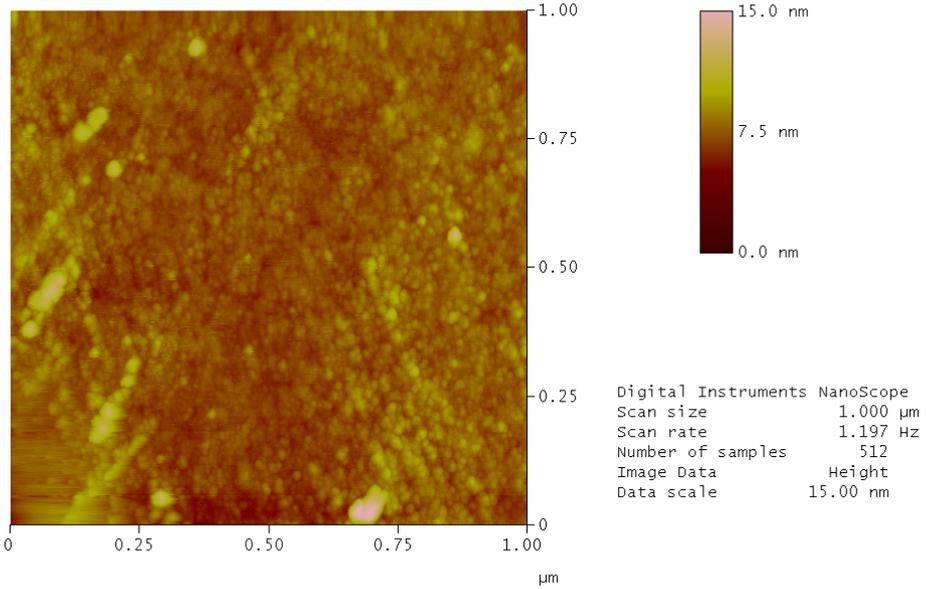


Abb. 68: Die beiden AFM-Bilder zeigen die DMPE-Schicht auf einem Glas-Wafer, mit einem Scan-Bereich von 1 μm (oben) und 500 nm (unten).

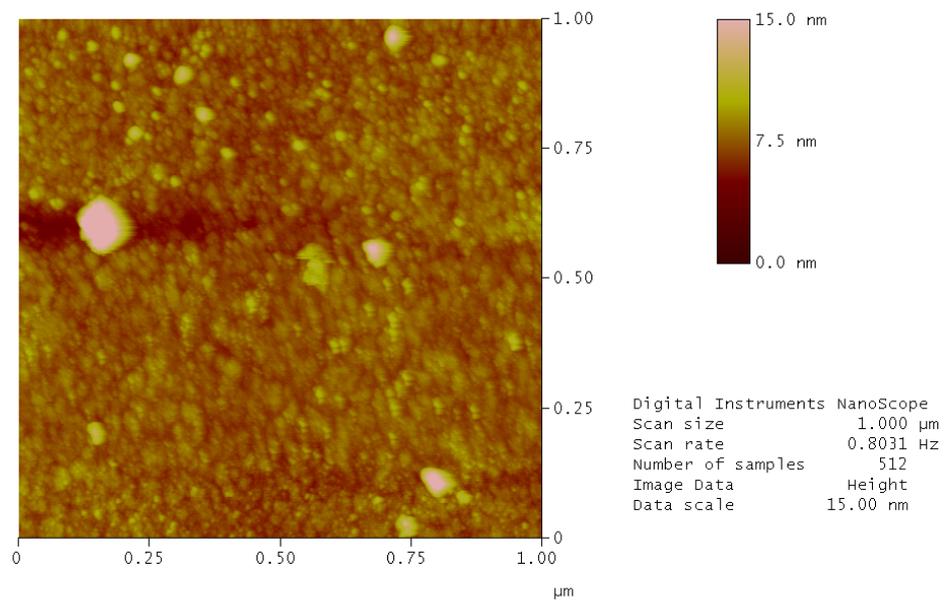
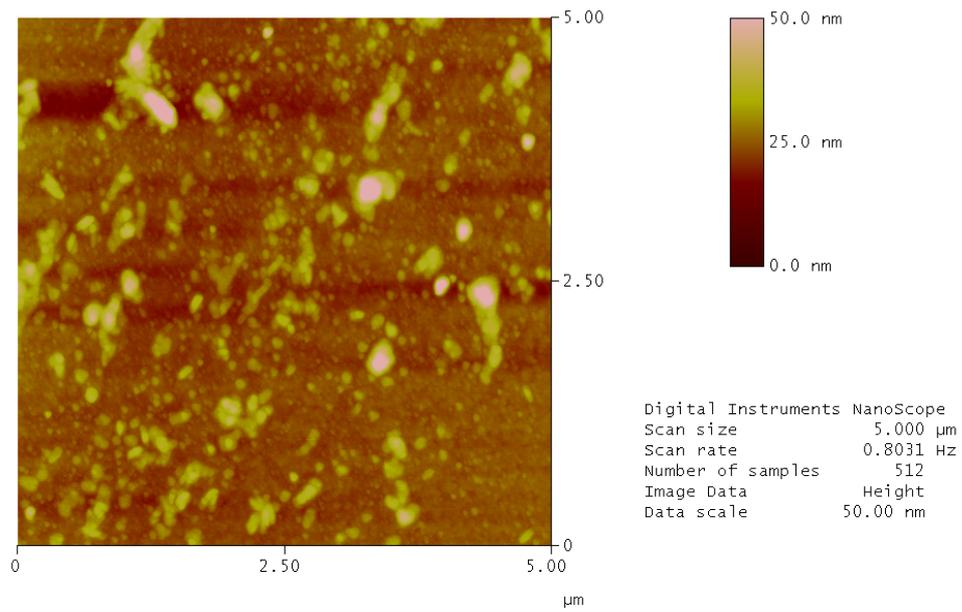


Abb. 69: Diese beiden AFM-Bilder zeigen die DPPC-Schicht auf einem Glas-Wafer, mit einem Scan-Bereich von 5 μm (oben) und 1 μm (unten).

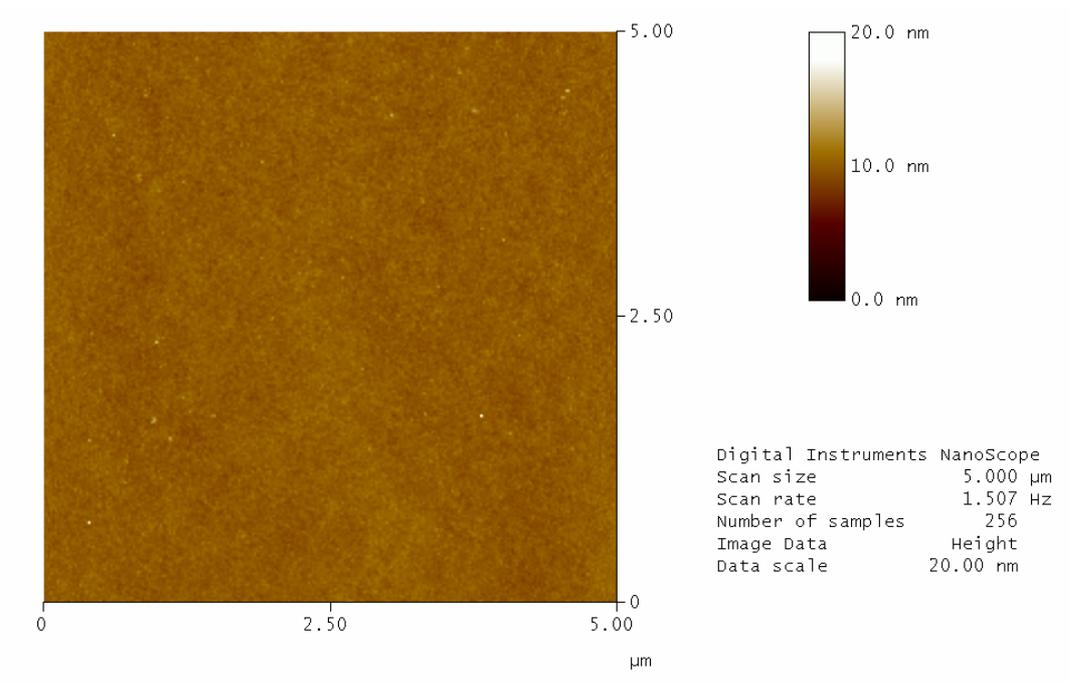


Abb. 70: AFM-Aufnahme eines unbeschichteten Glas-Wafers.

4.2.4.2 Untersuchungen der Lipide anhand der ITC

Als nächstes wurde anhand von thermodynamischen Messungen mit dem Kalorimeter, untersucht, ob eine Wechselwirkung zwischen den Membranlipiden und den Analyten PFOS und PFOA stattfindet. Bei Vorhandensein einer Wechselwirkung ist dies durch die Entstehung von Wärmesignalen zu erkennen. Dafür wurde ein beschichteter Wafer mit dem Phospholipid DMPE in die Messzelle des Kalorimeters eingefügt. Die Referenzzelle blieb in diesem Fall leer, da hier kein Lösungsmittel oder Puffer verwendet wurde, sondern direkt der beschichtete Wafer in die entsprechende Zelle gegeben wurde. Dies hat den Vorteil, dass keine unerwünschten Wechselwirkungen mit einem Lösungsmittel oder Puffer stattfinden und die eigentliche Messung dadurch beeinträchtigen könnten. Es musste lediglich eine Wechselwirkung mit den Glas-Wafern ausgeschlossen werden. Dazu wurden die entsprechenden Referenzmessungen mit den unbeschichteten Wafern durchgeführt. In Abbildung 71a) ist das zeitabhängige Titrations-Leistungssignal der Wechselwirkung von PFOA und DMPE gezeigt. Dabei wurden positive Wärmesignale erhalten, die mit der Zeit abnehmen. Nach der ersten Titration ist eine starke Abnahme der Signalintensität um mehr als die Hälfte des Leistungssignals zu beobachten, nach weiteren drei Titrationsen vermindert sich die Intensität nochmals um etwa die Hälfte bis schließlich eine Sättigung eintritt. Da das Analytmolekül PFOA strukturell sehr groß ist, muss dies nicht bedeuten dass alle Bindungsstellen besetzt wurden und könnte eine Erklärung für die starke Intensitätsabnahme nach nur wenigen Titrationschritten sein. Die Referenzmessung von PFOA mit den Glassubstraten lässt keine nennenswerte Wechselwirkung erkennen (Abb. 71b)).

