



universität
wien

DISSERTATION

Charakterisierung der Polymereigenschaften neuartiger
selbstorganisierter Protein MIPs mittels
Rasterkraftmikroskopie

Mag. rer. nat. Hermann Franz Sussitz

angestrebter akademischer Grad
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 791 419
Dissertationsgebiet lt. Studienblatt:	Chemie
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Prof. Dr. Peter A. Lieberzeit

Vorwort und Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von August 2011 bis am Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, Währinger Straße 38; A-1090 Wien, in der Abteilung Sensorik und Schnellanalytik unter der wissenschaftlichen Leitung und Betreuung von Univ.-Prof. Dr. Peter A. Lieberzeit.

Mein besonderer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. Peter A. Lieberzeit für die wissenschaftliche Hilfestellung und Betreuung während meiner Dissertation.

Für das gute Arbeitsklima, professioneller Hilfestellung und anregenden Diskussionen und Ansätzen für mein Thema möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere bei Martin Zeilinger, Judith Wackerlig und Phan Van Ho Nam, bedanken.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums bedanken, sowie bei meinen Freunden und meiner Familie für ihre moralische Unterstützung während meiner Studien- und Dissertationszeit.

Ich bedanke mich ebenso bei der Universität Wien für die Finanzierung meiner Dissertation.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort und Danksagung	1
Inhaltsverzeichnis	3
Einleitung	7
1. Theorie	9
1.1. Chemische Sensoren	9
1.1.1. Massensensitive Sensoren	12
1.1.1.1. Piezoelektrischer Effekt	12
1.1.1.2. Quarz als piezoelektrisches Material – Quarzmikrowaage	14
1.1.1.3. Messprinzip	17
1.2. Molekulares Prägen	19
1.2.1. Molekulares Prägen – Proteine	20
1.2.2. Molekulare Erkennung	22
1.2.3. Prägetechniken	23
1.2.3.1. Volumenprägung	23
1.2.3.2. Selbstorganisierte Volumenprägung	24
1.2.3.3. Oberflächenprägung	26
1.3. Serum Albumin	28
1.4. Proteindetektion	30
1.4.1. Klassische Methoden	30
1.4.2. Massenspektrometrie	31
1.5. Rasterkraftmikroskopie	31
1.5.1. Contact Mode	33
1.5.2. Tapping Mode	33
1.5.3. Kraft-Abstands Kurven	34
1.5.4. Peak Force QNM	35
2. Experimenteller Teil	39
Geräte und Chemikalien	39
Herstellung von BSA-MIP QCM Sensoren	40
2.1. Herstellung der Quarzmikrowaagen	40
2.1.1. Siebdruckverfahren	40
2.1.2. Elektroden-design	43
2.2. Aufbau der Messapparatur	43
2.3. Synthese des molekular geprägten Polymers	46
2.3.1. Stempel- und Sedimentationsmethode	49

2.3.2.	Selbstorganisierte Volumenprägung	50
2.3.2.1.	Kontrollpolymer	51
2.3.3.	Darstellung von Polymernanopartikeln	52
2.3.4.	Bestimmung der Polymereigenschaften	53
2.4.	Einschwingen der Quarzmikrowaage	57
2.5.	Herstellung der Waschlösungen – Waschschrte	58
2.5.1.	Waschschritt mittels Phosphatpuffer und Natriumdodecylsulfat	58
2.5.2.	Waschschritt mittels Essigsäure	59
	Immobilisierungsstrategien für BSA.....	60
2.6.	Immobilisationsstrategie	60
2.7.	Aminofunktionalisierung.....	61
2.7.1.	Funktionalisierung mittels APTES.....	61
2.7.2.	Funktionalisierung mittels Ethanolamin.....	62
2.7.3.	Funktionalisierung mittels Cysteamin.....	62
2.8.	BSA Immobilisierung	63
3.	Ergebnisse.....	65
	Charakterisierung der BSA geprägten QCM Sensoren	65
3.1.	Vergleich der verschiedenen Prägetechniken – QCM	65
3.1.1.	Stempelprägung.....	65
3.1.2.	Sedimentationstechnik.....	66
3.1.3.	Selbstorganisierte Volumenprägung	68
3.2.	Vergleich der verschiedenen Prägemethoden - optisch	70
3.3.	Charakterisierung der selbstorganisierten Volumenprägung	75
3.3.1.	Waschschrte – Entfernung des Analyten aus dem Polymer	75
3.3.1.1.	Wasser.....	75
3.3.1.2.	PBS, SDS und Wasser.....	77
3.3.1.3.	Essigsäure	79
3.3.2.	Stabilität	80
3.3.3.	Konzentrationsabhängigkeit.....	81
3.3.4.	Selektivität	83
3.3.5.	Nanopartikel.....	86
3.3.6.	Kontrollpolymer	88
3.3.7.	Living Radical Polymerisation	89
3.3.8.	RAFT Polymerisation	92
	BSA Immobilisierung	94
3.4.	Aminofunktionalisierung.....	94
3.4.1.	Ethanolamin	94
3.4.2.	APTES	96

3.4.3.	Cysteamin	97
3.5.	BSA Immobilisierung	98
3.5.1.	Glutaraldehyd.....	98
3.5.2.	Immobilisiertes BSA	99
3.5.3.	BSA-Immobilisierung am QCM	100
3.5.4.	BSA Immobilisierung an AFM-Spitzen	101
	Untersuchung der Polymeroberflächen mittels Peak Force QNM	104
3.6.	Vorbereitung Peak-Force-QNM	104
3.7.	Auswahl des Messpunktes	107
3.8.	Elastizitätsmodul.....	108
3.9.	Mechanische Eigenschaften - Adhäsion	111
3.9.1.	Nicht modifizierte Spitze	111
3.9.1.1.	Polymer nach dem Prägen	111
3.9.1.2.	Polymer nach Waschen.....	115
3.9.1.3.	Wiedereinlagerung BSA	118
3.9.2.	Modifizierte Spitze.....	123
3.9.2.1.	Modifizierte Spitze - Luft	124
3.9.2.2.	Modifizierte Spitze - Wasser	128
4.	Ausblick	131
	Abkürzungsverzeichnis.....	133
	Zusammenfassung	135
	Summary	136
	Literaturverzeichnis	137
	Lebenslauf	149
	Publikationsliste	150

Einleitung

Die Analytik von Proteinen ist in den letzten Jahrzehnten zu einem wichtigen Forschungszweig geworden. Besonders interessant ist hierbei ihre potentielle Anwendung als Biomarker für verschiedene Krankheiten¹. Die verwendete Massenspektrometrie zur Detektion von Proteinen dauert oftmals sehr lange und ist sehr teuer, genauso wie die Alternative durch natürliche Detektionssysteme wie Antikörper. Für die praktische Anwendung wären eher schnelle und billige Systeme notwendig, die z.B. eine schnelle Überprüfung durchführen können. Molekular geprägte Polymere (MIP) sind eine gute und theoretisch einfachere Alternative um Sensoren für Proteine herzustellen. In der praktischen Anwendung gibt es dabei allerdings Problematiken, die zu berücksichtigen sind, wie z.B. mögliche Konformationsänderungen oder die Limitierung auf wässrige Substanzen bei der Polymersynthese. Daher ist die Erforschung von Protein-MIP und der Prägemethode wichtig. Als Modellprotein eignet sich BSA hierzu besonders, da es kostengünstig und gut in der Literatur beschrieben ist. Die qualitative Kontrolle des Prägevorganges in der Forschung könnte hierbei durch Bildgebung mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) durchgeführt werden. Praktisch gibt es hier aufgrund der Rauheit des Polymers und dem vergleichsweise dazu sehr kleinen Analyten keine Möglichkeit, den Analyten mittels Höhenbild aufzulösen. In dieser Arbeit sollte daher das Ein- und Auslagern des Proteins, sowie die Wechselwirkung zwischen Analyt und Polymer mittels Peak Force quantonanomechanical mapping AFM (Peak Force QNM) visualisiert werden. Bei dieser Methode werden mechanische Eigenschaften, wie Adhäsion zwischen Spitze und Oberfläche in Situ aufgenommen, dadurch lassen sich Schlussfolgerungen über die Oberfläche ziehen. In einem ersten Schritt müssen hierzu natürlich zuerst verschiedene Prägemethoden getestet beziehungsweise entwickelt werden. Der hergestellte BSA-MIP soll hierbei mittels Quarzmikrowaagen (QCM) auf Sensitivität und Selektivität überprüft werden. Um die Wechselwirkung zwischen Analyt und Oberfläche zu charakterisieren, sollte das BSA auf eine AFM Spitze immobilisiert werden. Die einzelnen Immobilisationsschritte sollen hierbei mittels Infrarotspektroskopie (FTIR), QCM und AFM untersucht werden.

1.Theorie

1.1. Chemische Sensoren

“A chemical sensor is a device that transforms chemical information, ranging from the concentration of a specific sample component to total composition analysis, into an analytically useful signal. The chemical information, mentioned above, may originate from a chemical reaction of the analyte or from a physical property of the system investigated.” –IUPAC 1989 ²

Frei übersetzt bedeutet diese Definition der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), dass ein chemischer Sensor ein Gerät ist, welches chemische Information, zum Beispiel die Konzentration einer bestimmten Komponente oder aber die Zusammensetzung eines Stoffes, in ein analytisches Signal umwandeln kann. Diese Information kann in Form einer chemischen Reaktion des Analyten oder einer physikalischen Eigenschaft des Systems beobachtet werden. Laut dieser Definition wäre zum Beispiel die pH-Bestimmung mit roten Rüben und die Detektion mit den Augen ein zulässiges Beispiel für einen Sensor. Für die praktische Anwendung sollte ein Sensor jedoch noch weitere Eigenschaften besitzen³:

- Die Ansprechzeit von chemischen Sensoren soll möglichst kurz sein
- Die chemische Information soll in elektrische Signale umgewandelt werden
- Die Haltwerks- und Einsatzzeit eines solchen Sensors soll möglichst lange sein
- Der Sensor soll spezifisch und selektiv sein
- Das Signal soll reversibel sein
- Der Sensor sollte Miniaturisierbar und kostengünstig sein
- Die Nachweisgrenze und Empfindlichkeit soll gering sein

Für die Anwendung als chemischer Sensor ist nicht jede dieser Eigenschaften notwendig, vor allem Reversibilität ist bei niedrigen Herstellungskosten vernachlässigbar.

Die wachsenden Anforderungen in Medizin und Industrie, z.B. Diagnostik Krankheiten sowie Detektion von Schadstoffen, erschließen ein breites Anwendungsgebiet für chemische Sensoren. Daher ist auch ihr wirtschaftlicher Einfluss enorm. So zeigt eine Marktstudie des AMA Fachverbands für Sensorik, dass es in Deutschland 2000-2500 Firmen gibt, die sich mit der Herstellung, Vertrieb und Dienstleistung von Sensoren beschäftigen und dabei einen Umsatz von 35 Mrd. € pro Jahr erwirtschaften⁴. Schematisch besteht ein chemischer Sensor aus einem Wandler, sowie einer selektiven Schicht, an der sich der Analyt anreichert. Der Messwandler wandelt die Information in ein elektrisches Signal, welches über eine Messanordnung schließlich auf einen Computer aufgezeichnet wird. Ein solch schematischer Aufbau ist in Abb. [1] dargestellt.

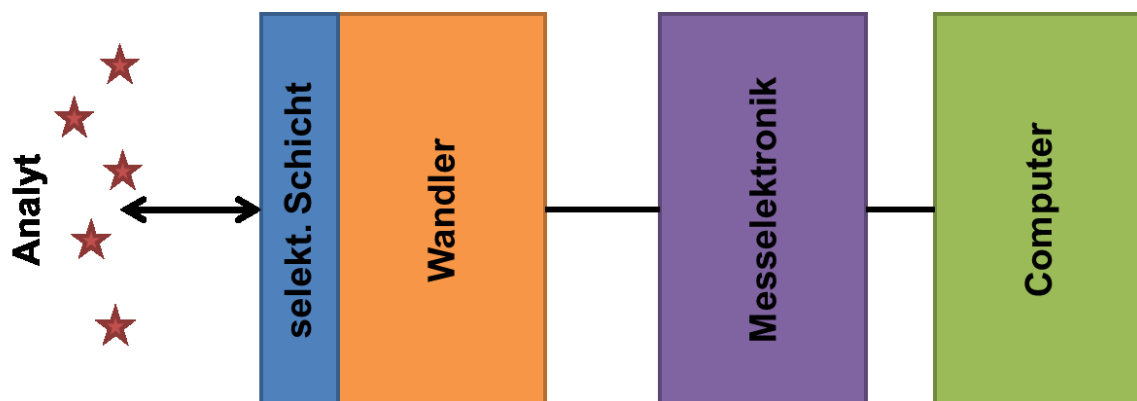


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines chemischen Sensors

Der Rezeptor ist meist eine dünne Schicht, die in Wechselwirkung mit der Analytlösung tritt, selektiv eine Reaktion katalysiert oder in chemischem Gleichgewicht mit der Probenlösung steht. Der Rezeptor reagiert dabei meist selektiv auf einzelne Substanzen oder Substanzgruppen, diese Eigenschaft wird häufig als molekulare Erkennung bezeichnet. Wichtige chemische Wechselwirkungsphänomene zwischen Rezeptor und Medium sind Wasserstoffbrücken- sowie polare Bedingungen. Zur Umwandlung der Information müssen Sensoren eine Transduktor- bzw. Wandler-Funktion haben, welche

nichtelektrische quantitative oder qualitative Information in ein elektrisches Signal umwandelt. Diese Signale werden von zusätzlicher Elektronik und Messtechnik weiter bearbeitet. Dabei können sie verstärkt, gefiltert, integriert oder differenziert werden, oftmals werden mehrere Funktionen kombiniert. Am Computer erfolgt meist die Auswertung und Darstellung der Resultate, wobei moderne Messelektronik bereits solche Funktionen integriert hat. Am Computer erfolgt auch die Interpretation und Bewertung der Ergebnisse. Die Einteilung solcher Sensoren geschieht recht unterschiedlich, am sinnvollsten ist jedoch die Einteilung nach Transduktor. Optische Sensoren beschäftigen sich mit Lichtabsorption, Fluoreszenz, Brechungsindex und Lichtstreuung. Simple Beispiele für optische Sensoren sind Lichtschranken und Rauchmelder⁵. Weitere Beispiele für Sensoren sind Elektrochemische Sensoren und elektrische Sensoren. Die Glaselektrode⁶, sowie die Lambdasonde^{7,8} sind prominente Beispiele aus diesen Kategorien. Eine weitere Gruppe sind massensensitive Sensoren. Sensoren basierend auf Schwingquarzen – also Volumenschwingern – werden in dieser Arbeit behandelt, es sind natürlich auch massensensitive Sensoren auf Basis von akustischen Oberflächenwellen (SAW) möglich^{9,10}. Andere Klassifizierungen orientieren sich an Anwendungsgebieten oder an den verwendeten Rezeptorschichten. Nach Anwendungsgebiet kommt man zu einer wichtigen Gruppe, den Biosensoren. Diese werden oft als eigenständige Gruppe behandelt und sind laut Definition: *„chemische Sensoren, in denen das Erkennungssystem einen biochemischen Mechanismus nutzt (IUPAC 1991)“*². Ein wichtiger biochemischer Sensor ist der Schwangerschaftstest, der auf der Detektion des hCG Antigens basiert. Der erfolgreichste biochemische Sensor ist jedoch der Glukosesensor¹¹.