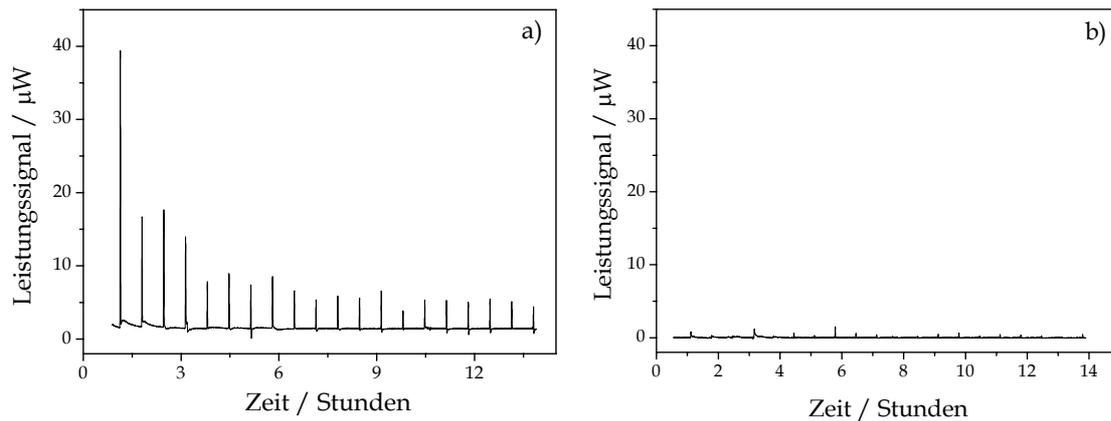


Abb. 71: 11 μL PFOA ($0,6 \mu\text{mol/L}$) wurden zu einem beschichteten Glas-Wafer mit dem Membranlipid DMPE titriert a). In b) ist die entsprechende Referenzmessung mit einem unbeschichteten Glas-Wafer dargestellt.

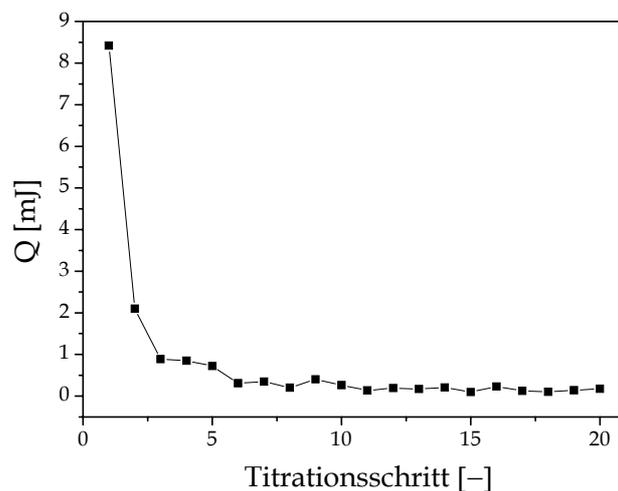


Abb. 72: Integrierte Titrationssignale der ITC-Messung von DMPE mit PFOA.

Während mit PFOA ein positives Wärmesignal erhalten wurde, zeigt die Wechselwirkung von DMPE mit PFOS ein negatives Signal (Abb. 73a). Auch hier nimmt das Leistungssignal mit der Zeit ab. Ebenso wurde eine Referenzmessung mit dem verwendeten Glas-Wafer durchgeführt. Wie in Abbildung 73b) zu erkennen, findet man auch hier nur ein schwaches Wärmesignal, das etwas stärker als in Abbildung 71b) ist.

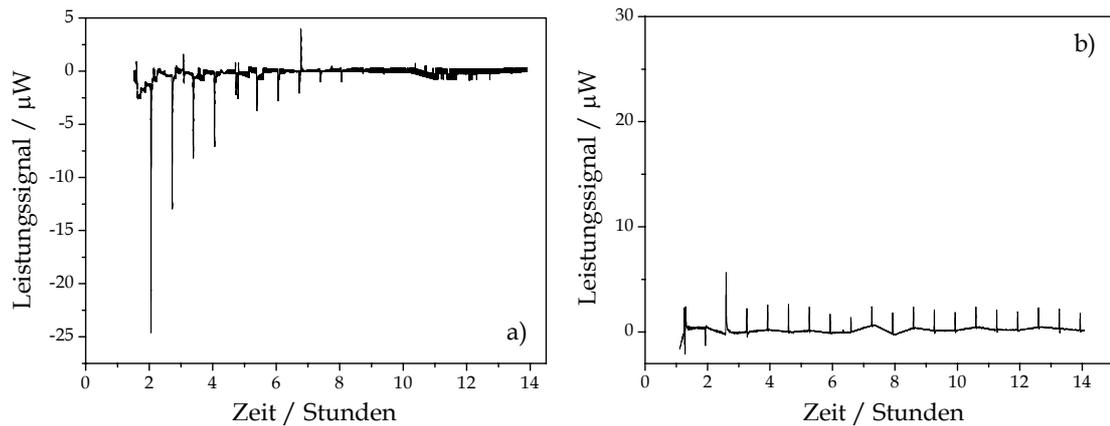


Abb. 73: 11 μL PFOS (3,6 $\mu\text{mol/L}$) wurden zu einem beschichteten Wafer mit dem Lipid DMPE titriert (a). In b) ist die Referenzmessung mit dem nicht beschichteten Wafer zu sehen.

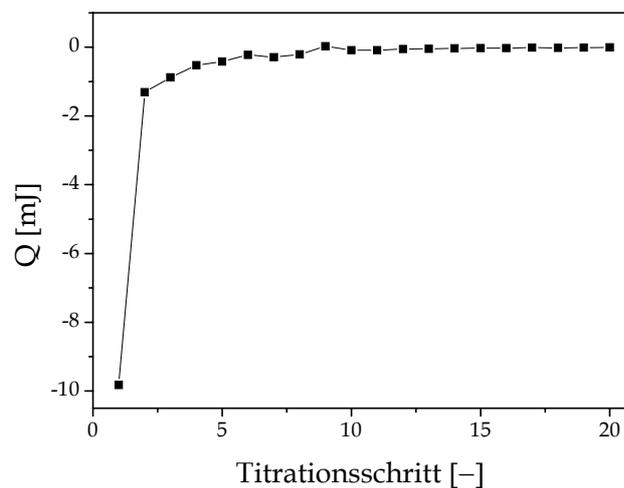


Abb. 74: Integrierte Titrationssignale der ITC-Messung von DMPE mit PFOS.

In beiden Messungen kann eine Wechselwirkung der Analyten mit den Membranlipiden festgestellt werden. Bei Auftragung der integrierten Titrationssignale erhält man dabei für die Wärmemenge von DMPE mit PFOA einen Wert von 8.42 mJ (Abb. 72), während für PFOS eine Wärmemenge von -9.83 mJ (Abb. 74) erreicht wird. Dies bedeutet dass bei der Reaktion des Lipids mit PFOA Wärme frei wird, es handelt sich also um eine exotherme Reaktion, während bei der Reaktion des Membranlipids DMPE mit PFOS Wärme aufgenommen wird, und damit eine endotherme Reaktion vorliegt.

Betrachtet man die Struktur der Analyten PFOA, PFOS und die des Membranlipids DMPE, so lässt sich vermuten dass die beiden Analytmoleküle mit der funktionellen Gruppe des DMPE, dem Ethanolamin (Abb. 14), eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen. Im Gegensatz zum PFOA hat das PFOS Molekül am Schwefelatom zwei doppelt gebundene Sauerstoffatome neben der Hydroxylgruppe (Abb. 15). Somit könnte die Wechselwirkungsreaktion sterisch gehinderter sein als beim PFOA. Das positive Energiesignal des PFOA-Moleküls (Abb. 71) im Vergleich zum PFOS, könnte dabei eine Folge der besser zugänglichen funktionellen Carboxylgruppe des Analytmoleküls PFOA sein.

4.2.4.3 Untersuchungen der Lipide mittels RfS

Für die Untersuchung der Membranlipide DMPE und DPPC auf spezifische bzw. unspezifische Wechselwirkung mit den Analytmolekülen wurde die Reflektometrische Interferenzspektroskopie eingesetzt. Die erste Messung erfolgte mit dem Vergleichsmolekül Ovalbumin und den beiden Membranlipiden DPPC und DMPE. Es wurden dabei jeweils 1 mg/mL Ovalbumin mit einem mit DMPE und DPPC beschichteten Wafer vermessen. In Abbildung 75 ist das Bindungssignal mit der unspezifischen Wechselwirkung von Ovalbumin mit dem Membranlipid DMPE gezeigt, während Abbildung 76 die unspezifische Wechselwirkung von Ovalbumin mit der DPPC-Schicht gezeigt verdeutlicht.

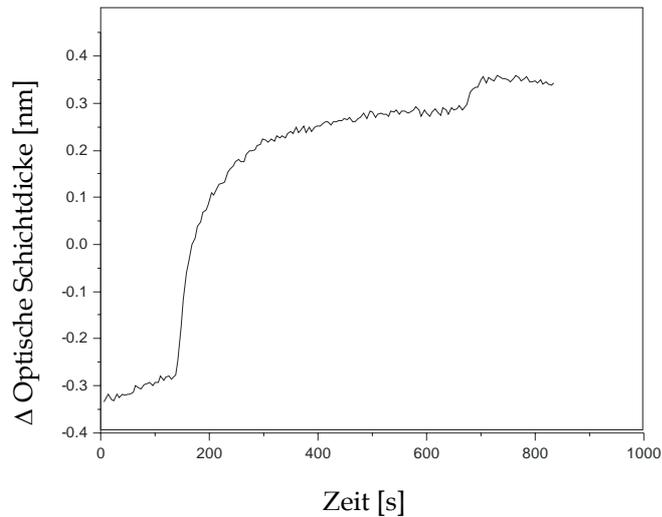


Abb. 75: RIfS-Messung mit Ovalbumin und einem mit DPPC beschichteten Glas-Wafer.