1.1.1. Massensensitive Sensoren

1.1.1.1. *Piezoelektrischer Effekt*

Massensensitive Sensoren sind im Prinzip kleine Waagen, die eine Massenänderung an der Transduktor-Oberfläche anzeigen. Hierbei treten bei mechanischer Spannung in bestimmten Klassen von Ionenkristallen elektrische Potentiale an der Oberfläche auf; diese werden durch die Verschiebung der Ladungsschwerpunkte verursacht. Diese Oberflächenpotentiale werden schließlich in ein elektrisches Signal umgewandelt. Dieser Effekt wird als piezoelektrischer Effekt oder reziproker piezoelektrischer Effekt ausgenutzt und wurde erstmals von den Brüdern Jacques und Pierre Curie beschrieben¹². Sie fanden heraus, dass bei mechanischer Beanspruchung von Turmalinkristallen elektrische Ladungen an der Oberfläche entstehen. Die entstandene Ladungsmenge verhält sich hierbei proportional zur angewendeten Kraft. Jedoch wurde der reziproke Effekt erst 1881 von Daniel Lippmann mathematisch aus der Thermodynamik abgeleitet¹³ und gleich von den Brüdern Curie experimentell bestätigt¹⁴. In den darauffolgenden Jahren wurde vor allem die Erforschung neuer Materialien betrieben, so waren 1910 schon zwanzig verschiedene piezoelektrische Kristalle bekannt¹⁵. 1950 beantragte Walter P. Kistler ein Patent auf Ladungsverstärker und verhalf somit der Technik endgültig zum Durchbruch. Eine schematische Darstellung des piezoelektrischen Effekts ist in Abb. [2] dargestellt. Durch Anwendung einer Kraft kommt es zu einer geometrischen Änderung und so zu einer Ladungstrennung, die in einer Spannung resultiert. Ein piezoelektrischer Kristall darf kein Symmetriezentrum besitzen.

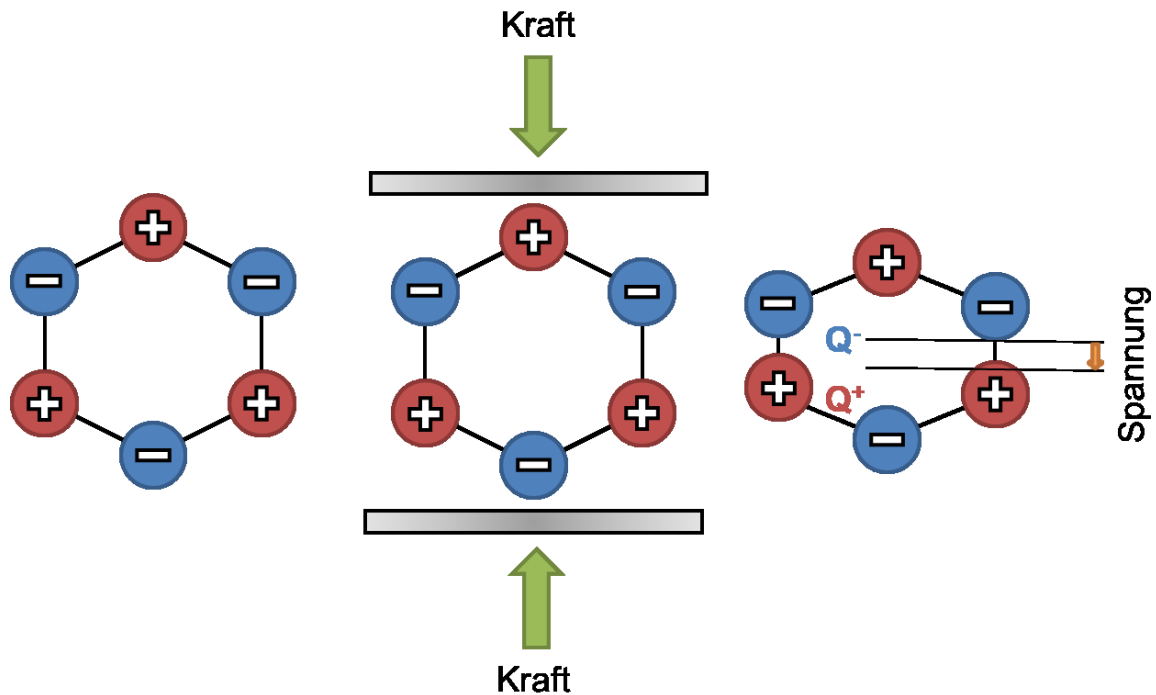


Abbildung 2: Piezoelektrischer Effekt: Durch Anlegen einer Kraft kommt es zu einer Ladungstrennung, die eine Spannung an der Oberfläche verursacht.

Der piezoelektrische Effekt wird auch in verschiedenen Messapparaturen wie dem Rasterkraftmikroskop verwendet, welches in Kapitel 1.5 beschrieben wird. Weitere Anwendungen von piezoelektrischen Kristallen als Sensoren sind Quarzmikrowaagen (QCM – quartz crystal microbalance), die in dieser Arbeit behandelt werden, oder surface acoustic wave (SAW) Sensoren. Diese nutzen die Abhängigkeit der Oberflächenwellengeschwindigkeit von der Massebeladung und können zum Beispiel in Kombination mit selbstorganisierenden Schichten zur Detektion von organischen Phosphaten eingesetzt werden¹⁶. Das wichtigste piezoelektrische Material ist Quarz, wie im nächsten Unterkapitel beschrieben. Ein weiteres wichtiges Material ist Lithiumniobat, welches im Gegensatz zu Quarz höhere piezoelektrische Konstanten besitzt und daher im Bereich von piezoelektrischen Filtern und Bauteilen, die auf akustischer Oberflächenwelle basieren, eingesetzt wird. Piezoelektrizität konnte aber auch in organischen Nanostrukturen festgestellt werden. So zeigten selbstorganisierte Nanoröhrchen aus Diphenylalaninpolypeptid (engl: dyphenilalanin peptide nanotubes – (PNT) piezoelektrische Aktivität¹⁷.

1.1.1.2. Quarz als piezoelektrisches Material – Quarzmikrowaage

Quarz ist das am häufigsten verwendete piezoelektrische Material, zum Beispiel zur Messung der Zeit in Uhren und Computern¹⁸. In der Anwendung als chemischer Sensor kommt meist die α -Modifikation des Quarzes zum Einsatz, welche bis 573°C stabil ist. Diese stabile Form des Quarzes ist nach Feldspat das zweithäufigste Mineral der Erdkruste. Die Herstellung von Quarzen zur Applikation als Sensor erfolgt jedoch mittels Hydrothermalsynthese, welche erstmals 1950 kommerziell angewandt wurde¹⁹. Um die Löslichkeit von Quarz in wässriger Lösung zu erhöhen, wird Siliziumdioxid in Natronlauge gelöst. In diese Lösung werden kleine Quarzstücke am Boden eines Autoklaven eingebracht, welcher mit Natronlauge gefüllt wird. Über dieser befindet sich eine Wachstumsregion, in der orientierte Impfkristallplatten angebracht sind. Die beiden Regionen werden durch eine perforierte Scheibe getrennt, welche die Konvektionsströme hemmt. Die Temperatur der Wachstums- und unteren Zone wird überwacht, durch einen Temperaturunterschied kommt es zur Wanderung des Lösungsmittels in die Wachstumszone, wo der Quarz entlang der Impfkristalle zu wachsen beginnt. Nach 15-30 Tagen kann der Quarz schließlich geerntet werden²⁰. Aus diesem gewonnenen α Quarz können nun Quarzplättchen meist mittels AT oder BT Schnitt herausgeschnitten werden. Die Schnittarten sind durch ihren Winkel relativ zur optischen z-Achse des Quarzes definiert. Es gibt jedoch viele weitere Schnittarten, diese sind schematisch in Abb. [3] dargestellt. Je nach Schnittart und Schichtdicke können verschiedene Resonanzfrequenzen realisiert werden.

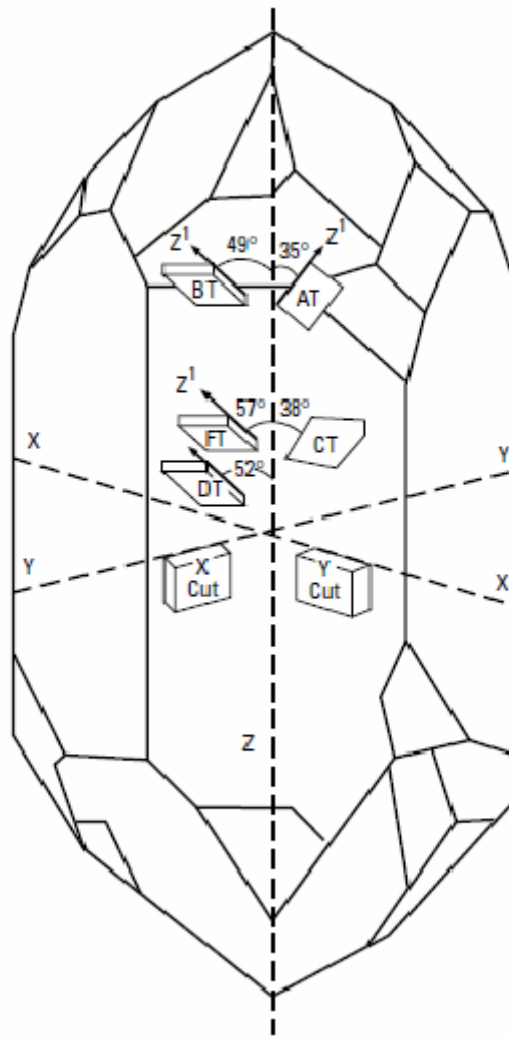


Abbildung 3: Schematische Abbildung eines Quarzkristalls, sowie der verschiedenen Schnittarten²¹

Die drei Achsen des Quarzes, die aus der oberen Abbildung ersichtlich sind, haben verschiedene Eigenschaften. Die optische z-Achse ist für die optischen Eigenschaften des Quarzkristalls verantwortlich, wobei in einem trigonalen Kristallsystem zwischen rechts- und linksdrehendem Quarz unterschieden werden kann²². Die y-Achse verbindet zwei gegenüberliegende Seiten des Quarzes und wird als mechanische Achse bezeichnet. Legt man an diese Achse eine Kraft an, kommt es an der x-Achse aufgrund des piezoelektrischen Effekts zu einer elektrischen Ladungsbildung, diese Achse wird daher auch als elektrische Achse bezeichnet. Erhitzt man den Quarz über 573°C, geht der Quarz in ein hexagonales Kristallsystem über und verliert daher seine piezoelektrischen Eigenschaften. Wie bereits erwähnt,

ist der piezoelektrische Effekt auch umkehrbar, beim Anlegen eines elektrischen Feldes kommt es zur Deformation des Materials. Liegt diese Spannung nicht mehr an, nimmt das Material seine ursprüngliche Form wieder an. Mittels Wechselspannung und einer Rückkopplungsschaltung kann dieser Effekt genutzt werden, um Resonanzschwingungen zu erzeugen, die aufgrund optimaler physikalischer Parameter des Siliziumdioxids ein stabiles Taktsignal mit definierter Frequenz und Amplitude liefern. Die Frequenz hängt dabei vom Durchmesser des Quarzplättchens sowie der Temperatur ab, wobei sich die Temperaturabhängigkeit parabolisch beschreiben lässt²³. Bei AT Schnitt und BT Schnitt mit einem Winkel von -49° bzw. $35^\circ 15'$ sind die Temperaturkoeffizienten nahe Null, daher ist die Resonanzfrequenz nicht von der Temperatur abhängig. Legt man also eine Spannung an einen Quarz an, kommt es zu verschiedenen Schwingungsmoden, diese sind in Abb. [4] dargestellt.