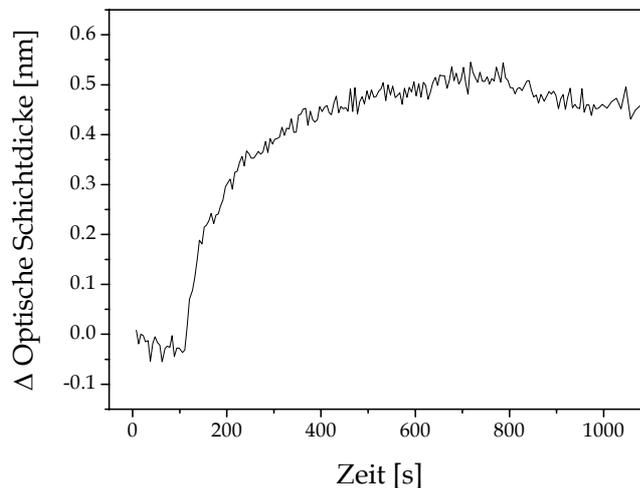


Abb. 76: RIfS-Messung mit Ovalbumin und einem mit DMPE beschichteten Glas-Wafer.

Für die Phospholipidschicht DPPC ergab sich dabei eine Änderung der optischen Schichtdicke um 0.35 nm und für die DMPE-Schicht eine Schichtdickenänderung um etwa 0.5 nm. Somit bewirkt das Ovalbumin eine um zirka 0.15 nm stärkere Schichtdickenänderung bei DMPE als bei dem Membranlipid DPPC. Abbildung 77 zeigt die RIfS-Messung mit Perfluorooctansäure (PFOA) und einen mit DPPC beschichteten Wafer. Es wurden 100 μ L/mL PFOA über die DPPC-Schicht gelassen und dabei eine optische Schichtdickenänderung von etwa 0.06 nm erhalten. Somit ist die Schichtdickenänderung für die unspezifische Wechselwirkung mit Ovalbumin um rund 0.29 nm größer als für die Wechselwirkung mit PFOA.

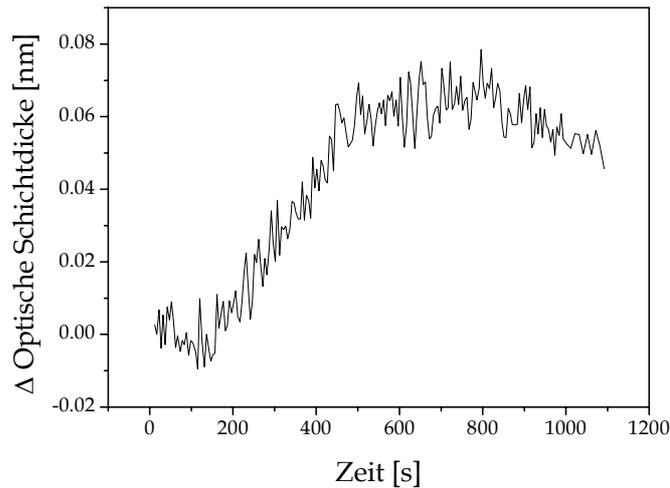


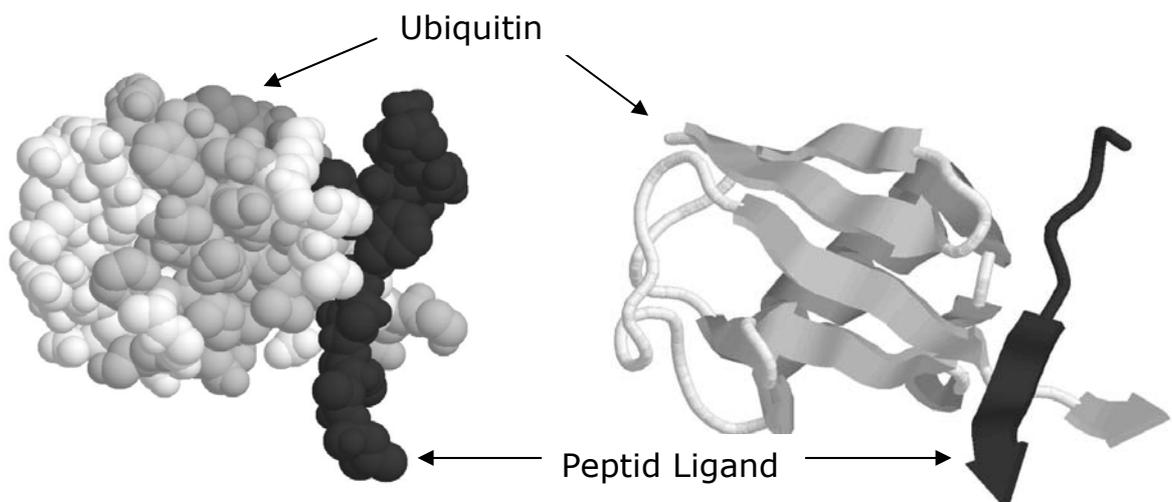
Abb. 77: RIFS-Messung mit PFOA und einem DPPC beschichtet Glas-Wafer.

Zusammenfassung

Es konnte mit den AFM-Messungen gezeigt werden, dass eine Beschichtung der Glas-Wafer stattgefunden hat. Für den ausgewählten AFM-Scanbereich wirkt die DMPE-Lipidschicht im Vergleich zum der DPPC-Schicht etwas homogener. Die folgenden Messungen zur Isothermen Titrations-Kalorimetrie zeigten, dass eine Wechselwirkung zwischen den Analyten PFOA und PFOS und dem Membranlipid DMPE stattfindet. Während aber PFOA exotherm mit der Lipidschicht reagierte wurde für PFOS eine endotherme Wechselwirkung gemessen. Schlussendlich aber zeigten die RIFS-Messungen, dass die Wechselwirkungen der Membranlipide sehr unspezifisch sind. Zukünftige Arbeiten auf diesem Gebiet müssten eine Entwicklung spezifisch bindender Membranlipide beinhalten, dies könnte zum Beispiel durch die Modifizierung der Membranlipide erreicht werden.

4.2.5 Affinitätsbestimmung von Ubiquitin mit Peptiden

Ein potentieller Binder für Ubiquitin mit der Peptidsequenz WGLRALESRW-DRYYF-NH₂ wurde 2004 mit einer Bindungskonstante von $12 \pm 4 \mu\text{M}$, veröffentlicht [Red81]. Allerdings ist dieses Peptid kein natürlicher Binder. Ein natürlicher Ubiquitinbinder im niederen Mikromolarbereich war bis dahin noch nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde die Bindungskonstante mittels der ITC bestimmt. Um vergleichbare Ergebnisse im Bezug auf die veröffentlichten Bindungskonstanten zu gewährleisten, wurde das veröffentlichte Peptid WGLRALESRWDRYYF-NH₂ (2017 Dalton) und das ebenfalls „bindende“ Peptid RWDYYF-NH₂ (1.1 kDalton) synthetisiert, und mit dem aus menschlichem UCH-L3 erhaltenen Peptid DPDELRFNIAL-NH₂ (1.7 kDalton) verglichen [Rot54]. In Abbildung 78 ist die Ubiquitin-Peptid Wechselwirkung graphisch dargestellt. Alle gewählten Peptidsequenzen wechselwirken dabei mit derselben „Bindungsfurche“ nahe dem C-Terminus des Ubiquitins.



#Abb. 78: Darstellung die Ubiquitin-Peptid Wechselwirkung. In Bänderstruktur ist das Ubiquitin und in dunkelgrau der Peptid Ligand (DPDELRFNIAL) graphisch gezeigt.

Die ITC-Messungen wurden bei 293 K, mit einer 500 μL Hamilton Spritze und 1 mL Reaktion- bzw. Referenzgefäße durchgeführt. Die Stöchiometrie der Reaktion ist mit einem Verhältnis von 1:1 bekannt. Die langen Messzeiten zwischen den einzelnen Titrationsen wurden entsprechend so gewählt, um die Genauigkeit der Messung zu sichern. Die ITC-Messungen wurden kalibriert und die

Referenzmessungen erfolgten durch Titration der Peptide zu PBS und Puffer zu Ubiquitin. Die Referenzmessungen erfolgten durch Titration der Peptide zu PBS und Puffer zu Ubiquitin.

In Abbildung 79 und 80 sind jeweils in den oberen Hälften die zeitlich aufgelösten Leistungssignale und darunter jeweils die integrierten Leistungssignale in Abhängigkeit des Molverhältnisses dargestellt. Das Rauschen der Basislinie macht sich aufgrund der niedrigen Signalintensität etwas stärker bemerkbar.

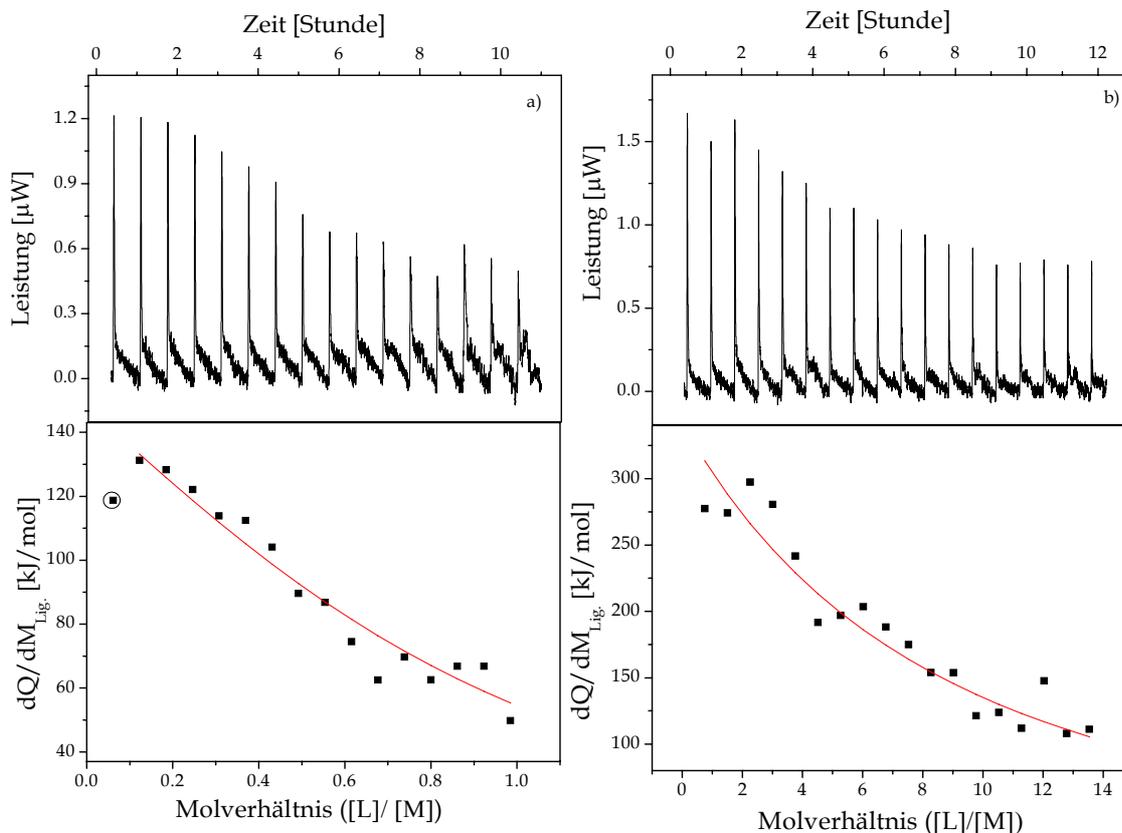


Abb. 79: Dargestellt sind die zeitlich aufgelösten Leistungssignale sowie die integrierten Titrationssignale mit Kurvenfit der Peptide a) DPDELRFNIAAL-NH₂ b) WGLRALESRWDRYYF-NH₂ mit Ubiquitin.