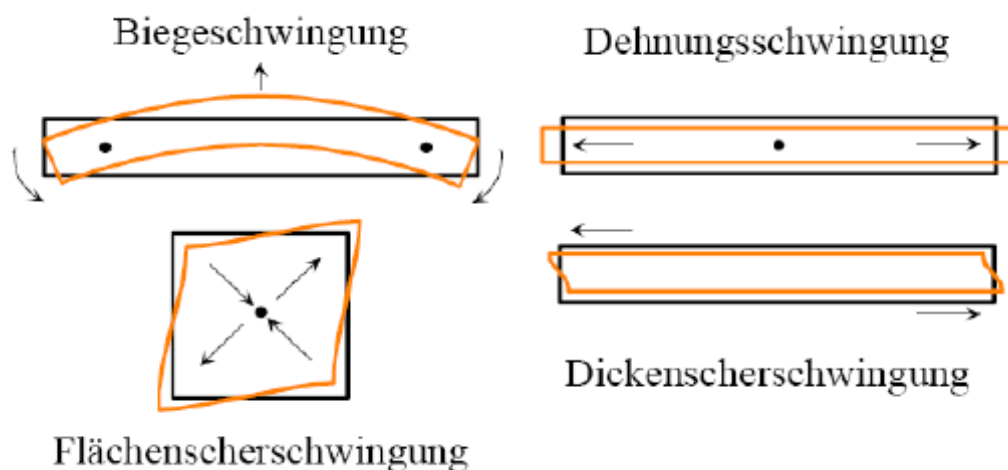


Abbildung 4: Verschiedene Schwingungsmoden eines Quarzplättchens²⁴

Plättchenförmige Dehnungsschwinger schwingen in Richtung der längeren Achse, wobei das elektrische Feld senkrecht dazu angelegt wird. Versieht man Dehnungsschwinger mit zwei gegenphasigen Elektroden, können Biegeschwinger hergestellt werden, durch die Elektroden wird eine Biegung in z-Richtung erzwungen. Die Flächenschwingung ergibt sich aus zwei Seitenflächenbereichen, die gegenläufig verschoben werden. Die Dickenschwingung ergibt sich aus der zueinander verlaufenden Verschiebung der beiden großen Oberflächenbereiche. Die Schwingungsknoten befinden sich hierbei innerhalb des Resonators. Durch das

Verhältnis von Durchmesser zu Schichtdicke und Elektrodengeometrie kann die Schwingungsenergie konzentriert werden. Diese Resonanzform ist äußerst unempfindlich gegen äußere Einflüsse wie zum Beispiel Temperatur, daher eignen sie sich besonders für die Anwendung als Schwingquarze. Bis 20 MHz können die Sensoren in ihrer Grundwelle betrieben werden. Ab dieser Frequenz müssen die ungeraden Oberwellen angeregt werden, da diese ein ähnliches Schwingungsverhalten wie die Grundwelle besitzen. Schwingquarze können sowohl in Gas- als auch flüssiger Phase angewandt werden²⁵. Das Anwendungsgebiet erstreckt sich von flüchtigen organischen Verbindungen bis hin zu Biomolekülen. Ein einfacher Weg zur Funktionalisierung solcher Schwingquarze ist die Immobilisierung von Käfigstrukturen wie Calixarenen²⁶, Cucurbiturilen²⁷ oder Cyclodextrinen, welches zur Detektion von flüchtigen organischen Verbindungen genutzt werden kann²⁸. Eine weitere Möglichkeit sind selbstorganisierte Monoschichten, die mit den Analyten wechselwirken. Biomoleküle können unter anderem durch Immobilisierung von Antikörpern oder Proteinen bestimmt werden^{29,30}.

1.1.1.3. Messprinzip

Die wichtigste Eigenschaft eines Transduktors ist die Umwandlung der chemischen Information in ein analytisch verwertbares Signal. Nur wenn ein Zusammenhang zwischen Konzentration und elektrischem Signal besteht, kann das Material zur quantitativen Analytbestimmung verwendet werden. Der Zusammenhang zwischen einer Massenänderung, die durch die Analytkonzentration definiert wird, und der Frequenzänderung eines Schwingquarzes wurde erstmals 1970 von G. Sauerbrey³¹ beschrieben. Die Sauerbrey-Gleichung (Gl. [1]) beschreibt die Masseänderung als eine Änderung der Quarzdicke und wird daher unabhängig von der Elektrodengeometrie angenommen.

$$\Delta f = \frac{2f_0^2}{A\sqrt{\mu_q\rho_q}}\Delta m$$

Gleichung 1: Sauerbrey Gleichung

f_0 – Resonanzfrequenz (Hz)

Δf – Frequenzänderung (Hz)

Δm – Massenänderung (g)

A – piezoelektrisch aktive Kristallfläche (Area between electrodes, cm²)

ρ_q – Quarzdichte ($\rho_q = 2.648 \text{ g/cm}^3$)

μ_q – Schermodulus des Quarzes ($\mu_q = 2.947 \times 10^{11} \text{ g/cm.s}^2$; AT Cut)

Für die Gültigkeit der Gleichung muss die Anlagerung starr und gleichmäßig verteilt sein und die Frequenzänderung darf nicht mehr als 2% ($\Delta f/f < 0,02$) betragen. Bei höherer Frequenzänderung muss die Elastizität des aufgetragenen Materials berücksichtigt werden. Eine weitere Einschränkung der Sauerbrey-Gleichung ist, dass diese nur für Messungen in Gasphase gilt. Für Messungen in flüssiger Phase wurde von Kanazawa und Gordon 1985³² eine Gleichung entwickelt (Gl. [2]). Diese korreliert die Frequenzänderung mit der Dichte und der Viskosität der Flüssigkeit. Da sich die Viskosität der Flüssigkeit bei Analytzugabe ändert, können Quarzmikrowaagen zur Messung in flüssiger Phase eingesetzt werden.

$$\Delta f = f_0^{3/2} \left(\frac{\rho_i \eta_i}{\rho_q \mu_q} \right)^{1/2}$$

Gleichung 2: Kanazawa-Gordon Gleichung

f_0 – Resonanzfrequenz (Hz)

Δf – Frequenzänderung (Hz)

ρ_q – Quarzdichte ($\rho_q = 2.648 \text{ g/cm}^3$)

μ_q – Schermodul des Quarzes ($\mu_q = 2.947 \times 10^{11} \text{ g/cm.s}^2$; AT Cut)

ρ_i – Dichte der Flüssigkeit

η_i – Viskosität der Flüssigkeit

Je nach Beschaffenheit der Oberfläche gibt es noch weitere Gleichungen, die Frequenzänderung korreliert dabei immer mit einer Massenänderung und ermöglicht eine klare, quantitative Bestimmung von Analyten. Jedoch sind diese Bauteile inhärent nicht selektiv, es ist daher unmöglich, bei Mischungen und realen Proben ohne Oberflächenmodifikation des Sensors eine qualitative oder quantitative Aussage zu treffen. Alle Gleichungen zeigen auch eine Abhängigkeit von der Grundfrequenz. Das bedeutet, das Signal kann durch Erhöhung der Resonanzfrequenz des Quarzes gesteigert werden. Diese Signalerhöhung ist jedoch technisch (Dicke des Quarzplättchens) limitiert. Durch Oberflächenwellen kann die Eigenfrequenz stark gesteigert werden, jedoch können auch die elektronischen Komponenten die Messung stärker beeinflussen. Für den Routinebetrieb im Labor ist daher ein guter Kompromiss zwischen Signalstärke und elektrischer und mechanischer Stabilität einzugehen.

1.2. Molekulares Prägen

Molekulares Prägen ist eine vom Prinzip her relativ unkomplizierte Methode zur Herstellung von funktionellen Materialien. Bereits 1931 beschrieb Polyakov den Effekt von verschiedenen Lösungsmitteln (Toluen, Xylen und Benzen) auf ein Kieselerdegel zur Anwendung in der Chromatographie³³. In Anwesenheit von Schwefelsäure als Initiator für die Polymerisation fand er eine Abhängigkeit der Adsorption des Gels je nach verwendetem Lösungsmittel. 1949 beschrieb Dickey³⁴ die Polymerisation von Natriumsilikat in Gegenwart von vier verschiedenen Farbstoffen, nämlich Methyl-, Ethyl-, n-Propyl- und n-Butylorange. Nach Entfernen der Farbstoffe stellte er bei Bindungsexperimenten fest, dass die Polymere den korrespondierenden Farbstoff gegenüber den anderen Farbstoffen bevorzugten. Erstes kommerzielles Interesse zeigte die Firma Merck, als sie einen NikotinfILTER auf Basis dieser molekular geprägten Silikate patentierte³⁵. Curti et. al waren die ersten Anwender von molekular geprägten Silikaten in der Chromatographie, wo sie zeigten, dass sich racemische Mischungen von Mandelsäure teilweise trennen lassen³⁶. Dickey beschrieb 1949 erstmals die Möglichkeit, molekulare Prägung zur Katalyse von Reaktionen zu verwenden, was erstmals 1962 von Patrikeev gezeigt

werden konnte, indem er die Auswirkungen von MIPs auf die Polykondensation von Aminoestern untersuchte³⁷. Pauling und Campbell beschrieben 1942 die *in vitro* Produktion von Antikörpern³⁸, sie verwendeten dabei ein Verfahren, das im Prinzip modernen Bioprägemethoden entspricht. Das molekulare Prägen von Polymeren wurde erstmals von Wulf in den 70er Jahren beschrieben und eröffnete damit ein neues Anwendungsgebiet des molekularen Prägens^{39,40}. Auch in der Sensorik gab es bald Anwendungen von molekular geprägten Polymeren. Es zeigte sich, dass MIPs in der Gasphase zur Detektion von flüchtigen organischen Verbindungen angewendet werden können⁴¹. Dies konnte auch eindrucksvoll auf reale Matrices übertragen werden, wie beispielsweise die in-situ Überwachung der Gasphase eines Kompostierers mittels Sensorarrays^{42,43}. In flüssiger Phase können MIP-Sensoren sowohl für kleine Moleküle^{44,45} als auch große Biospezies wie Viren⁴⁶ oder ganze Zellen⁴⁷ realisiert werden. Es zeigte sich auch, dass eine Sensorantwort auf ein Biomolekül ebenfalls durch künstliche Template erreicht werden kann⁴⁸. So kann man durch Oberflächenprägung von γ -Globulin MIP auf eine Polymeroberfläche künstliche Antikörper erhalten die Insulin detektieren können. In flüssiger Phase zeigen MIP-Sensoren erfolgsversprechende Ansätze für Applikationen in realen Proben. So kann z.B. L-Nikotin in Salbeiblättern nachgewiesen werden⁴⁹. Eine weitere Anwendung in einem realen Medium ist die Möglichkeit das Wachstum von *Escherichia Coli* in einem Bioreaktor mit Quarzmikrowaagen zu beobachten⁵⁰.

1.2.1. Molekulares Prägen – Proteine

Proteinprägung stellt für molekulares Prägen eine große Herausforderung dar. Die heutige Schnellanalytik von Proteinen hängt im Wesentlichen von entsprechenden spezifischen Antikörpern ab. Diese besitzen zwar unerreichte Selektivität, dennoch sind solche Systeme meist teuer und auf eine bestimmte Anwendung beschränkt. Daher wäre eine robuste und billige Alternative dazu wünschenswert⁵¹. Auch außerhalb der Sensorik könnten solche robusten Systeme z.B. als Kontrollsysteme für biologische Prozesse verwendet werden, da diese im Moment meist auf teuren Protein-Protein Wechselwirkungen basieren. Die Entwicklung von Materialien, die diese Eigenschaften imitieren ohne die Nachteile von biologischen Materialien zu

besitzen, wie MIPs, ist daher ein wichtiger Forschungszweig. Das molekulare Prägen von Proteinen ist aufgrund deren Eigenschaften problematisch.

- Größe der Proteine – Aufnahme in das Polymer gehemmt
- Änderung der räumlichen Anordnung – Geringerer enthalpischer Effekt
- Komplexität und viele Bindungsstellen – mehrere Monomere
- Geringe Löslichkeit in org. Lösungsmitteln – Limitierung der Polymersynthese
- Wasser als Lösungsmittel konkurriert mit dem Analyten bei der Synthese um das funktionelle Monomer⁵²

Aufgrund dieser Herausforderungen gibt es auch viele unterschiedliche Ansätze zur Herstellung von Protein MIPs. So kann ein Porogen während des Prägeprozesses die Oberflächenstruktur verbessern, aber auch gebildete Kavitäten zerstören beziehungsweise verformen⁵³. Verschiedene Gruppen verwenden wasserlösliche Acrylate, um poröse Polymere herzustellen, die eine ähnliche Zusammensetzung wie Elektrophorese-Gele besitzen. Vaidya *et. al.* beschreiben beispielsweise einen Imprint für Trypsin⁵⁴. N-Acryloyl-p-Aminobenzoamidin wird mit Bisphenol A und Acrylsäure in einer THF/Wasser Mischung polymerisiert. Der Analyt kann anschließend mit Aceton aus der Polymermatrix entfernt werden. Ein MIP für Albumin kann nach Pang⁵⁵ mittels inverser-Phasensuspension hergestellt werden. Auch die Anwendung von Hydrogelen für Protein MIPs stellt einen interessanten Ansatz dar. Durch mechanische oder chemische Reize können diese Polymere reversibel ihr Volumen ändern. Sie bieten daher viele Anwendungsmöglichkeiten, wie einen künstlichen Muskel⁵⁶. Diese Materialeigenschaft könnte aber auch zur besseren Ein- bzw. Auslagerung von Proteinen verwendet werden. Bis jetzt wurden allerdings nur molekular geprägte Hydrogele für kleinere Moleküle beschrieben. So können nach Karmalkar Serinproteasen mittels eines Metall-Ligand-induzierten Prozesses, bei dem Carboxyl- und Hydroxylgruppen in eine Hydrogelmatrix eingebaut werden, simuliert werden⁵⁷. Auch Sol-Gel Prozesse können zur Einlagerung von Proteinen verwendet werden, hierbei ist die sanfte Polymerisation ein Vorteil⁵⁸. Venton *et. al.* konnten so geprägte Polysiloxanmaterialien für BSA und Urease herstellen⁵⁹. Weiteres sind Interaktionen zwischen DNA und Proteinen spezifisch. Diese Eigenschaft kann zur Herstellung eines selektiven Materials verwendet werden⁶⁰. Bei der Epitopstrategie wird eine Peptidkette in das Polymer eingebaut, welche anschließend das Protein erkennen kann⁶¹. Shi *et al.* beschreiben die Möglichkeit

einer Oberflächenprägung, indem auf dem Protein ein Disaccharidfilm aufgetragen wird, der mit einer Polymermatrix überzogen wird. Aus dieser geprägten Matrix kann das Protein schließlich herausgewaschen werden⁶².

1.2.2. Molekulare Erkennung

Eine wichtige Eigenschaft von molekular geprägten Polymeren ist die Fähigkeit zur molekularen Erkennung, die letztlich die Selektivität des Sensors bestimmt. Massensensitive Sensoren wie Quarzmikrowaagen (QCM) sind sehr sensitiv, aber erst durch Aufbringen einer Schicht entsteht ein selektiver Sensor. MIPs basieren auf zwei Detektionsprinzipien, nämlich schwachen chemischen Wechselwirkungen sowie einem räumlichen Detektionsprinzip. Die chemischen Wechselwirkungen können Komplexbildung, Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Wechselwirkungen, Van-der-Waals Wechselwirkungen oder auch chemische Bindungen sein. Die bekannteste ist wohl die Wasserstoffbrückenbindung, bei der der kovalent gebundene Wasserstoff eine Wechselwirkung mit einem ungebundenen Elektronenpaar eingeht. Die chemischen Wechselwirkungen sind unterschiedlich stark, von Van-der-Waals Wechselwirkungen mit 0-10kJ bis hin zu Komplexbindungen mit 10-40 kJ. Je stärker die Wechselwirkung desto stärker ist der Analyt an das Polymer gebunden, jedoch wird es auch schwieriger, den Analyten wieder aus der Polymermatrix zu entfernen. Bei kovalenten Bindungen ist das Sensorsignal üblicherweise nicht mehr reversibel. Bei Anwendungen, die reversible Resultate erfordern, ist auf kovalente Wechselwirkungen zu verzichten. Das räumliche Detektionsprinzip ist sehr ähnlich dem Schlüssel-Schloss Prinzip zwischen Enzym und Substrat (erstmals beschrieben von Emil Fischer⁶³), bei dem zwei komplementären Strukturen bestimmte biochemische Funktionen erfüllen. Bei einer molekular geprägten Sensorschicht wird ein Hohlraum mit den räumlichen Eigenschaften des Analyten geschaffen, daher passt im Idealfall nur der Analyt in diese Kavität. In der Realität ist die Einlagerung des Analyten gegenüber anderen Substanzen in der Matrix enthalpisch begünstigt.

1.2.3. Prägetechniken

Wie eben beschrieben, kann molekulares Prägen für fast jede Art von Analyten angewandt werden. Abhängig vom Analyt werden verschiedene Prägemethoden angewandt, so wird für kleine Moleküle meist Volumenprägung (bulk imprinting) verwendet, während für größere Bioanalyten meist Oberflächenprägung am zielführendsten ist. Bei der Volumenprägung ist der Analyt bereits während der Polymerisation der Matrix in der Lösung vorhanden, während bei einer Oberflächenprägemethode der Analyt in die sich bildende Polymeroberfläche gepresst wird oder in diese sedimentiert. Gleich ist allen Prägemethoden die Verwendung von Quervernetzer und funktionellen Monomer(en) zur Polymerherstellung. Der Quervernetzer ist eine Verbindung, die mit dem funktionellen Monomer eine Polymermatrix bildet und gleichzeitig zwei oder mehrere sich bildende Polymerketten miteinander verknüpft und somit für die mechanischen Eigenschaften verantwortlich ist. Durch Variation des prozentuellen Vernetzeranteils kann die Härte und die Steifheit des Polymers verändert werden. Für MIPs wird meist ein hoher Anteil von Quervernetzer, meist über 50%, verwendet. Das funktionelle Monomer dient hingegen zur molekularen Erkennung. Wie in Kapitel 1.2.2 im Detail beschrieben, bildet es chemische Wechselwirkungen mit dem Analyten aus.

1.2.3.1. *Volumenprägung*

Die Volumenprägung ist eine unkomplizierte Art, ein molekular geprägtes Polymer herzustellen. Eine schematische Darstellung des Prägevorgangs ist in Abb. [5] dargestellt.

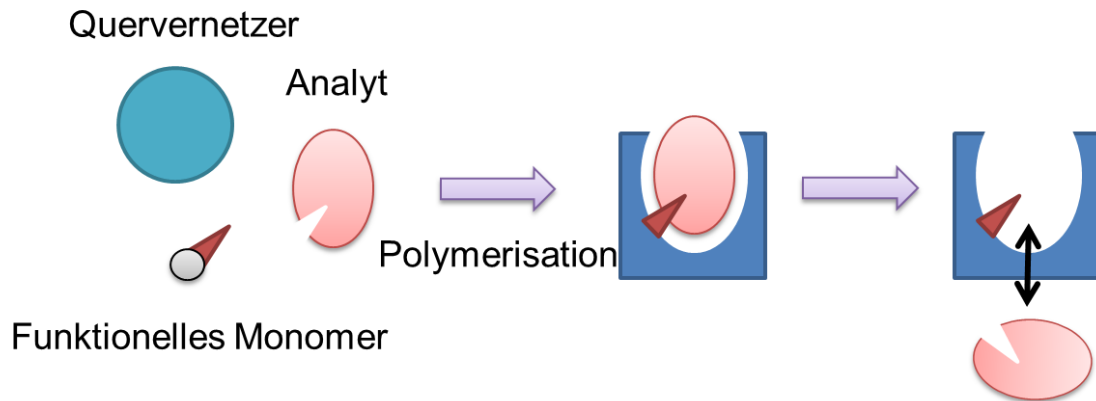


Abbildung 5: Schematische Darstellung der bulk-Prägemethode

Quervernetzer, funktionelles Monomer sowie Radikalstarter und Analyt werden als Reaktionsmischung bei einer bestimmten Temperatur oder unter UV-Licht polymerisiert. Analyt und funktionelles Monomer selbstorganisieren in dieser Lösung bereits durch chemische Wechselwirkung miteinander. Der Analyt wird entweder durch Lösen oder Verdampfen aus dem Polymernetzwerk entfernt, dadurch bleibt ein Hohlraum zurück, der die zu den sterischen und funktionellen Eigenschaften des Templatmoleküls komplementär ist. In diesem Hohlraum befinden sich also durch die vorherige Wechselwirkung zwischen Analyt und Monomer freie funktionelle Gruppen, die wiederum mit demselben Analyten in nichtkovalente Wechselwirkung treten können.

1.2.3.2. Selbstorganisierte Volumenprägung

Für temperatur- und UV-empfindliche Moleküle ist eine Volumenprägung nicht zu empfehlen. Beispielsweise denaturieren Proteine bei höheren Temperaturen oder sich ändernden pH Wert. Durch diese räumliche Neuordnung des Analyten während der Polymerisation kommt es auch zu einer Änderung der Kavitäten, welche dann nicht mehr die ursprünglichen räumlichen Eigenschaften des Analyten besitzen. Dadurch kann das fertig geprägte Polymer mit den Analyten nicht mehr, bzw. nicht mehr so stark, wechselwirken. Bei Proteinen kann dieser Umstand durch Komplexierung vermieden werden, jedoch kommt es zur Bildung einer größeren

Kavität. Um diese Probleme zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Prägemethode entwickelt. Eine schematische Abbildung dieses Vorgangs ist in Abb. [6] dargestellt.

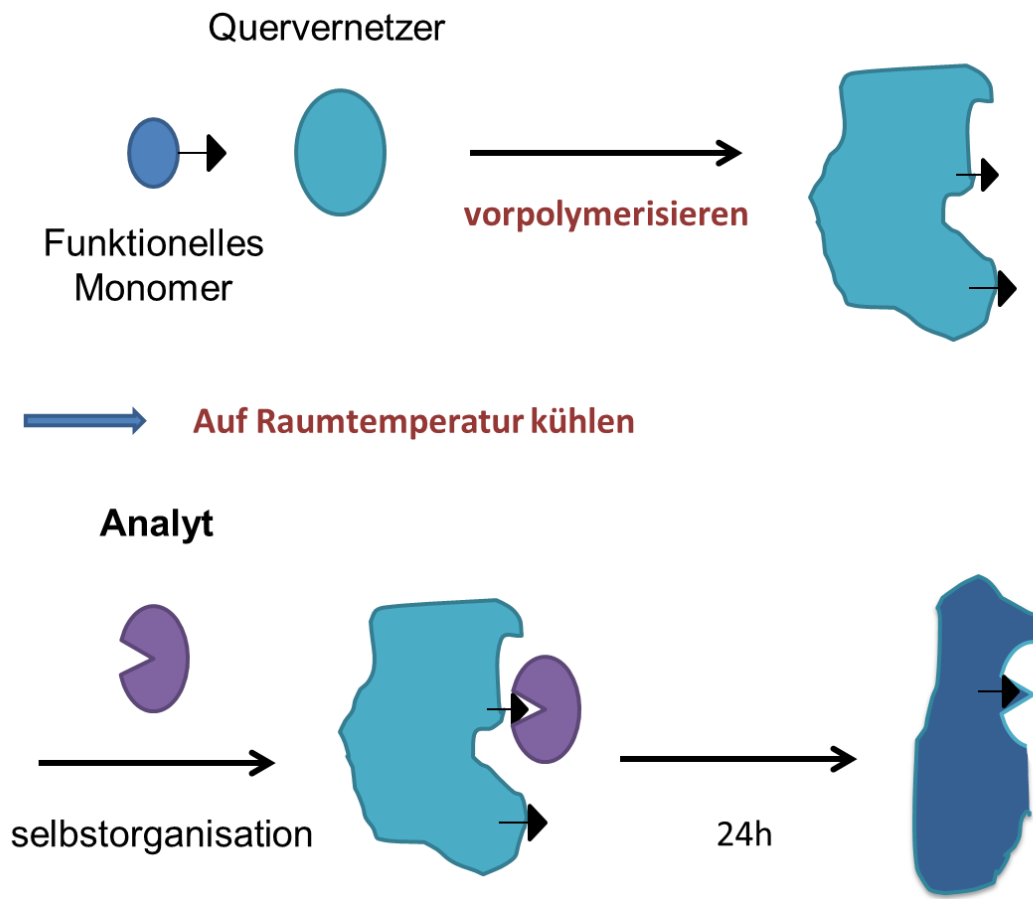


Abbildung 6: schematische Darstellung der selbstorganisierten Prägemethode

Hier wird zuerst der Quervernetzer, das funktionelle Monomer und der Radikalstarter vorgelegt und vorpolymerisiert, bis der Gelpunkt erreicht ist. Anschließend lässt man die Oligomerlösung auf Raumtemperatur abkühlen und gibt anschließend den Analyten hinzu. Dadurch, dass die Oligomerlösung noch nicht fertig polymerisiert ist, können sich die funktionellen Gruppen um den Analyten anordnen und so mit dem Proteintemplat wechselwirken. Diese Lösung kann nun mittels Spin-coatings auf eine Oberfläche aufgetragen werden. Nach der vollständigen Polymerisierung kann der Analyt mittels Waschen aus der Kavität entfernt werden. Diese Methode bietet gegenüber der klassischen Volumenprägung den Vorteil, dass sie auch für empfindliche Spezies verwendbar ist, und dass dieselbe chemische und physikalische Zusammensetzung des MIP und nicht geprägten Polymers (NIP)

gegeben ist. Bei einer klassischen Volumenprägung werden MIP und NIP separat synthetisiert. Durch Zugabe eines Templats in die Reaktionslösung kann es zur Änderung der Polymerisationszeit kommen, welche starken Einfluss auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Polymers haben kann. Ein weiterer Vorteil der selbstorganisierten Prägemethode ist die Möglichkeit, Nanopartikel für Proteine mittels Fällungsmethode herzustellen. Dabei wird das Oligomer in eine Lösungsmittelmatrix gebracht, in der das Polymer nicht löslich ist, dabei bilden sich kleine Kügelchen aus⁶⁴. Bei einer Mikroemulsion⁶⁵, in der ein organisches und wässriges Lösungsmittel verwendet wird, könnte es wie bei der bulk Prägemethode zu Konformationsänderungen oder Denaturierung kommen.