Durch Integration der Leistungssignale konnte die Enthalpie und durch Kurvenfit der jeweiligen Spektren in Abbildung 79 und 80 daraus die Bindungskonstante (Gl. 23) der drei ausgewählten Peptide bestimmt werden. Die Auswertung der Daten und Bestimmung der Bindungskonstanten erfolgte dabei wie in Kapitel 4.2.3.

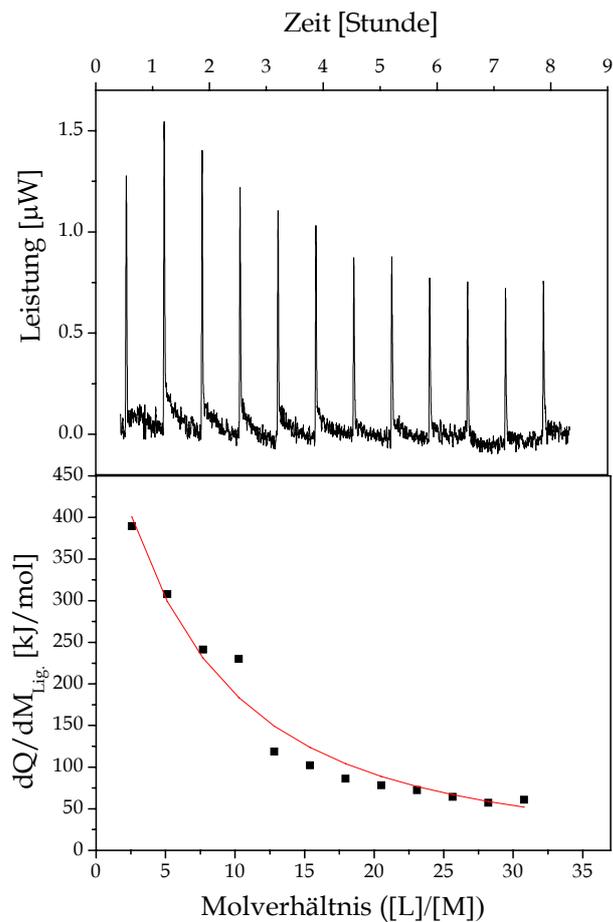


Abb. 80: Dargestellt sind die zeitlich aufgelösten Leistungssignale sowie die integrierten Titrationssignale mit Kurvenfit von RWDRYYF-NH₂ mit Ubiquitin.

Der eingekreiste Wert in Abb. 79a) wurde bei der Berechnung der Bindungskonstante ausgeschlossen. Anhand der Ergebnisse der Kalorimetriemessungen konnten die veröffentlichten Bindungskonstanten bestätigt werden, und im Falle des Binders RWDRYYF-NH₂ sogar eine bessere Affinität bestimmt werden. In Tabelle 3 sind die erhaltenen Bindungskonstanten für die Peptide aufgelistet.

Peptidsequenzen	Gemessene Bindungskonstante in μM	Veröffentlichte Bindungskonstante in μM
DPDELRFNAIAL-NH ₂	10 ± 2	-
WGLRALESRWDRY YF-NH ₂	13 ± 2	12 ± 4
RWDRYYF-NH ₂	17 ± 4	33 ± 5

Tabelle 3: Gemessene und veröffentlichte Bindungskonstanten im Vergleich.

Das Dodecapeptid DPDELRFNAIAL-NH₂ aus der humanen Ubiquitin Carboxyhydrolase zeigt im Vergleich zum veröffentlichten Pentadekapeptid WGLRALESRWDRYYF-NH₂ eine etwas bessere Affinität von $10 \pm 2 \mu\text{M}$.

Zusammenfassung

Ein neuer peptidischer Ligand sollte für das Ubiquitin identifiziert werden. Dazu wurde das Dodecapeptid aus Kristallstrukturen von Ubiquitin Protein-Komplexen abgeleitet. Mit der ITC konnte neben weiteren Anwendungen wie RfS eine Affinität von etwa $10 \mu\text{M}$ gemessen werden. Das Dodecapeptid kann somit als Ubiquitin-Ligand anerkannt und für die Trennung von verschiedenen Ubiquitinpolymeren verwendet werden. Die Bindungskonstante des nicht natürlichen Pentadekapeptides konnte bestätigt werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Wechselwirkung von chemischen und biochemischen Systemen mit Analytmolekülen durchgeführt, die aktuell im Forschungsbereich der Umwelt und Medizin Interesse finden. Eine Reihe von Charakterisierungsmethoden kamen dabei zum Einsatz. Für thermodynamische Untersuchungen wurde die Isotherme Titrations-Kalorimetrie eingesetzt, während für die Oberflächencharakterisierung hauptsächlich die Ellipsometrie neben der AFM Anwendung fand. Desweiteren wurden die Reflektometrische Interferenzspektroskopie, die IR- und NMR-Spektroskopie für die Wechselwirkungsuntersuchungen angewendet. Die untersuchten Systeme sollen dabei zum größten Teil im Bereich der Chemo- und Biosensorik als sensitive Schicht zum Einsatz kommen.

Die Wechselwirkungen der untersuchten Systeme mit Analytmolekülen zeigten sich in der Kalorimetrie durch Entstehung von Wärmedifferenzen im Vergleich zum äußeren isothermen Wärmebad. Dabei kommt es bei Wechselwirkung entweder zur Aufnahme oder Abgabe von Energie. Die markierungsfreie Bestimmung der Bindungskonstante und die damit verbundene Ermittlung von weiteren thermodynamischen Größen wie der Bindungsenthalpie, zeigt einer der Vorteile der Methode gegenüber den auf Markierung einer Komponente beruhenden Messtechniken. Zudem ist auch keine Immobilisierung auf Interferenzglas oder ähnlichen Transducern nötig, wie es bei der Reflektometrische Interferenzspektroskopie der Fall ist und dies gleichzeitig der ITC den Vorzug bringen kann. Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Methoden ist, dass direkt die freiwerdende bzw. aufgenommene Wärme bei Wechselwirkung zweier Komponenten detektiert wird. Im Bereich der biochemischen und pharmazeutischen Forschung ist diese Methode deshalb bereits ein maßgebliches Instrument für die Untersuchung von Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen. Nachteile der ITC sind allerdings die langen Messzeiten und die teilweise benötigten hohen Probenkonzentrationen.

Aus zeitaufgelösten Wärmesignalen ließen sich daraus Reaktionsabläufe, wie es im Kapitel 4.1.2.1 bei Untersuchung des chemischen PDMS-R4A Systems erfolgte, nachvollziehen. Hier konnte durch umfassende Charakterisierung gut das Verhalten des PDMS-R4A Systems in Wechselwirkung mit polaren Analyten besser ver-

standen werden. Mit ITC und RIfS konnten Bindungsereignisse zeitlich verfolgt werden, während mit IR und NMR zusätzlich Methoden für die Strukturaufklärung zum Einsatz kamen. Es konnte somit eine molekulare Erkennungsstruktur erfolgreich in ein Polymersystem eingeführt werden. Ausblickend lässt sich hier sagen, dass durch weitere Modifikationen des R4A-Selektors sich dadurch für dieses Sensorsystem eine zusätzliche Anzahl von sensorischen Anwendungsmöglichkeiten eröffnet. Auch mit den molekular geprägten Polymeren konnte eine Wechselwirkung mit Atrazin anhand der ITC nachgewiesen werden, obwohl diese auf Grund ihrer schlechten Löslichkeit in Wasser nur schwer zu messen waren und dies zugleich der Grund war, weshalb keine RIfS-Messungen in Wasser möglich waren. Aus zeitlich aufgelösten Wärmesignalen konnte bei Kenntnis der molekularen Masse der Systeme und entsprechend guter Wechselwirkungssignale nicht nur die Wechselwirkungsenergie, sondern auch die thermodynamischen Größen wie Enthalpie, Bindungskonstante, die freie Energie und die Entropie bestimmt bzw. berechnet werden. Dies erfolgte im Kapitel 4.3.2 bei der Untersuchung des biochemischen Systems SV40 in Wechselwirkung mit seinem Gangliosid Rezeptor GM1. Ebenso konnten für das System Ubiquitin in Wechselwirkung mit Peptiden Bindungskonstanten bestimmt werden. Hier konnte im Vergleich zu einem bereits veröffentlichten Pentadekapeptid eine etwas bessere Affinität mit dem natürlichen Dodecapeptid gemessen werden. Ein weiteres biochemisch untersuchtes System waren die Phospholipide, die im Rahmen des EU-Projektes BBMO untersucht wurden. Hier konnte, nachdem mit AFM eine Beschichtung der Glaswafer nachgewiesen wurde, zwar mit der Kalorimetrie eine Wechselwirkungsenergie gemessen werden, allerdings zeigte sich anhand der RIfS-Messungen das es sich dabei um unspezifische Wechselwirkungen des Analyten mit den Membranlipiden handelte. Hier könnte in zukünftige Arbeiten durch zusätzliche Modifikation der Lipide eine selektivere bzw. spezifischere Anbindung der Analytmoleküle an die Oberfläche des Sensors erreicht werden. Somit konnte in dieser Arbeit gut gezeigt werden, dass die Kalorimetrie für die Untersuchung sowohl von chemischen als auch biochemischen System geeignet ist, sogar Messungen im niedrigen Affinitätsbereich konnten erfolgreich durchgeführt werden. Jedoch haben vor allem die Wechselwirkungsuntersuchungen der Phospholipide mit den perfluorierten Verbindungen gezeigt, dass nicht zwischen

spezifischer und unspezifischer Wechselwirkung unterschieden werden kann. Dies wurde erst durch RIfS-Messungen deutlich.