1.2.3.3. Oberflächenprägung

Oberflächenprägung ist eine direkte Methode, um biologische Analyte für molekulares Prägen zugänglich zu machen. Die Template werden hierbei nicht den harschen Reaktionsbedingungen der radikalischen Polymerisation ausgesetzt, die Methode ist daher für die Prägung empfindlicher Biospezies geeignet.

Stempel- und Sedimentationsmethode

Ein vergleichsweise unkomplizierter, direkter Weg zur Herstellung von funktionalisierten Oberflächen ist die Prägetechnik mittels Stempel⁶⁶, sowie die Sedimentationsmethode. Ein schematischer Vergleich der beiden Methoden ist in Abb. [7] dargestellt.

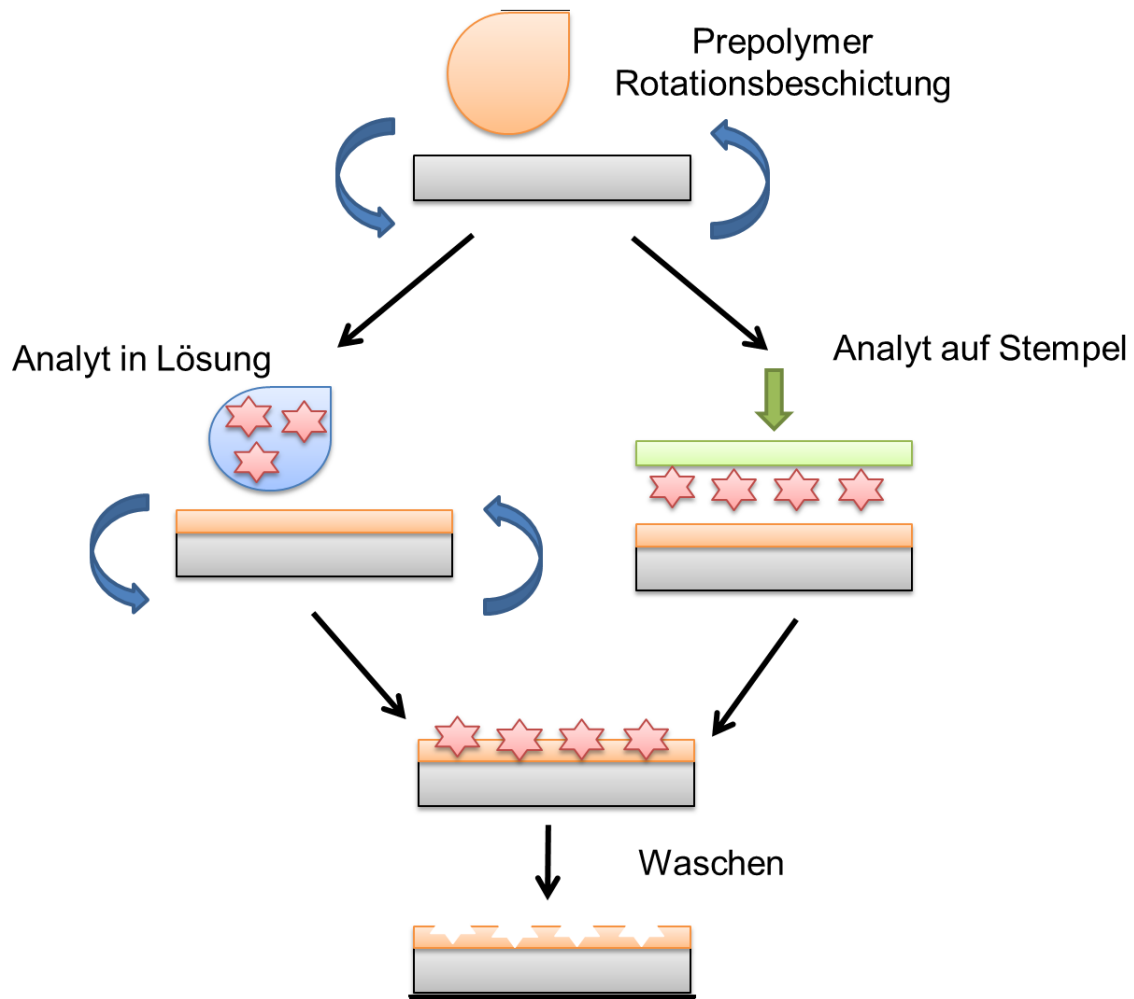


Abbildung 7: Schematischer Vergleich zwischen Sedimentations- (links) und Stempelprägemethode (rechts)

Hierbei wird eine vorpolymerisierte Oligomerlösung mittels Rotationbeschichtung auf eine Oberfläche aufgetragen. In diese Oberfläche wird ein Stempel gepresst, auf dem die Analyten vorgeordnet wurden. Dies kann durch Immobilisation, Auftragung mittels spin-coatings oder Selbstorganisation erreicht werden. Nach dem Entfernen des Stempels verbleibt der Analyt üblicherweise in der Polymeroberfläche, durch Waschen wird dieser entfernt. Es entstehen Hohlräume, die den Analyten widerspiegeln. Dadurch dass z.B. ein Bakterium wie E. Coli bei der Anordnung auf dem Stempel in jeder Form seines Lebenszyklus vorliegt, entsprechen die Hohlräume auch jeder Phase der Onthogenese⁶⁷. Ein ähnlicher Zugang ist die sogenannte Sedimentationsmethode. Im Gegensatz zur Stempelmethode wird die vorpolymerisierte Lösung mittels Rotationsbeschichtung aufgebracht und gleich danach der Analyt auf dieser Oberfläche mittels spin-coating verteilt.

Das Oligomergemisch ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgehärtet, der Analyt sinkt in die Oligomerlösung. Zusätzlich kann der Analyt mittels Polydimethoxysiloxanstampel (PDMS) tiefer eingepresst werden. Ist das Polymer schließlich fest, kann das Templat wieder herausgewaschen werden, wie bei der Stempelprägung entsteht ein Hohlraum, der die räumlichen Eigenschaften der Vorlage widerspiegelt. Beide Methoden eignen sich zur Herstellung von funktionalisierten Oberflächen, jedoch können bei der mechanischen Ablösung des Stempels allfällig gebildete Hohlräume zerstört werden. Eine nicht mechanische Ablösung des Stempels in Wasser ist daher zu bevorzugen. Stempel- und Sedimentationsmethode funktionieren besonders gut mit organischen Lösungsmitteln während der Polymerisation, da diese sehr schnell verdampfen und nur eine Oligomermatrix zurückbleibt. Bei Wasser kann es hingegen zu Problemen bei der Benetzung der Sensoroberfläche aufgrund der hohen Oberflächenspannung von Wasser kommen.

1.3. Serum Albumin

Serum Albumin ist ein globuläres Protein, welches unter anderem in Eiern, Hühnern, Kühen und auch im Menschen vorkommt. Aufgrund seiner Verfügbarkeit und seiner interessanten Bindungseigenschaften gehört es zu den meisterforschten Proteinen. Es besteht je nach Unterart aus 580 bis zu 585 Aminosäuren. Seine Sekundärstruktur ist besonders interessant, es ist ein Muster von Schleifen, welche von Disulfidbrücken zusammengehalten werden⁶⁸. Das Molekül besitzt drei verschiedene Domänen, die in ihrer Größe nahezu ident sind, jedoch große Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. BSA ist ein intrazelluläres Protein und folgt daher denselben Weg der Synthese⁶⁹ und des Transports wie andere intrazelluläre Proteine. Der Transportmechanismus des Albumins erfolgt dabei über Synthese von Signalmolekülen, welche die Bindung von Ribosomen ans Endoplasmatische Reticulum signalisieren⁷⁰. Das Protein wird hierbei in Vesikeln via Endoplasmatischem Reticulum zum Golgiapparat und anschließend an die Zelloberfläche transportiert⁷¹. Bovines Serum Albumin (BSA) tritt in Rindern auf und wird aus diesen gewonnen. Der Spitzname Fraktion V kommt von der

Reinigungsmethode nach Cohn, bei der sich das Albumin in der fünften Fraktion befindet. Es besitzt eine Molmasse von 66,463 kDa, sein isoelektrischer Punkt in Wasser bei 25°C liegt bei pH=4,7, seine räumlichen Dimensionen entsprechen 14,0 x 4,0 x 4,0 nm und es besitzt einen Stokes'schen Radius von 3.48 nm⁷². Der Stoke Radius beschreibt hierbei eine hypothetische feste Kugel die dieselben Diffusionseigenschaften wie das BSA besitzt. In Abb. [8] ist die Kristallstruktur von Bovinem Serum Albumin dargestellt. Das Rinderalbumin wird meist in der Immunologie eingesetzt, wie z. B. dem Enzyme-linked Immunosorbent Assay oder der Immunpräzipitation. Es spielt es bei dem Transport von langkettigen Fettsäuren eine große Rolle⁷³. Serum Albumin wird auch aufgrund seiner interessanten Bindungseigenschaften genau untersucht, so zeigte sich im Fall von langkettigen Fettsäuren, dass drei Klassen von Bindungsstellen für die Interaktionen verantwortlich sind.

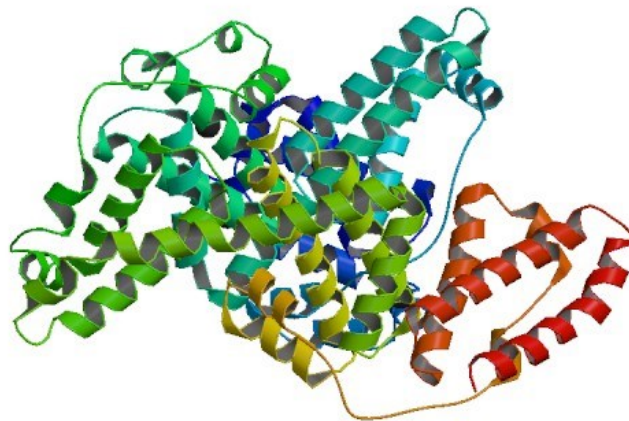


Abbildung 8: Kristallstruktur von Bovinem Serum Albumin; Quelle: RCSB BDP, public domain

Albumin kommt auch im menschlichen Blut in Form von Humanalbumin (HSA) vor, wo es für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks verantwortlich ist. Es ist dabei im ALB Gen codiert. Das Protein wird in der Leber produziert⁷⁴ und ist daher ein Indikator für die Gesundheit von Leber und Niere. Ein Albumintest kann auch

feststellen, ob genügend Protein im Körper absorbiert wird. Der Normalwert des Tests liegt zwischen 34 und 54 g/L. Der Albuminspiegel ist von drei Faktoren abhängig, nämlich Synthese, Verteilung im Blut sowie Abbau. Im erwachsenen Menschen hat ein HSA-Molekül eine Halbwertszeit von drei Wochen⁷⁵. Studien haben gezeigt, dass der Albuminanteil von verschiedenen Faktoren abhängig ist. So sind der Hormonspiegel, Ernährung, osmotischer Druck, Stress und Körpertemperatur⁶⁸ wichtige Faktoren der Albuminsynthese. HSA ist auch ein wichtiges Protein für den Stofftransport für schwer wasserlösliche Substanzen wie Bilirubin oder Progesteron, aber auch für verschiedene Medikamente⁷⁶. Andere Serumalbumine können nicht für die Untersuchung der Transporteigenschaften von Humanalbumin herangezogen werden, da das Bindungsverhalten der Liganden unterschiedlich ist, daher sind die Bindungseigenschaften von Humanalbumin ein wichtiges Forschungsfeld⁷⁷.

1.4. Proteindetektion

1.4.1. Klassische Methoden

Es gibt verschiedene „klassische Methoden“ zur qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen, wie die Bradford Methode, den Edman-Abbau, die Methode nach Lowry, Detektion nach Warburg und Christian sowie die Methode nach Kjeldahl. Der Edman-Abbau erlaubt die Bestimmung von Aminosäuresequenzen über eine sich wiederholende Endgruppenbestimmung⁷⁸. Die Methoden nach Warburg und Christian sowie Bradford und Lowry sind semiquantitative Nachweise, die auf UV-VIS-Detektion basieren. Die Methode nach Warburg und Christian beruht auf Bestimmung von Tryptophan- und Trypsinbestimmung bei 280nm, während die Methode nach Bradford auf einem Proteinkomplex mit Coomassie Brilliant Blue basiert. Die Methode nach Lowry basiert auf der Detektion eines Kupfer-Protein-Komplexes. Die Methode nach Kjeldahl wird häufig in der Analyse von Lebensmitteln eingesetzt. Dabei wird der Proteingehalt anhand der Aminogruppen durch Umwandlung zu Ammoniak bestimmt. Hierbei wird die Probe in einem Kolben mittels

Schwefelsäure aufgeschlossen und anschließend mit einer starken Base neutralisiert. Der erhaltene Ammoniak kann z.B. mittels Wasserdampfdestillation quantitativ in eine Säurevorlage überführt und bestimmt werden.

1.4.2. Massenspektrometrie

Proteindetektion mittels Massenspektrometrie ist ein wichtiger Zweig der Proteinforschung. Steigernde Anforderungen, Proteine in einer möglichst komplexen Matrix nachzuweisen, führten zu einer rasanten Entwicklung von spektrometrischen Methoden. So hat die Massenspektrometrie den Edman-Abbau von Proteinen als Analysenmethode abgelöst. Dennoch gibt es auch hier noch viele ungelöste Probleme, wie die hohe Konzentrationsverteilung von verschiedenen Proteinen, die mehr als 10 Zehnerpotenzen umfasst⁷⁹. Die zwei primären Ionisationsmethoden von Biomolekülen, nämlich „electrospray ionisation (ESI)“ und „matrix assisted laser ionisation (MALDI)“ wurden in den 80er Jahren entwickelt⁸⁰. Dies führte auch zu neuen Entwicklungen von Massenspektrometern. Diese Spektrometer werden nicht nur zur Massenbestimmung sondern auch zur Aufklärung von Proteinstrukturen eingesetzt⁸¹. Generell besteht jeder massenspektrometrische Arbeitsablauf aus drei verschiedenen Phasen: Isolation aus der Matrix, qualitative und quantitative Massenspektrometrie, deren Spektren anschließend mit Datenbanken zugeordnet werden, wobei die Statistik eine wichtige Rolle bei Zuordnung und Absicherung der Resultate spielt.

1.5. Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop ist ein wichtiges Gerät zur Darstellung und Abtastung in der Größenordnung von Nanometern. Dies ist mit konventionellen Methoden aufgrund des optischen Brechungslimits nicht möglich. Neben bildgebenden Verfahren gibt es auch spektroskopische Verfahren wie Kraft-Abstands-Kurven oder Proteinfaltungsexperimente⁸². Ein weiteres Anwendungsgebiet ist

Nanoindentierung⁸³. Der Vorläufer der Rasterkraftmikroskopie ist die Rastertunnelmikroskopie STM (scanning tunneling microscopy) und wurde 1980 in Zürich entwickelt. 1986 wurde der Nobelpreis für die Entwicklung des STM verliehen. Im selben Jahr wurde auch die Rasterkraftmikroskopie, auch AFM (atomic force microscopy) genannt, entwickelt. Das Rasterkraftmikroskop ist schematisch in Abb. [9] dargestellt.

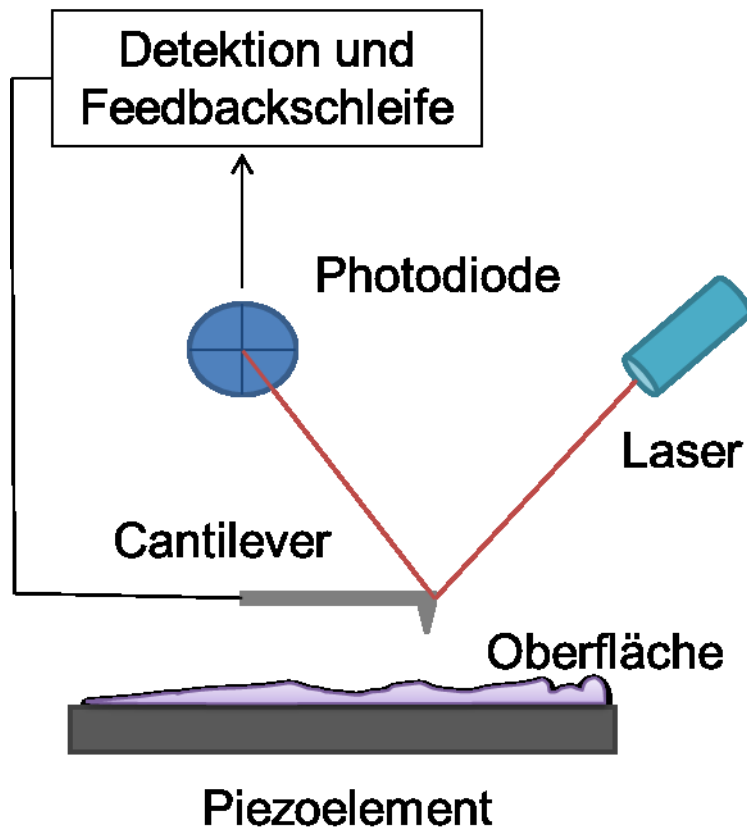


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines Rasterkraftmikroskops

Das Gerät besteht in Prinzip aus einem Hebelarm (Cantilever) mit einer Spitze deren Kugeldurchmesser im Nanometerbereich liegt, der über eine Oberfläche geführt wird. Der Cantilever ist hierbei auf einem piezoelektrischen Stellmotor befestigt. Ein Laser ist auf die Spitze fokussiert und wird an deren Oberfläche auf eine Viersegment-Photodiode reflektiert. Zwischen Spitze und Oberfläche bilden sich Kräfte aus, hierbei kommt es zu einer Auslenkung des Hebelarms und damit auch des Lasers auf der Viersegment-Photodiode. Durch eine Kompensationsmethode kann entweder die Kraft oder die örtliche Position der Spitze konstant gehalten werden.

Bei konstanter Kraft fährt das piezoelektrische Element auf und ab, um die Kraft konstant zu halten und somit kann ein Höhenprofil erstellt werden.

Die Spitze ist ein wichtiger Bestandteil des Rasterkraftmikroskops und wird mittels Ätztechnik hergestellt. Die Rückseite der Cantilever ist meist mit Gold beschichtet, um die Reflexion des Laserlichts zu erhöhen. Grundsätzlich kann am AFM zwischen drei verschiedenen Messmoden, dem contact mode, tapping mode und dem non-contact mode unterschieden werden⁸⁴. Da in dieser Arbeit nur im contact mode oder im tapping mode gemessen wurde, werden im Folgenden auch nur diese beiden Möglichkeiten kurz erläutert.

1.5.1. Contact Mode

In diesem Messmodus, der auch repulsiver Modus genannt wird, befindet sich die Spitze in Kontakt mit der Oberfläche. Im Messmodus wird entweder die Kraft oder die Höhe zwischen Oberfläche und Spitze konstant gehalten. Bei atomaren Abständen kommt es zur Abstoßung der Elektronenwolken zwischen Oberfläche und Spitze⁸⁵, diese Kräfte sind so stark, dass sie alle anziehenden Interaktionen überlagern. Daraus folgt, dass die Kräfte zwischen Spitze und Oberfläche repulsiv sind. Neben den abstoßenden Kräften sind vor allem Scherkräfte und Kapillarkräfte zu beachten. Die Kapillarkräfte können als konstant angesehen werden solange die Oberfläche homogen ist, Scherkräfte dagegen können vor allem bei weichen Proben ein großes Problem darstellen. So können diese durch die Spitze verschoben werden, was zu verminderter Bildqualität führt. Ebenso kann die Probenoberfläche durch die Spitze beschädigt werden.

1.5.2. Tapping Mode

Der tapping Mode bietet gegenüber dem contact Mode vor allem bei der Messung von weichen Proben viele Vorteile, indem er Probleme von Reibung und Adhäsion vermindert. Der Cantilever wird dabei nahe seiner Resonanzfrequenz zum

Schwingen gebracht. Die Spitze wird kurz an die Oberfläche geführt, dabei kommt es zu einem Energieverlust der Schwingung, die der Topographie der Oberfläche entspricht. Die Oszillation wird normalerweise über eine Rückkopplungsschleife konstant gehalten, je nach Topographie muss sich die Spitze also in vertikaler Richtung bewegen. Da die Spitze sich nicht andauernd im Kontakt mit der Oberfläche befindet, kommt es zu einer geringeren mechanischen Belastung der Oberfläche, dies erklärt die bevorzugte Anwendung bei weichen und empfindlichen Proben. Mit dieser Technik können sogar Molekülbindungen aufgelöst werden⁸⁶.

1.5.3. Kraft-Abstands Kurven

Neben den bildgebenden Methoden gibt es noch die Kraftspektroskopie, also die direkte Messung der Wechselwirkung zwischen Spitze und Substrat als Funktion des Abstands der Spitze zur Oberfläche. Dabei kann auf jeder Fläche eine laterale Auflösung von 25nm, vertikale Auflösung von 0,1Å sowie eine Kraftauflösung von 1 pN⁸⁷ erzielt werden. Neben Rasterkraftmikroskopie gibt es noch weitere Möglichkeiten Oberflächenkräfte zu messen⁸⁸. Eine dieser Möglichkeiten ist das Oberflächenkraftmessgerät (surface force apparatus), welches 1978 in Cambridge von Israchvili⁸⁹ entwickelt wurde, welches das führende Gerät in diesem Bereich ist. Im Prinzip ist die Methode dem AFM sehr ähnlich, so wird eine glatte Oberfläche an einer Feder befestigt, während die Probe angenähert wird. Die Ablenkung der Feder wird gemessen und in Information umgewandelt. Im Vergleich zum AFM kann diese Methode zwar Kräfte über einen größeren Bereich messen, ist aber weitaus schwieriger in der Handhabung. Oberflächenkraftbestimmung mittels Rasterkraftmikroskopie bietet aber auch Vorteile, da auch rauere Proben gemessen werden können. Eine graphische Beschreibung einer Kraft-Abstands-Kurve ist im nächsten Kapitel zu finden. In den ersten Studien mittels AFM 1988 wurden Oberflächenkräfte von Graphit und Lithiumfluoridoberflächen bestimmt⁹⁰. Bei einer Kraft Abstands Kurve wird die Kraft gegen den Weg der Spitze aufgetragen, die Kraft zwischen Spitze und Oberfläche wird durch das Hooke'sche Federgesetz beschrieben, wobei die Kraft zur Strecke Proportional ist.

Mittels Kraft-Abstands-Kurven können sowohl Adhäsion als auch die Elastizität des Materials bestimmt werden⁹¹.

1.5.4. Peak Force QNM⁹²

Peak Force Quantitative Nanomechanical Mapping (QNM) oder Peak Force Tapping erlaubt die bildliche quantitative Darstellung von mechanischen Eigenschaften im Nanometerbereich. Bei dieser Methode werden Spitze und Oberfläche an jedem Punkt aneinander angenähert und wieder voneinander entfernt. Hierbei werden die lateralen Kräfte die auf die Spitze wirken auf ein Minimum reduziert. Bei diesem Vorgang erhält man eine Kraft Abstands Kurve an jedem Punkt, wobei vom Gerät das Maximum der Kraft kontrolliert wird. Eine schematische Darstellung der Methode ist in Abb. [10] dargestellt.

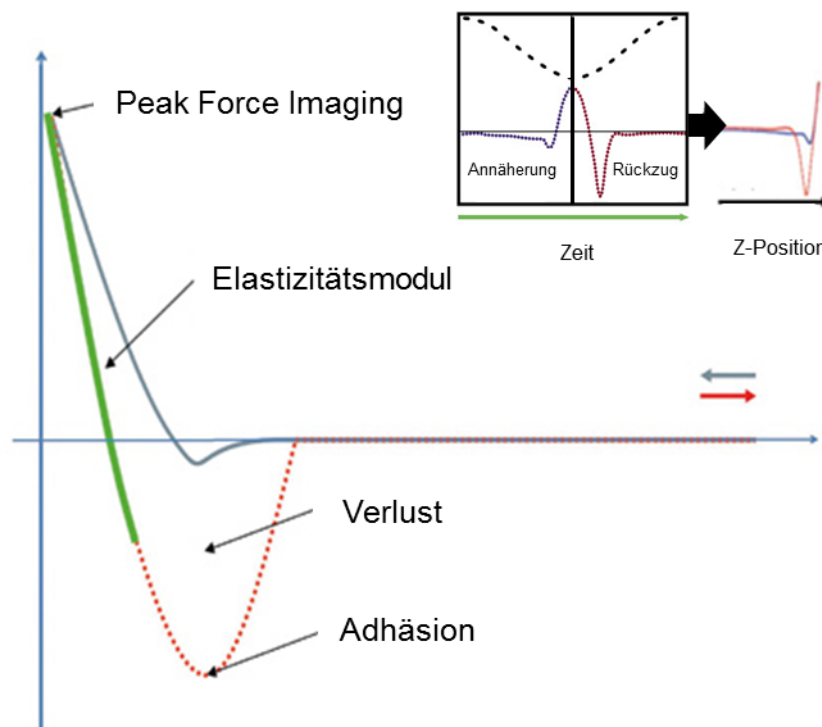


Abbildung 10: Peak Force QNM und Kraft Abstands Kurven, sowie Bestimmung der mechanischen Eigenschaften des Materials

Bei der Annäherung der Spitze an die Oberfläche kommt es zu immer stärkeren attraktiven Kräften, bis die Spitze schließlich von der Oberfläche abgestoßen und danach wieder zurückgezogen wird. An diesem Punkt wird die maximale Kraft gemessen und während des Aufnahmevorgangs konstant gehalten. Die Grundlage der Darstellung von mechanischen Eigenschaften ist die Fähigkeit, eine Kraft-Abstands-Kurve an jedem Punkt aufzunehmen. Um die verschiedenen Beiträge der einzelnen Materialeigenschaften, wie Elastizitätsmodul, Adhäsion, Deformation und Dissipation zu unterscheiden, ist es wichtig, die Kraft an der Spitze in situ zu messen. Für Peak Force Tapping wird die Frequenz der Spitzenmodulation bewusst niedriger als die Resonanzfrequenz gewählt. Während der Messung werden bekannte Artefakte mathematisch entfernt. Die Information der ausgewerteten Kraft-Abstands-Kurven wird in die bildgebenden Kanäle eingespeist. Auf diese Weise können die verschiedenen Materialeigenschaften während der Messung beobachtet werden. Der Vorteil dieser Methode gegen eine klassische Force Volume Methode ist der Zeitfaktor. Klassische Methoden bewegen sich um 2 Stunden Messzeit, durch gepulste Methoden kann die Messzeit drastisch reduziert werden.