In der Ellipsometrie zeigt sich die Wechselwirkung mit Analytmolekülen durch die Änderung der optischen Parameter ($\Delta(n \cdot d)$). Diese Änderungen können zum einen auf die Quellung des Filmes durch Analyteinlagerung (Δd) und zum anderen durch die Entstehung von Mischphasen bei Analyteinlagerung, deren Dispersion sich dadurch ändern kann (Δn), zurückgeführt werden. Die Trennung dieser beiden Effekte ist bei optischen Messverfahren wie z. B. RIfS nicht möglich, deshalb sollte in dieser Arbeit die Schichtdicke und die Dispersion von chemischen und biochemischen Schichten bei Wechselwirkung mit Analytmolekülen untersucht werden. Die Anwendung von Ellipsometrie für die Untersuchung der Quellung von Polymeren bei Wechselwirkung mit organischen Lösungsmitteln sowie die Schichtdickenzunahme bei Antigen-Antikörperwechselwirkung konnte gut gezeigt werden. Der Brechungsindex der chemischen und biochemischen Systeme konnte gut mit geringen Fehlern bestimmt werden, wobei die Änderung durch Analyteinfluß meistens nur sehr gering war. Bei kleinen Konzentrationen lagen die Änderungen sogar im Bereich der Fehler und die erwartete Tendenz von Anstieg bzw. Abnahme ist nicht immer zu beobachten. Somit können aus den Ergebnissen der ellipsometrischen Messungen wertvolle Informationen für RIfS-Messungen gezogen werden.

Die Untersuchung der Polymerschicht PDMS mit chlorierten und aromatischen organischen Verbindungen sowie der anorganischen Verbindung HCl zeigten, in den meisten Fällen Quellverhalten, die den bekanntesten Sorptionsmodellen entsprachen. Nur für Salzsäure und Phenol wurde ein Verhalten, das nicht den bekannten Sorptionsmodellen zugewiesen werden konnte, beobachtet. Aber hier konnte wie in Kapitel 4.1.1.1 beschrieben, eine Erklärung für das Quellverhalten gefunden werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die sensitive PDMS-Schicht nicht durch die Dechlorierung chlorierter Verbindungen bedingt gebildete Salzsäure angegriffen wird. Die Ψ und Δ -Werten der Spektren zeigten zudem die charakteristischen Verschiebungen bei Schichtdickenwachstum. Eine sensitive Wirkung des PDMS-Polymers mit organischen Analyten konnte ellipsometrisch somit gut nachgewiesen werden. Als biochemisches System wurde ellipsometrisch der systematische Schichtenaufbau des Sensors für Prostata-spezifisches Antigen untersucht. Die Messungen erfolgten für diesen Immunoassay an Luft

und dies könnte zugleich einer der Gründe sein, weshalb nach Immobilisierung des Antikörpers nur eine schwache Schichtdickenzunahme stattfand, obwohl die Schichtdickenzunahme um einiges höher hätte ausfallen müssen. Weitere Messungen unter Pufferlösung konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Ein weiteres biochemisches System, das mittels Ellipsometrie untersucht wurde, war die Charakterisierung des Sensors für den Progesteron-Antikörper. Dieses System wurde sowohl an Luft als auch unter Pufferlösung gemessen. Es zeigt sich in den Ergebnissen (Kapitel 4.2.1), dass im Vergleich zu den Messungen an Luft, eine deutliche Quellung der Schichten in Flüssigkeit stattfand. Aber auch die Messungen an Luft zeigen nach Immobilisierung des Antikörpers eine merkliche Zunahme der Schichtdicke, so dass im Vergleich zum PSA-Sensor eine gute Anbindung des Antikörpers an die Sensoroberfläche nachgewiesen werden konnte. Schließlich konnte auch mit der Ellipsometrie eine vielfältige Anwendung der Methode an chemischen und biochemischen Systemen sowohl an Luft und in flüssiger Phase gezeigt werden.

Letztendlich ermöglichte die Anwendung und Kombination verschiedener Methoden und der daraus erhaltenen Informationen, vor allem in der Polymerchemie, eine sinnvolle Interpretation der Ergebnisse.

6. Abkürzungen

<i>a</i>	Assoziation
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy)
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Asn	Asparagin
ATR	Attenuated Total Reflection (verminderte Totalreflexion)
<i>d</i>	Dissoziation
$d_{\text{phy.}}$	Physikalische Schichtdicke
Da	Dalton
DMPE	Dimethoxyphenyläthylamin
DPPC	Dipalmitoylphatidylcholin
DTT	Dithiothreitol (Clelands Reagenz)
EDCs	Endocrine Disrupting Chemicals
FT	Fourier-Transformation
g	Gramm
Gal	Galactose
Glc	Glycose
Gln	Glutamin
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid
GOPTS	3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan
gUZS	gegen Uhrzeigersinn
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>I</i>	Strom, Intensität
<i>IR</i>	Infrarot Spektroskopie
<i>ITC</i>	Isotherme Titrations-Kalorimetrie
<i>J</i>	Joule

<i>K</i>	Kelvin
<i>k</i>	Imaginärteil des Brechungsindex
<i>L</i>	Liter
<i>Leu</i>	Leucin
<i>m</i>	Meter
<i>MIP</i>	Molekularly Imprinted Polymers
<i>Min.</i>	Minute
<i>M_{Lig.}</i>	Menge an zugetropftem Liganden
<i>N</i>	Newton
<i>n</i>	Brechungsindex
\tilde{n}	Komplexer Brechungsindex
<i>(nd)</i>	Optische Schichtdicke im Gleichgewicht der Quellung
<i>(nd)₀</i>	Optische Schichtdicke vor dem Quellvorgang
<i>nm</i>	Nanometer
<i>Norm.</i>	Normiert
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction), wird zur Erkennung von Vireneinfektionen verwendet.
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, die Natriumchlorid, Dinatriumhydrogenphosphat, Kaliumchlorid und Kaliumdihydrogenphosphat enthält.
pdp	Proteindatenbank
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEI	Polyethylenimin
PFOA	Perfluoractansäure
PFOS	Perfluoractansulfonat
ppm	Parts per Million = mL/m ³
PSA	Poly-Streptavidin
Q	Wärmemenge (Joule)
R	Widerstand

R	Austauschfaktor
<i>RAE</i>	Ellipsometer mit rotierenden Analysator
<i>RfS</i>	Reflektometrische Interferenz-Spektroskopie
rpm	Rounds per Minute
R4A	Resorcin[4]aren
S	Empfindlichkeit
s	Sekunde
Ser	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfate)
S_{normiert}	Normierte Empfindlichkeit
SV40	Simian Virus 40 (Affenvirus 40)
T	Temperatur
t	Zeit
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
UCH-L3	Ubiquitin Carboxyhydrolase L3
UZS	Uhrzeigersinn
V_0	Probenvolumen
W	Watt (J/s)
α	Absorptionskoeffizient
Δ	Ellipsometrischer Winkel; Phasenverschiebung
λ	Wellenlänge
ε	systemspezifische Kalibrierkonstante
ϕ	Winkel
Ψ	Ellipsometrischer Winkel

7. Literatur

- [Abu23] J. Albuquerque, S. Jackson, M. Pimentel, V. Silva, I. Raimundo. J. Tohwedder, C. Pasquini, *Anal. Chem*, 77, 72, 2005.
- [Acq79] D. Acquotti, L. Poppe, J. Dabrowski, C. W. Von der Lieth, S. Sonnino, G. Tettamanti, *J. Am. Chem. Soc*, 112, 7772-7778, 1990.
- [Ark18] B. Arkles, *Chemtech.*, 13, 542, 1983.
- [Arn57] J. Arnold, S. Dawson, J. Fergusson, J. Lowe, M. Landon, R.J. Mayer, Ubiquitin and its role in neurodegeneration, *Prog. Brain Res.*, 117, 23-34, 1998.
- [Asp14] D. E. Aspes, J. B. Theeten, F. Hottier, *Phys. Rev. B*, 20, 3292, 1979.
- [Bel33] A.-S. Belmont, S. Jäger, D. Knopp, R. Niessner, G. Gauglitz, K. Haupt, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 3267-3272, 2007.
- [Bel72] A.-S. Belmont, Dissertation, Lund Universität, 2006.
- [Ber12] L. Bergmann, C. Schäfer, *Lehrbuch der Experimentalphysik, Optik*, Walter de Gruyter, Berlin, 1993.
- [Bil69] R. Bilewicz, M. Majda, *Langmuir*, 7, 2794-2802, 1991.
- [Bin80] G. Binnig, C. F. Quate and C. Gerber: Atomic force microscope, *Physical Review Letters* 56, 930-933, 1986.
- [Bis67] H. Bisswanger, *Enzymkinetik*, Wiley-VCH, 2000.
- [Bla81] M. J. Blandamer, P. M. Cullis, J. F. N. Engberts, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 94, 2261-2267, 1998.
- [Blo68] K. B. Blodgett, *I. Langmuir, Phys. Rev.* 51, 964, 1937.
- [Bra37] J. Brandrup, E. H. Immergut, *Polymer Handbook*, John & Sons, New York, 1989.
- [Bro80] P. Brocca, P. Berhault, S. Sonnino, *Biophys. J.*, 74, 309-318, 1998.
- [Byf73] M. P. Byfield, R. A. Abuknesha, *Biosensors & Bioelectronics*, 9, 373, 1994.
- [Cam20] K. Cammann, *Instrumentelle Analytische Chemie*, Spektrum Akad. Verl., 2001.
- [Cam46] M. A. Campanero-Rhodes, A. Smith, W. Chai, S. Sonnino, L. Mauri, R. A. Childs, Y. Zhang, H. Ewers, A. Helenius, A. Imberty, T. Feizi, *J. Virol.*, 2007.
- [Che44] <http://www.chemgapedia.de>.
- [Col58] M.P. Coleman, R.R. Ribchester, Programmed axon death, synaptic dysfunction and the ubiquitin proteasome system, *Curr. Drug Tar-*

- gets. *CNS. Neurol. Disord.*, 3, 227-238, 2004.
- [Coz71] O. Cozar, N. Leopold, C. Jelic, V. Chis, L. David, A. Mocanu, M. Tomoaia-Cotisel, *J. Mol. Struct.* 788, 1-6, 2006.
- [Dan10] K. Danzer, E. Than, D. Molch, L. Kuchler, *Analytik*, Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaft mbH, 1987.
- [Daw59] T.M. Dawson, V.L. Dawson, Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease, *Science*, 302, 819-822, 2003.
- [Doy51] M. L. Doyle, *Anal. Biotechnol.*, 8, 31-35, 1997.
- [Eli39] H.-G. Elias, *Makromoleküle*, Hütig & Wepf, neubearb. Aufl., 1992.
- [Fin53] D. Finley, A. Ciechanover, A. Varshavsky, *Cell*, 116, S29-32, 2004.
- [Gai90] S. Gaisford M. A. A. O'Neill, *Pharmaceutical Isothermal Calorimetry*, Informa Healthcare USA, 2007.
- [Gli56] M.H. Glickman, A. Ciechanover, The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiol Rev.*, 82, 373-428, 2002.
- [Göp40] W. Göpel, J. Hesse, J. N. Zemel, *Sensors*, 3, *Chemical and Biochemical Sensors*, Verlag Chemie, Weinheim, 1992.
- [Gut25] C. D. Gutsche, *Calixarenes*, Royal Society of Chemistry, 1989.
- [Gut28] C. D. Gutsche, I. Alam, M. Iqbal, T. Mangiafico, K. C. Nam, J. Rogers, K. A. See, *J. Incl. Pheno. Mol. Recogn. Chem.*, 1989, 7, 61-72.
- [Hal80] D. Hallén, *Pure & Appl. Chem.*, 65, 1527-1532, 1993.
- [Hau15] M. Haug, K. D. Schierbaum, G. Gauglitz, W. Göpel, *Sens. Act. B*, 1993, 11, S. 383-391.
- [Hau32] K. Haupt, K. Mosbach, *Molecularly Imprinted Polymers and their use in Biometric Sensors*, *Chem. Rev.*, 100, 2495-2504, 2000.
- [Hau35] M. Haug, K. D. Schierbaum, G. Gauglitz, W. Göpel, *Sens. Act. B*, 11, 383, 1993.
- [Heh40] K. Hehl, *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1998.
- [Her75] M. Herold, *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2001.
- [Hor60] K. Horton, C.S. Forsyth, N. Sibtain, S. Ball, C.J. Bruton, M.C. Royston, M.C. Roberts, *Psychiatry Res.*, 48, 145-152, 1993.
- [Hou10] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Zhang, *Angew. Chem.*, 115, 5020-5046, 2003.
- [Inf30] <http://www.infu.tu-dortmund.de/Projekte/MIP>

- [Käp74] N. Käppel, Dissertation, Immunoassay-Optimierung für verschiedene Probenmatrices, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2007.
- [Kra38] G. Kraus, G. Gauglitz, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 30, 211, 1995.
- [Kri28] H. R. Kricheldorf, C. Burger, *Silicon in polymer synthesis*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1996
- [Krum52] Vijay-Kumar, S. Bugg, C. E. Wilkinson, K. D. Cook, W.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 3582-3585, 1985.
- [Kun11] I. E. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P.A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9997-10002, 1999.
- [Kur43] R. Kurschat, Schadstoffe für die Ewigkeit, 27. September 2006, Neue Zürcher Zeitung (NZZ online).
- [Lay61] R. Layfield, J. Lowe, L. Bedford, *The ubiquitin-proteasome system and neurodegenerative disorders*, *Essays Biochem.*, 41, 157-171. 2005.
- [Lea91] S. Leavitt, E. Freire, *Biophysical methods*, 11, 560-566, 2001.
- [Lid51] R. C. Liddington, Y. Yan, J. Moulai, R. Sahli, T. L. Benjamin, S. C. Harrison, *Nature*, 354, 278-285, 1991.
- [Low77] J. A. Low, B. Magnuson, B. Tsai, M. J. Imperiale, *J. Virol.*, 80(3), 1361-1366, 2006.
- [Lüt65] J. Lüthje, *Enzymkinetik*, Urban und Schwarzenberg, 1990.
- [May20] J. Mayer, J. Bürck, A. Ache, *Fres. J. Anal. Chem.*, 354, 841, 1996.
- [May55] R. J. Mayer, A. Ciechanover, M. Rechsteiner, *Protein Degradation Vol.2: The Ubiquitin-Proteasome System*, WILEY-VCH Verlag, ISBN: 3-527-31130-0, 2005.
- [May62] R. J. Mayer, L. Laszlo, M. Landon, J. Hope, J. Lowe, *Ubiquitin, lysosomes, and neurodegenerative diseases*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 674, 149-160, 1992.
- [Maz71] B. Mazaikoff, *Anal. Chem.*, 75, 258-267, 2003.
- [Mer81] E. A. Merritt, S. Sarfaty, F. van der Akker, C. L'Hoir, J.A. WG, *Protein Sci*, 3, 166-175, 1994.
- [Nay41] Naylor T. V., *Comprehensive Polymer Science*, Vol. 2, Polymer Properties, Pergamon Press, Oxford, 1989.
- [Neu45] U. Neu, Diplomarbeit, Tübingen, Mai 2006.
- [Ng16] J. M. K. Ng, I. Gitlin, A. D. Stroock, G. M. Whitesides, *Electrophoresis* 2002, 23, 3461-3473.

- [Nic60] U. Nickel, Lehrbuch der Thermodynamik, Hansen, 1995.
- [Nol27] W. Noll, Chemie und Technologie der Silicone, 2. Auflage, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1968.
- [Nop26] D. Nopper, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2000.
- [Oci25] K. Ocicka, H. Radecka, J. Radecki, M. Pietraszkiewicz, O Pietraszkiewicz, *Sens. Act. B*, 89, 217, 2003.
- [Onm43] <http://www.onmeda.de>.
- [Ott30] M. Otto, Analytische Chemie, WILEY-VCH GmbH & Co.KGaA, 2006.
- [Per51] R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza, *J. Recept. Sig. Trans.*, 24, 1-52, 2004.
- [Pie51] M. M. Pierce, C. S. Raman, B. T. Nall, *Methods*, 19, 213-221, 1999.
- [Pie76] J. Piehler, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1997.
- [Rös21] S. Rösler, R. Lucklum, R. Bodengräber, J. Hartmann, P. Hauptmann, *Sens. Act. B*. 1998, 48, 415.
- [Red81] M. M. Reddy, K. Bachhawat-Sikder, T. Kodadek, Transformation of low-affinity lead compounds into high-affinity protein capture agents, *Chem. Biol.*, 11, 1127-1137, 2004.
- [Rot54] G. Roth, S. Freund, B. Möhrle, K. Wöllner, J. Brünjes, G. Gauglitz, K.-H. Wiesmüller, G. Jung., *ChemBioChem*, 8(3), 323-331, 2007.
- [Ros63] Ross C.A., Pickart C.M., The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases, *Trends Cell Biol.*, 14, 703-711, 2004.
- [Rud24] A. Ruderisch, J. Pfeiffer, V. Schurig, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, 12, 2025.
- [Sab52] A. A. Saboury, *J. Iran. Chem. Soc.*, 3 (1), 1-21, 2006.
- [Sch50] F. Scheller, B. Schubert, Biosensoren, Birkhäuser Verlag, Berlin, 1989.
- [She71] J. H. Shen, B. Gutendorf et al, *Toxicology*, 166, 71-8, 2001.
- [Sku42] D. Skutlarek, M. Exner, H. Färber, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 13, 299-307, 2006.
- [Spa36] K. Spaeth, G. Kraus, G. Gauglitz, *Fres. J. Anal. Chem.*, 357, 192, 1997.
- [Ste47] T. Stehle, S. C. Harrison, *Structure*, 4(2), 183-194, 1996.
- [Ste48] T. Stehle, S. C. Harrison, *EMBO J.*, 16(16), 5139-5148, 1997.
- [Ste49] T. Stehle, Y. Yan, T. L. Benjamin, S. C. Harrison, *Nature*, 369, 160-

- 163, 1994.
- [Ste50] T. Stehle, S. J. Gamblin, Y. Yan, S. C. Harrison, *Structure*, 4(2), 165-182, 1996.
- [Ste70] L. Steinle, Diplomarbeit, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2005.
- [Tel79] J. Tellinghuisen, *Anal. Biochem.*, 373, 395-397, 2008.
- [Tom13] H. G. Tompkins, Academic Press, Bosten, 1993.
- [Tsa78] B. Tsai, J. M. Gilbert, T. Stehle, W. Lencer, T. L. Benjamin, T. A. Rapoport, *EMBO J.*, 22 (17), 4346-4355, 2003.
- [Tur79] W. B. Turnbull, A.H. Daranas, On the value of c : can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *J Am. Chem. Soc.*, 125, 14859-14866, 2003.
- [Vol26] M. Vollprecht, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 2005.
- [Wad64] K. Wada, H. Osaka, S.Aoki, Y.L. Wang, The ubiquitin-proteasome system and neurodegeneration, *Rinsho Shinkeigaku*, 41, 1072-1074, 2001.
- [Wik66] Wikipedia, Freie Enzyklopädie, http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page, (2001).
- [Wis70] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L.-N. Lin, *Anal. Biochem.*, 179, 131-137, 1989.
- [Wul31] G. Wulff, *Angew. Chem.*, 107, 1958-1979, 1995.
- [Zaw70] I. Zawisza, R. Bilewicz, M. R. Moncelli, R. Guidelli, *J. Electroanal. Chem.*, 509, 31-41, 2001.
- [Zho17] R. Zhou, U. Weimar, K. D. Schierbaum, K. E. Geckeler, W. Göpel, *Sens. Act. B*, 26-27, 121-125, 1995.
- [Zho22] X. Zhou, S. Ng, H. Chan, S. Li, *Anal. Chem. Acta*, 345, 29, 1997.
- [Zho34] R. Zho, 95, U. Weimar, K. D. Schierbaum, K. E. Geckeler, W. Göpel, *Sens. Act. B*, 121, 26-27, 1995.
- [Zim19] B. Zimmermann, J. Bürck, H. Ache, *Sens. Act. B*, 41, 45, 1997.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Simulierte Bindungsisotherme für verschiedene Werte des c-Parameters.	13
Abb. 2:	Typisches Leistungs-Zeit Signal für die sequenzielle Titration eines Liganden zu einer Substratlösung a) und die daraus resultierenden Bindungsisotherme b).	16
Abb. 3:	Reflexion und Transmission eines Lichtstrahls an einer Grenzfläche zweier Medien mit Brechungsindex n_0 und n_1 .	19
Abb. 4:	Reflexionsgrad für das parallel (R_p) und senkrecht (R_s) polarisierte Licht.	20
Abb. 5:	Phasenverschiebung von p- und s-polarisiertem Licht in Abhängigkeit des Einfallswinkels.	21
Abb. 6:	Polydimethylsiloxan-Grundgerüst mit der charakteristischen Si-O-Si-Kette. R kann dabei ein beliebiger organischer Rest sein.	24
Abb. 7:	Struktur des Resorcin[4]aren mit A als achiraler Selektorteil.	25
Abb. 8:	Hydrosilylierungsvariante für den Einbau funktioneller Gruppen in das PDMS-Grundgerüst.	26
Abb. 9:	Graphische Darstellung des nicht-kovalenten Prägens. T = Templat oder Gastmolekül.	27
Abb. 10:	Polymerquellung unter Einfluss von Lösungsmittelmolekülen.	28
Abb. 11:	Schematische Darstellung des Sorptionsverhaltens nach Langmuir (I), Henry (II), Flory-Huggins (III).	30
Abb. 12:	Verwendetes Progesteronderivat in Kapitel 4.2.2 a) und Cholesterin b).	31
Abb. 13:	Skizze eines Phospholipids mit hydrophilem und hydrophobem Teil.	32
Abb. 14:	Links ist die funktionelle Gruppe des Cholins (DPPC) und rechts die des Ethanolamins (DMPE) abgebildet.	33
Abb. 15:	Struktur des PFOS ($C_8HF_{17}O_3S$)	33
Abb. 16:	Struktur des PFOA ($C_8HF_{17}O_3S$)	34
Abb. 17:	Schematische Darstellung des GM1 Rezeptors.	35
*Abb. 18:	Struktur des SV40 VP1-GM1 Komplexes (oben). Im unteren Teil ist vergrößert die Bindung des GM1 (orange Stäbe) an das VP1 (blaue und graue Bänder) dargestellt.	36