Zur Bestimmung des mechanischen Elastizitätsmoduls wird die Steigung der Kurve zur Berechnung des reduzierten Young'schen Moduls herangezogen. Diese Berechnung erfolgt unter Bezugnahme des sogenannten Derjaguin-Muller-Toporov (DMT) Modells⁹³.

$$F - F_{Adh} = \frac{4}{3} E^* \sqrt{R(d - d_0)^3}$$

Gleichung 3: DMT-Modell

$F - F_{Adh}$ – Kraft am Cantilever relativ zu den Adhäsionskräften

$d - d_0$ – Deformation der Probe

R – Spitzenradius

E^* – Reduzierte Elastizitätsmodul

Die klassische Hertz Betrachtung fokussiert sich primär auf einen nicht adhäsiven Kontaktvorgang, das bedeutet, dass sich die Körper nach ihrer Berührung ohne Adhäsionskräfte trennen lassen. Das DMT-Modell für den adhäsiven Kontakt zwischen Spitze und Oberfläche beruht auf der Hertz'schen Kontakttheorie, bezieht

jedoch weitere attraktive Wechselwirkungen außerhalb der direkten Kontaktfläche mit ein. Für die Berechnung des Young'schen Moduls ist zusätzlich noch die Poissonsanzahl des Materials notwendig. Diese ist wie folgt definiert.

$$\nu = -\frac{\varepsilon_{yy}}{\varepsilon_{xx}}$$

Gleichung 4: Poissonsanzahl

ν – Poissonsanzahl

ε_{yy} – Spannungsrichtung

ε_{xx} – Deformation der Probe

Die Poissonszahl ν ist definiert als linearisiertes negatives Verhältnis aus relativer Änderung der Abmessung quer zur einachsigen Spannungsrichtung ε_{yy} zur relativen Längenänderung ε_{xx} bei Einwirkung eines eindimensionalen mechanischen Spannungszustandes. Oder stark vereinfacht ausgedrückt ein Körper an dem gezogen wird, wird länger und dünner. Mithilfe dieser Materialkonstante kann schließlich das Young'sche Modul bestimmt werden.

$$E^* = \left[\frac{1 - \nu_S^2}{E_S} + \frac{1 - \nu_{Tip}^2}{E_{Tip}} \right]^{-1}$$

Gleichung 5: Young'sches Modul

E^* – Reduziertes Modul

E_{Tip} – Modul Spitze: Annahme Unendlich

E_S – Modul Probe – Young'sches Modul

ν_{Tip} – Poissonsanzahl Spitze

ν_S – Poissonsanzahl Probe

Die Poissonsanzahl liegt hierbei meist zwischen 0.2 und 0.5 woraus sich Unterschiede von 4-25% zwischen dem reduzierten und dem Young'schen Modul ergeben. Es können neben dem Elastizitätsmodul auch weitere mechanische Eigenschaften bestimmt werden, kurze Beschreibungen sind nachfolgend aufgeführt.

- Adhäsion Die Adhäsion ist eine mechanische Eigenschaft des Materials und resultiert aus Van-der-Waals, elektrostatischen und Kapillarkräften. Damit eignet sie sich besonders zur Untersuchung von geprägten Oberflächen, da jene auf diesen schwachen Wechselwirkungen basieren. Die Adhäsion wird dabei mit größerem Spitzenradius immer stärker.
- Deformation Die Deformation repräsentiert das Eindringen der Spitze in die Oberfläche durch die Spitze bei maximaler Kraft. Die Deformation kann elastische und plastische Kontributionen enthalten. Mittels bekannter Spitzengeometrie kann dieser Wert auch in Härte umgerechnet werden.
- Verlust Der Verlust (Dissipation) beschreibt den Energieverlust zwischen Annäherung- und Rückziehkurve. Bei einer rein elastischen Verformung gibt es keinen Unterschied, daher trägt nur die Adhäsion zum Energieverlust bei.

2. Experimenteller Teil

Geräte und Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von der Firma VWR bezogen, falls nicht anders angegeben. Bovines Serum Albumin bzw. fluoreszenzmarkiertes Albumin wurde von Sigma-Aldrich erworben.

AFM Messungen wurden auf einem Gerät der Firma Bruker, dem Nanoscope Iva bzw. nach erfolgtem Upgrade auf dem Nanoscope VIII durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware Nanoscope Analysis 1.5.

Die Resonanzfrequenz der Quarze wurde mittels eines Agilent 8712ET Netzwerkanalysators bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden mittels Excel ausgewertet und verglichen.

Quarzmessungen wurden in einer eigens entwickelten Messapparatur durchgeführt, der Aufbau wird später in 2.2 genauer beschrieben, die Auswertung erfolgte mittels Agilent 53220A Frequenzzähler

IR Spektren wurden mithilfe eines Perkin Elmer Spectrum 100 IR Spektrometers aufgenommen die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Freeware Programmes Spekwin 32⁹⁴.

Herstellung von BSA-MIP QCM Sensoren

2.1. Herstellung der Quarzmikrowaagen

2.1.1. Siebdruckverfahren

Die Auswahl des richtigen massensensitiven Sensors spielt bei praktischen Überlegungen eine große Rolle. Theoretisch sollte das Signal mit der Resonanzfrequenz parabolisch steigen, praktisch sieht man zwischen 10 MHz Quarz und 433 MHz SAW eine vierzigfache Steigerung des Signals in Gasphase, wie von Dickert et. al. beschrieben⁹⁵. Die Steigerung der Grundfrequenz liefert daher ein größeres Messsignal⁹⁶. Daher wäre ein SAW Sensor mit einer hohen Resonanzfrequenz am besten für massensensitive Sensoren geeignet. Dieser hat aber in der praktischen Handhabung erhebliche Nachteile. Durch die höhere Frequenz ist eine strengere Kontrollregulierung der Oszillatorschaltung notwendig. Des Weiteren bewegt sich die akustische Welle entlang der Oberfläche, daher sind nur sehr dünne Filme möglich. QCM sind praktisch einfacher in der Handhabung und wurden daher in dieser Arbeit verwendet. Quarzplättchen mit 168 µm Dicke (das entspricht einer Resonanzfrequenz von 10 MHz) wurden kommerziell erworben. Quarze mit höherer Frequenz sind dünner und brechen leichter bei mechanischer Belastung. Um die 10 MHz QCM für Messungen zu verwenden, muss auf diese zuerst eine Elektrodenstruktur aufgebracht werden. Diese Goldelektroden können mittels Siebdruckverfahren realisiert werden. Die hierzu benötigten Siebe werden photolithographisch hergestellt. Zuerst wird ein Drucksieb mit einer Maschenbreite von 21 µm auf einem Metallrahmen mittels Superkleber möglichst straff fixiert. Dieses Sieb wird mit Photolack (Azocol Poly-Plus S von KIWO) möglichst dünn beschichtet und eine Stunde unter Lichtausschluss gelagert. Die gewünschte Elektrodenvolage wird auf eine UV-durchlässige Folie gedruckt und mittels Klebeband auf einen UV Belichtungstisch fixiert. Zur besseren Abdeckung sollten mehrere Elektrodendesigns übereinander geklebt werden. Das beschichtete Sieb

wird zentral über die Vorlage gelegt und 30 Sekunden mit UV-Licht belichtet. An jenen Stellen, die nicht durch die Vorlage abgeschirmt werden, härtet der Photolack aus. Wäscht man das vom Lack bedeckte Material anschließend mit warmem Wasser, löst sich der nicht ausgehärtete Lack, zurück bleibt die Elektrodenstruktur in Form der gewünschten Vorlage. Die verwendeten Siebe für die Vorder- und Rückseite der Quarzmikrowaagen, sowie bereits im Ofen gebrannte Goldelektroden sind in Abb. [11] dargestellt.

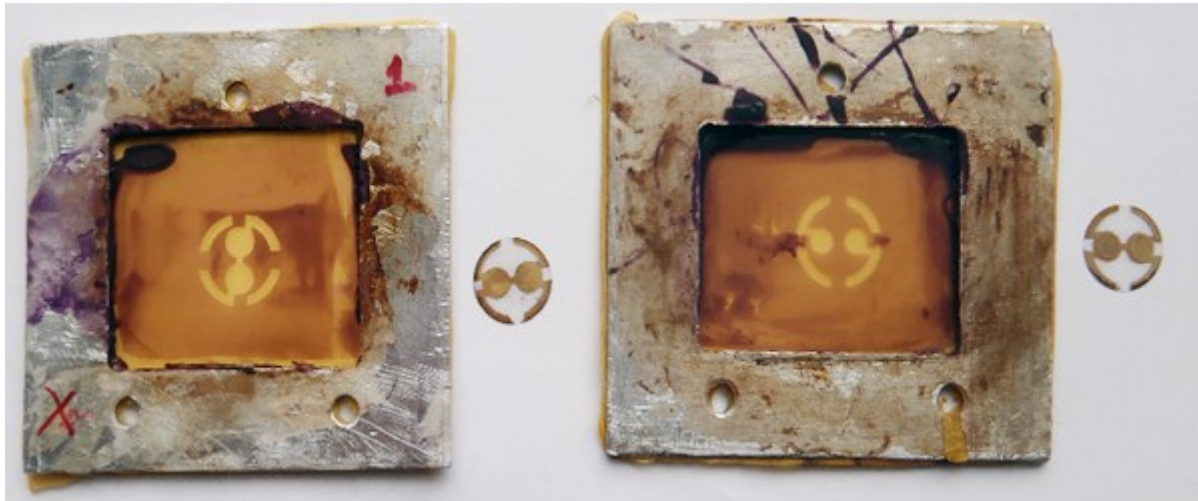


Abbildung 11: Siebe für vorder- (rechts) und rückseitige Elektroden (links). Daneben mittels Siebdruckverfahren aufgetragene vorder- (rechts) und rückseitige Elektroden (links), die bereits im Ofen gebrannt wurden

Als „Druckfarbe“ für die Elektrodenstrukturen diente eine Glanzgoldpaste der Firma Heraeus (GGP 2093 12%) , die normalerweise in der Glas- und Porzellanindustrie zum Einsatz kommt. Ein schematischer Aufbau des Siebruckverfahrens ist in Abb. [12] dargestellt.

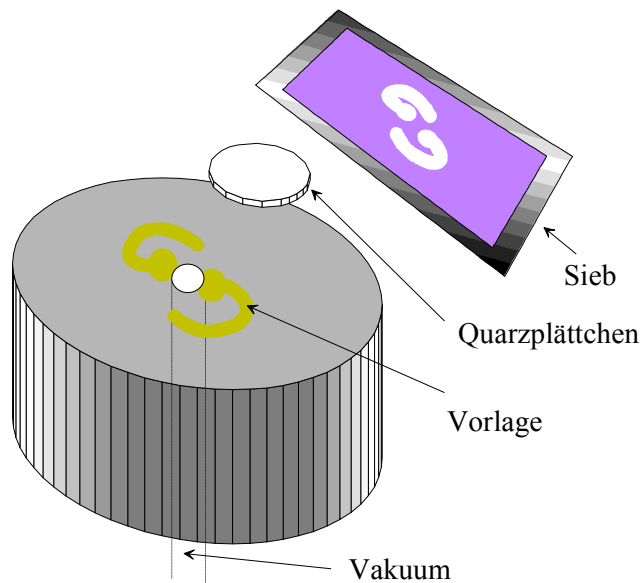


Abbildung 12: schematische Darstellung des Siebdruckverfahrens

Die Goldpaste besteht aus kolloidalem Gold in einer Leimölmatrix. Bevor mit der Beschichtung begonnen werden kann, wird zuerst eine Klebefolie auf einen Teflonblock, welcher einen Anschluss an eine Vakuumpumpe besitzt, fixiert. Auf diese wird das Sieb gelegt und mit der Goldpaste ein Abdruck der Elektroden auf die Folie angefertigt. Über diese Auftragung wird eine weitere Klebefolie geklebt. Die Fixierung der Quarze erfolgt durch Anlegung eines Vakuums. Anschließend kann das gewünschte Elektrodendesign auf einer Seite des Quarzes aufgetragen werden. Die Quarze werden bei 400°C 4h in einem Ofen gebrannt, durch diesen Vorgang pyrolysiert die organische Matrix, zurück bleibt die gewünschte Elektrodenstruktur. Diese Prozedur wird auf der Rückseite mit der entsprechenden Vorlage wiederholt, die so erhaltenen Quarzmikrowaagen können zur Beschichtung mit geprägtem Polymer verwendet werden, so erhaltene Quarze sind ebenfalls in Abb. [11] dargestellt.

2.1.2. Elektrodendesign

Auf beide Seiten des 168µm dicken Quarzplättchens mit einem Durchmesser von 13,8 mm werden Goldelektroden mittels Siebdruckverfahren aufgetragen. Die Elektroden auf der Oberseite besitzen einen Durchmesser von fünf Millimeter, diese beiden Elektroden werden aufgrund des höheren Durchmessers als Messbeziehungsweise Referenzelektrode verwendet und daher der jeweiligen Probelösung in der Messzelle ausgesetzt. Die Elektroden auf der „Rückseite“ besitzen einen Durchmesser von je drei Millimetern⁹⁷. Die Unterseite der Elektrode ist über Kupferdrähte in der Gasphase mit der Oszillatorschaltung verbunden, auf die Oberseite des Quarzes mit den größeren Elektroden werden auf diese mittels spin-coating MIP und NIP aufgetragen. So entsteht eine unabhängige Mess- und Referenzelektrode. Diese Zweielektrodenteknik hat den großen Vorteil, dass die chemische Zusammensetzung, Temperatur und Viskosität der Messlösung zu jeder Zeit an der Mess- und Referenzelektrode ident sind. Dadurch können Messfehler durch oben genannte Effekte ausgeschlossen werden. Im Gegensatz hierzu ist die Einelektrodenteknik elektronisch leichter zu handhaben. Bei zwei Elektroden kann es zur Beeinflussung der Resonanzfrequenz der zweiten Elektrode durch die erste kommen. Ebenfalls können die zwei Resonanzfrequenzen sich überlappen, wenn der Frequenzunterschied zwischen den beiden Elektroden nicht groß genug ist. Um das sogenannte „Übersprechen“ der Resonanzfrequenzen zu verhindern, wird immer die Elektrode mit der geringeren Resonanzfrequenz mit MIP beschichtet, da bei diesem ein größeres Signal erwartet wird. Kommt es zu einem Signal, wird also der Unterschied zwischen den beiden Resonanzfrequenzen immer größer.