#Abb.19:	Darstellung von humanem Ubiquitin. Das Ubiquitin ist ein kleines, hitzebeständiges und globuläres Molekül, das über 5 β -Faltblätter (ockerfarbig) und 2 α -Helices (magentafarbig) verfügt. Der C-Terminus mit 2 Glycinen in blauer Farbe gezeigt, wird an andere Proteine geknüpft. Die 5 Faltblätter und die längere Helix bilden eine Struktur, die einem Fass ähnelt.	37
Abb.20:	Halbleiterthermophile (Peltier-Elemente)	39
Abb. 21:	Messzylinder a) und b) Mess- bzw. Referenzzelle	41
Abb. 22:	Schematischer Aufbau der verwendeten Ellipsometeranordnung.	44
Abb. 23:	Sinusförmige Intensitätsmodulation im Detektor. T steht für die Zeit, die der Polarisator für eine Rotation benötigt.	45
Abb. 24:.	Der Durchgang von Licht durch ein Null-Ellipsometer.	47
Abb. 25:	Modellierung eines optischen Dreischichtsystems unter Berücksichtigung der Reflexion und Transmission.	48
Abb.26:.	Einzelkomponenten des On-Chip-Polymerisationsansatzes für die PDMS-Synthese.	53
Abb. 27:	Verwendete Analyte für die Charakterisierung des Wechselwirkungsverhaltens von PDMS.	56
Abb. 28	Schichtmodell für die gemessenen Werte.	57
Abb. 29:	Ψ und Δ -Werte für die Messung von PDMS mit unterschiedlichen Chloroformkonzentrationen.	58
Abb. 30:	Physikalische Schichtdicke der sensitiven PDMS-Schicht in Abhängigkeit der Chloroform-Konzentration.	58
Abb. 31:	Realteil des Brechungsindex in Abhängigkeit der Chloroform-Konzentration.	59
Abb. 32:	Physikalische Schichtdicke der PDMS-Schicht in Abhängigkeit der Konzentration von Phenol- und Salzsäurelösungen.	59
Abb. 33:	Physikalische Schichtdicke der PDMS-Schicht in Abhängigkeit der Konzentrationen von Chlorbenzol, Trichloräthylen und Toluol.	60
Abb. 34:	Realteil des Brechungsindex in Abhängigkeit der verschiedenen Konzentrationslösungen.	61
Abb. 35:	Die polaren Analyten Propylamin a) und Propanol b) zur Charakterisierung des Wechselwirkungsverhaltens des PDMS-R4A Systems.	62

Abb. 36:	Zeit-Leistungssignal für die Titration von Propylamin zu bidestilliertem H ₂ O.	63
Abb. 37:	Zeit-Leistungssignale für die Titration von Propylamin und Propanol zum PDMS-System. Rechts sind die entscheidenden Signale vergrößert dargestellt.	63
Abb. 38:	Zeitabhängige Leistungssignale für die Titration von Propylamin und Propanol zum Resorcin[4]aren-System. Rechts vergrößert die Signale B und C.	64
Abb. 39:	Integrierte Titrationssignale von Peak C je Injektion Propylamin. Die Titrationsschritte sind in der Graphik einzeln vermerkt.	64
Abb. 40:	Integrierte Titrationssignale von Peak C pro Injektion Propanol. Die Titrationsschritte sind in der Graphik einzeln vermerkt.	65
Abb. 41:	Mit RfS in flüssiger Phase erhaltenen Kalibrierkurven für a) n-Propanol und b) Propylamin.	66
Abb. 42:	Empfindlichkeit und normierte Empfindlichkeit für n-Propanol und Propylamin.	67
Abb. 43:	Kinetik der Analytwechselwirkung mit a) PDMS und b) PDMS + 30 mg R4A.	68
Abb. 44:	Austauschrate R von Propanol und Propylamin bei Wechselwirkung mit PDMS und PDMS + 30 mg R4A.	69
Abb. 45:	ATR FT-IR Spektrum von a) Chloroform, b) Propylamin, c) 10 mg R4A gelöst in 20 µL Chloroform, d) 10 mg R4A in 50 µL Chloroform und 36.5 µL Propylamin und e) 10 mg R4A gelöst in 50 µL Chloroform und 73 µL Propylamin. Die gestrichelte Linie zeigt die Verschiebung der C=O Streckschwingung des Selektors R4A bei 1760 cm ⁻¹ bei Wechselwirkung mit Propylamin mit unterschiedlichen Konzentrationen d) 36.5 µL und e) 73 µL.	71
Abb. 46:	¹ H NMR Spektrum von a) 14 µL Propylamin gelöst in 2 mL Chloroform und b) 10 mg R4A gelöst in 20 µL Chloroform und 36.5 µL Propylamin (1:76).	73
Abb. 47:	Strukturformel von Atrazin (C ₈ H ₁₄ ClN ₅).	75
Abb. 48:	Zeitaufgelöste Leistungssignale der Messung von a) 20 µL Atrazin zu einer 500 µL Lösung an geprägten MIPs und b) die Referenzmessung mit 21 µL Atrazin zu einer 500 µL Lösung an ungeprägten MIPs.	76
Abb. 49:	Integrierte Titrationssignale von Atrazin zu geprägten MIPs.	77

Abb. 50:	a) Änderung der optischen Schichtdicken der mit MIP beschichteten RIFs-Glasträger nach Injektion von 17 ppm Atrazin in Toluol mit Maximum bei $3.49 \text{ nm} \pm 0.3$ und b) Kurvenverlauf mit Maximum bei $0.62 \text{ nm} \pm 0.05$ nach Injektion von 1.7 ppm Atrazinlösung.	78
Abb. 51:	Kontrollmessung mit 17 ppm Atrazinlösung für nicht geprägten MIP mit maximaler Schichtdickenänderung von $0.35 \text{ nm} \pm 0.032$.	78
Abb. 52:	Optische Schichtdickenänderung der MIPs mit unterschiedlichen Konzentrationen des Atrazins.	79
Abb. 53:	Gemessene ellipsometrische Winkel Ψ und Δ in Abhängigkeit von λ der einzelnen Schichten unter PBS.	80
Abb. 54:	Schichtmodell für den Progesteron-Assay.	81
Abb. 55:	An Luft gemessene ellipsometrische Winkel Ψ und Δ der einzelnen Schichten unter PBS in Abhängigkeit von λ .	82
Abb. 56:	Ellipsometriemessungen des Schichtenaufbaus eines Immunoassays unter Luft und PBS.	82
Abb. 57:	Gemessene und simulierte ellipsometrischen Winkel unter PBS des nativen Wafers.	84
Abb. 58:	An Luft gemessene und simulierte ellipsometrische Winkel des nativen Wafers.	84
Abb. 59	Ellipsometrische Messungen an Luft und PBS.	84
Abb. 60:	Änderung der Schichtdicke während der Präparation von jeweils zwei a) nativen Wafers und b) oxidierten Wafers.	87
Abb. 61:	Realteil des Brechungsindex der bedampften Wafer im Verlauf der Präparation.	88
Abb. 62:	Zeitabhängige Titrationssignale von GM1 zu a) 0.9 mM SV40 VP1 und b) Puffer bei 293.1 K.	90
Abb. 63:	Integrierte Titrationssignale.	91
*Abb. 64:	Dargestellt ist ein VP1 Monomer in blau, während die im und gegen den Uhrzeigersinn angeordneten Nachbarmoleküle graufarbig sind.	92
*Abb. 65:	N-Acetylneuraminsäure (NeuNAc)	93
*Abb. 66:	Dargestellt ist die Verbindung zwischen NeuNAc und SV40 VP1.	93
*Abb. 67:	Dargestellt ist die Verbindung zwischen Gal- β 1,3-GalNAc und SV40 VP1.	94

Abb. 68:	Die beiden AFM-Bilder zeigen die DMPE-Schicht auf einem Glas-Wafer, mit einem Scan-Bereich von 1 μm (oben) und 500 nm (unten).	96
Abb. 69:	Diese beiden AFM-Bilder zeigen die DPPC-Schicht auf einem Glas-Wafer, mit einem Scan-Bereich von 5 μm (oben) und 1 μm (unten).	97
Abb. 70:	AFM-Aufnahme eines unbeschichteten Glas-Wafers.	98
Abb. 71:	11 μL PFOA (0,6 $\mu\text{mol/l}$) wurden zu einem beschichteten Glas-Wafer mit dem Membranlipid DMPE titriert (links). Rechts ist die entsprechende Referenzmessung mit einem unbeschichteten Glas-Wafer dargestellt.	100
Abb. 72:	Integrierte Titrationssignale der ITC-Messung von DMPE mit PFOA.	100
Abb. 73:	11 μL PFOS (3,6 $\mu\text{mol/l}$) wurden zu einem beschichteten Wafer mit dem Lipid DMPE titriert (links). Rechts ist die Referenzmessung mit dem nicht beschichteten Wafer zu sehen.	101
Abb. 74:	Integrierte Titrationssignale der ITC-Messung von DMPE mit PFOS.	101
Abb. 75:	RIfS-Messung mit Ovalbumin und einem mit DPPC beschichteten Glas-Wafer.	103
Abb. 76:	RIfS-Messung mit Ovalbumin und einem mit DMPE beschichteten Glas-Wafer.	103
Abb. 77:	RIfS-Messung mit PFOA und einem mit DPPC beschichteten Glas-Wafer.	104
#Abb. 78	Darstellung der Ubiquitin-Peptid Wechselwirkung. in Bänderstruktur ist das Ubiquitin und in dunkelgrau der Peptid Ligand (DPDELRFNAIAL) graphisch gezeigt.	105
Abb. 79:	Dargestellt sind die zeitlich aufgelösten Leistungssignale sowie die integrierten Titrationssignale mit Kurvenfit der Peptide a) DPDELRFNAIAL-NH ₂ b) WGLRALESRWDRYYF-NH ₂ mit Ubiquitin.	106
Abb. 80:	Dargestellt sind die zeitlich aufgelösten Leistungssignale sowie die integrierten Titrationssignale mit Kurvenfit von RWDRYYF-NH ₂ mit Ubiquitin.	107

* Röntgenstrukturen gelöst von Dipl. Biochem. Ursula Neu und Prof. Dr. T. Stehle, pdb-file 3bwq und 3bwr, Program: Pymol.

Erstellt von Dr. G. Roth, pdb-file 1XD3, Program: Rasmol.

9. Anhang

9.1 Akademische Lehrer

Prof. Dr. Klaus Albert, Prof. Dr. Dines Christen, Prof. Dr. Heiner Eckstein, PD Dr. Hans-Joachim Egelhaaf, Prof. Dr. Günter Gauglitz, Prof. Dr. Günter Häfelinger, Prof. Dr. Dr. h.c. Michael Hanack, Dr. Torsten Hehl, Dr. Dietrich Hoffmann, Prof. Dr. Volker Hoffmann, Prof. Dr. Walter Jäger, Prof. Dr. Günther Jung, Prof. Dr. Karl-Artur Kovar, Prof. Dr. Detlef Krug, Prof. Dr. Norbert Kuhn, Prof. Dr. Ekkehard Lindner, PD. Dr. Mack, Prof. Dr. Martin Maier, Prof. Dr. Hermann Mayer, Prof. Dr. Alfred Meixner, Prof. Dr. Hans-Jürgen Meyer, Prof. Dr. Ulrich Nagel, Prof. Dr. Heinz Oberhammer, Prof. Dr. Christian Ochsenfeld, Prof. Dr. Dieter Oelkrug, Prof. Dr. Holm Pauschmann, PD Dr. Helmut Pommer, PD Dr. Götz Reinhard, Prof. Dr. Volker Schurig, Prof. Dr. Eberhard Schweda, Prof. Dr. Bernd Speiser, Prof. Dr. Dr. h.c. Strähle, PD Dr. Udo Weimar, Prof. Dr. Lars Wesemann, Prof. Dr. Klaus-Peter Zeller, Prof. Dr. Thomas Ziegler.

9.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Vor- und Nachname:	Karin Wöllner
Adresse:	Herrenbergerstraße 36, D-27070 Tübingen
Telefon:	+49 (0)7071 410093
Mobil:	+49 (0)160 95015693
E-Mail:	karin_woellner@yahoo.de
Geburtsdatum:	14. August 1977
Geburtsort:	Nürtingen
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung:

Schulbildung:

1984-1993	Grund- und Hauptschule, Riederich
1993-1995	Kaufmännische Berufsfachschule, Theodor-Heuss-Schule, Reutlingen
21.07.1995	Fachschulabschluss
1995-1998	Gymnasium, Theodor-Heuss-Schule, Reutlingen
25.06.1998	Abitur

Studium:

10.1998-10.2000	Chemie Grundstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10.10.2000	Vordiplom
11.2000-09.2004	Chemie Hauptstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03.03-04.04.2003	Spezialisierung im Fach Synthesechemie Transportreaktionen und Gasphasenabscheidungen (Prof. Dr. J. Strähle) und Metallorganische Katalyse

- (Prof. Dr. U. Nagel)
- 03.2004-08.2004 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Klaus Albert.
Institut für organische Chemie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Titel: Synthese, Charakterisierung und Anwendung von polymerummantelten unporösen Nanopartikeln in der HPLC
- 15.09.2004 Diplom
- Seit 01.11.2004 Promotion unter Anleitung von Prof. Dr. Günter Gauglitz.
Institut für Physikalische und Theoretische Chemie (IPTC), Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Publikationen:

- 2006 Application of surface acoustic waves for optimization of biocompatibility of carboxy-methylated dextran surfaces, Markovic G., Mutschler T., Wöllner K., Gauglitz G., *Surf Coat Technol* 201(3-4), 1282-1288, 2006.
- 2007 Ubiquitin binds to short peptide segment of hydrolase UCH-L3, a study with FCS, RfS, ITC and NMR, Roth G., Freund S., Möhrle B., Wöllner K., Brünjes J., Gauglitz G., Wiesmüller K., Jung G., *ChemBioChem*, 8(3), 323-331, 2007.
- Interaction behaviour of a PDMS-calixarene system and polar analytes characterised by microcalorimetry and spectroscopic methods, Wöllner K., Vollprecht M., Leopold N., Kasper M., Busche S., Gauglitz G., *Anal Bioanal Chem*, 389, 1879-1887, 2007.
- Isotherme Titrations-Kalorimetrie und Ellipsometrie als effiziente Kombination zweier Methoden zur Charakterisierung von sensitive Schichten der optischen Sensorik, K. Wöllner, C. Bücherl, G Gauglitz, *Dresdner Beiträge zur Sensorik*, 29, 307, 2007.
- 2008 Structural basis of GM1 ganglioside recognition by simian virus 40, U. Neu, K. Woellner, G. Gauglitz, T. Stehle, *PNAS*, 2008, in press.

Präsentationen und Weiterbildung:

- 2005
- K. Wöllner, M. Vollprecht, N. Leopold, S. Busche, M. Kasper, G. Gauglitz, „Charakterisierung des Wechselwirkungsverhaltens eines Resorcinaren-PDMS-Systems mittels Isothermer Titrations-Kalorimetrie (ITC), Spektroskopie und optischer Sensorik“, März 2005, 16. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage. (Poster)
- K. Wöllner, G. Gauglitz, „Charakterisierung des Wechselwirkungsverhaltens von PDMS“, TAM-Usermeeting: Stabilitäten und Kompatibilitäten in Pharma, Chemie und Materialforschung, BASF AG-Abteilung Pflanzenschutz/Produktentwicklung, 18. April 2005 Limburgerhof. (Vortrag)
- T. Laib, K. Wöllner, S. Busche, G. Gauglitz, „Application of Artificial Neural Networks to highly variable data sets for Modeling at the River Basin Scale, EU-Project AquaTerra Conference (Consoil), Bordeaux, 03-07.10.2005, Frankreich. (Poster)
- 2006
- 4th Workshop Ellipsometry, 20-22. Februar 2006, BAM, Berlin.
- K. Wöllner, M. Vollprecht, S. Jäger, M. Kasper, S. Busche, G. Gauglitz, „Characterisation of the interaction processes of sensitive polymer layers by ITC and RIfS“, „EUROPT(R)ODE VIII“, 2-5 April, 2006, Tübingen. (Poster)
- G. Markovic, T. Mutschler, K. Wöllner, G. Gauglitz, „Application of surface acoustic waves for optimisation of biocompatibility of carboxy-methylated dextran surface“, „EUROPT(R)ODE VIII“, 2-5 April, 2006, Tübingen. (Poster)
- K. Wöllner, G. Gauglitz, „Basics of Ellipsometry“, Cascade Training Course, 5-7 April, 2006, Tübingen. (Vortrag)
- K. Wöllner, M. Vollprecht, S. Jäger, M. Kasper, S. Busche, G. Gauglitz, „Characterisation of the interaction processes of sensitive polymer layers by ITC and RIfS“, Analytica Conference 2006“, 25-27.04.2006, München. (Poster)
- F. Pröll, S. Jäger, K. Wöllner, R. Frank, T. Mutschler, N. Leopold, G. Gauglitz, „Einfaches optisches Sensorsystem basierend auf RIfS für die Untersuchung biologischer Bindungsereignisse“, Micro Optical Biochip Analysis (MOBA), Biophotonik Symposium, 27-29.04.2006, München. (Poster)
- K. Wöllner, N. Schweizer, G. Gauglitz, „Biosensors

Based on Membran Organisation to Replace Animal Testing", BBMO-Project-Meeting, 08-11. Juni 2006, Umea, Schweden. (Poster)

I. Vikholm-Lundin, H.M. McEvoy, R. Blue, B.D. MacCraith, K. Woellner, T. Laib. "Membrane-Based Sensors", BBMO-Project-Meeting, 08-11. Juni 2006, Umea, Schweden. (Poster)

„Summer School on Fluorescence and Biomolecules" im Rahmen des CAREMAN Netzwerkes, 24-27.09.2006, Tübingen.

K. Wöllner, M. Vollprecht, S. Jäger, M. Kasper, S. Busche, G. Gauglitz, „Characterisation of the interaction processes of sensitive polymer layers by ITC and RIfS", The bi-annual international meeting on Polymers , 4-6.10.2006, BAM , Berlin. (Poster)

Seminar of Spectroscopic Ellipsometry, Veranstalter L.O.T.-Oriell-GmbH, 24-25.10.2006, Darmstadt.

2007

K. Wöllner, S. Jäger, G. Gauglitz, „Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) und Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) für die Untersuchung von Molekular geprägten Polymeren (MIPs)", 28-30. März 2007, 17. Ulm-Freiberger Kalorimetrietage. (Poster).

K. Wöllner, C. Bücherl, G. Gauglitz, "Polysiloxane as sensitive layer for optical sensors, characterised by Ellipsometry", International Conference on Spectroscopic Ellipsometry (ICSE-4), 11-15.06. 2007, Stockholm, Schweden. (Poster)

GDCh-Sommerschule, Qualitätssicherung Analytischer Daten, 27.-31. August 2007, BAM, Berlin.

K. Wöllner, C. Bücherl, G. Gauglitz, „Isotherme Titrations-Kalorimetrie und Ellipsometrie als effiziente Kombination zweier Methoden zur Charakterisierung von sensitiven Schichten der optischen Sensorik", 8. Dresdner Sensor Symposium, 10-12.12.2007, Dresden. (Poster)