2.2. Aufbau der Messapparatur

Der hergestellte Quarz wird auf den Boden einer selbstgebauten Messzelle gelegt, der Deckel und Boden dieser Messzelle werden aus PDMS hergestellt, wie später beschrieben. Zur besseren Darstellung ist die Messzelle sowie ihre Bestandteile in Abb. [13] dargestellt.

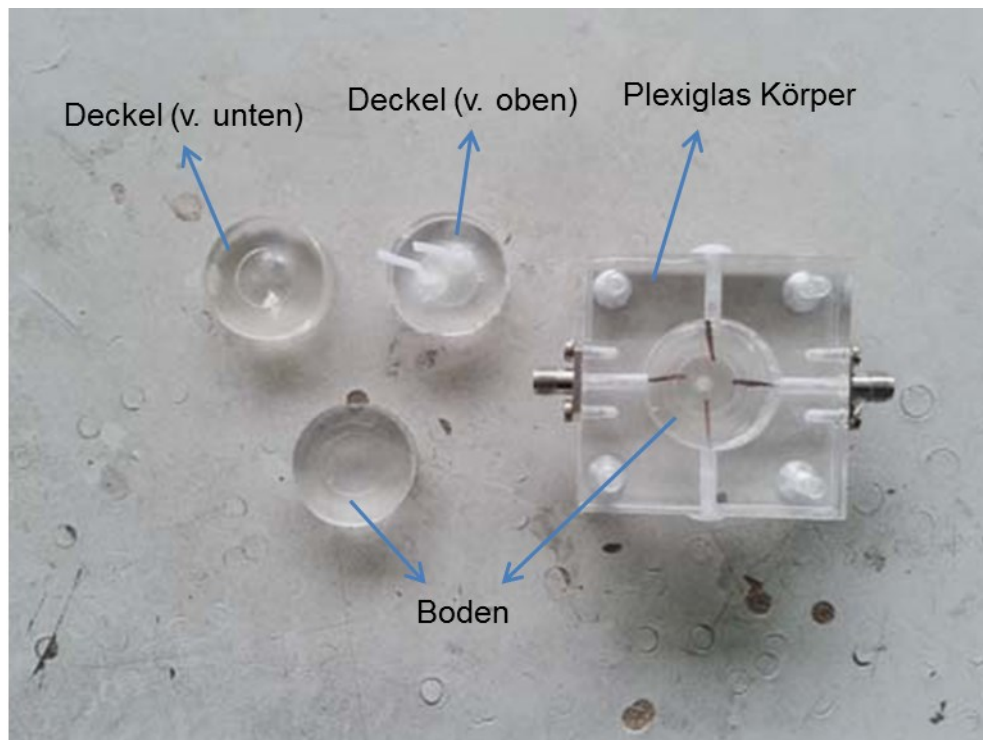


Abbildung 13: Messzelle und deren Bestandteile

Diese Messkammer befindet sich in einer Plexiglashalterung. Die Kontaktierung der Elektroden erfolgt an der Quarzunterseite über mit einem Hammer möglichst dünn geklopfte Kupferdrähte, die an die entsprechenden Kontaktstellen gelötet werden müssen. Auf den Quarz wird der Deckel mittels einer Plexiglasplatte gedrückt und schließt so dicht ab. Über dem Quarz befindet sich ein kleiner Hohlraum in den über Teflonschläuche Flüssigkeit eingeleitet werden kann. Die Messzelle wird über die Kontaktstellen mit der Oszillatorschaltung verbunden, die erhaltenen Resonanzfrequenzen werden mittels Agilent 53320A Frequenzzähler am Computer mit einer Software ausgelesen. Der Aufbau der Messanordnung ist in Abb. [14] dargestellt.

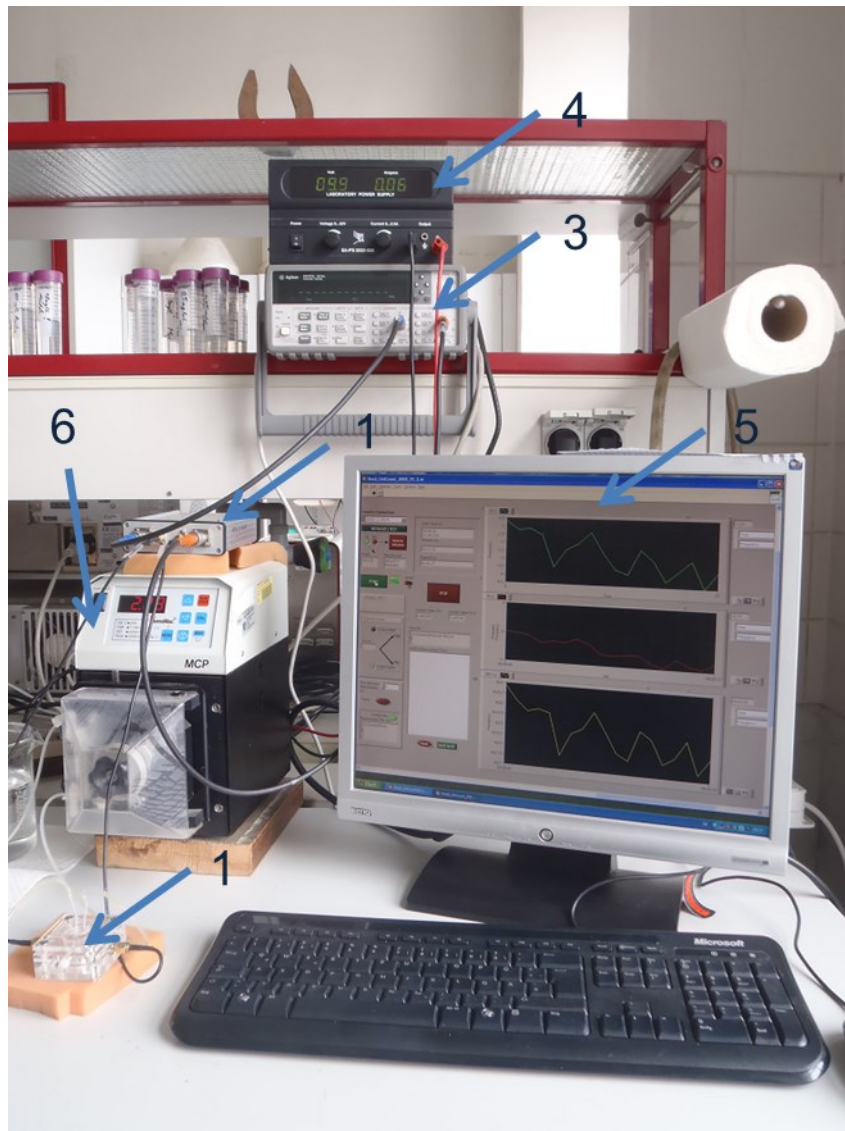


Abbildung 14: Aufbau der Messapparatur: 1 Messzelle; 2 Oszillatorschaltung; 3 Frequenzzähler; 4 Netzteil; 5 Computer; 6 Pumpe

Zur Herstellung des PDMS Messzelleninnenraums wird ein Silikon Elastomer Kit der Firma Silgard im Verhältnis 1:20 Starter zu Silikon gemischt und die Lösung im Vakuum entgast. Nach ungefähr einer halben Stunde sollten keine Luftbläschen sichtbar sein. Diese Mischung ist ungefähr zwei Tage bei 4°C haltbar. Die Reaktionslösung wird in Messingformen für Deckel und Boden der Messzelle gegossen, nach 48h ist das PDMS ausgehärtet. In den Deckel werden mit einer spitzen Nadel zwei Löcher gestochen, durch die zwei Teflonschläuche für den Zu- und Abfluss der Messlösung gesteckt werden. Um die Löcher abzudichten, wird sicherheitshalber an deren Rand auf dem Deckel mit PDMS Lösung nachgebessert. Aus dieser Messzelle sollte während laufenden Betriebs an einer Peristaltikpumpe

keine Flüssigkeit entweichen, dies muss vor den Messungen unbedingt überprüft werden.

2.3. Synthese des molekular geprägten Polymers

Zur Herstellung von Molekular geprägten Polymeren (MIP) gibt es verschiedene Ansätze, die je nach Anwendung zum Einsatz kommen können⁹⁸. In dieser Arbeit soll das Polymer auf eine Goldelektrode aufgetragen werden, hierzu wird zuerst ein Vorpolymer hergestellt, welches auf die Goldoberfläche aufgetragen wird. Die Auswahl des Polymers spielt hierbei eine wichtige Rolle. Als Polymersystem für BSA wurden Acrylate gewählt, einerseits da bereits Systeme für HPLC auf Acrylatbasis entwickelt wurden, andererseits zeigten Messungen bei Sensoren für Melamin, die auf ein Acrylatsystem mit Methacrylsäure (MAA) als funktionellem Monomer basieren, merkliche Kreuzselektivität auf BSA⁹⁹. Dies kann durch die starke Hydrophilie des Acrylats erklärt werden. Daher wurde ein bereits in der Literatur¹⁰⁰ beschriebenes Polymer, indem Methacrylsäure (MAA) und N-3-Dimethylaminopropylmethacrylat als funktionelle Monomere sowie *N,N'*-(1,2-Dihydroxyethylene)bisacrylamide (DHEBA) als Quervernetzer, für die Anwendung auf Quarzmikrowaagen optimiert. Die einzelnen Strukturformeln, sowie die R- und S-Sätze sind in Tabelle [1] dargestellt.

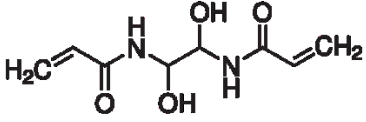
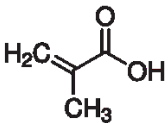
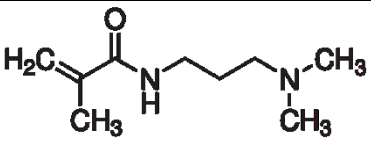
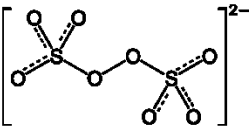
<i>N,N'</i> -(1,2-Dihydroxyethylene) bisacrylamide		R 20;21;22;36;37;38 S 26;36
Methacrylsäure		R 21;22;35 S 26;36;37;39;45
N-3-Dimethylamino- propylmethacrylamid		R 41;43 S 26;36;37;39
Natriumperoxidisulfat		R 8;22;36;37;38;42;43 S 22;24;26;37;45

Tabelle 1: Strukturformeln der einzelnen Polymerbestandteile, sowie R- und S- Sätze

Zur Optimierung für die Anwendung auf QCM wurde der Anteil des DHEBA auf 50 % (n/n) erhöht, um ein stärker vernetztes Polymer zu erhalten. Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben dient das funktionelle Monomer zur chemischen Erkennung des Analyten, während man mit dem Quervernetzer die Härte des Polymers beeinflussen kann. Als wasserlöslicher Radikalstarter wurde Natriumperoxidisulfat gewählt. Um Fehler bei der Einwaage des Radikalstarters zu vermeiden, wurden 50ml einer 2mg/ml Lösung in Wasser hergestellt. Die Zusammensetzung des Polymers spielt eine wichtige Rolle in der molekularen Erkennung. Durch Optimierung der einzelnen Bestandteile können die Eigenschaften des Systems beeinflusst werden. Das verwendete Polymerrezept, normiert auf 1ml Lösungsmittel, ist in der nachfolgenden Tabelle [2] aufgeführt.

Menge	Stoffbezeichnung	Molprozent
20mg	<i>N,N'</i> -(1,2-Dihydroxyethylene)bisacrylamide	50
4mg	Methacrylsäure	25
8mg	N-3-Dimethylaminopropylmethacrylamid	25
1ml 2mg/ml	Natriumperoxidisulfat	---

Tabelle 2: Zusammensetzung des Polymers

Die generelle Synthese des Polymers wurde wie folgt durchgeführt. 60 mg DHEBA, 12 mg MAA und 24mg N-3-Dimethylaminopropylmethacrylamid (N-3-DPMA) werden in einem 15 ml Plastikzentrifugenröhrchen mit Magnetrührkern vorgelegt. Zu dieser Mischung werden 3 ml der Radikalstarterlösung hinzugegeben. Diese Mischung wird unter Rühren bei 70°C in einen Wasserbad vorpolymerisiert. Das bedeutet, dass die Polymerisation bei Erreichen des Gelpunkts abgebrochen wird. Ist der Gelpunkt erreicht, wird die farblose Reaktionsmischung weiß, die Oligomerlösung wird aus dem Wasserbad entfernt. Durchschnittlich wird der Gelpunkt zwischen 7-8 Minuten erreicht. Zur Auftragung wird eine bestimmte Menge vorpolymerisierte Oligomerlösung auf beide Elektroden aufgebracht und anschließend bei einer bestimmten Drehzahl eine kontrollierte Zeit gespinnt, dadurch verteilt sich das Polymer gleichmäßig auf der Oberfläche. Bei Polymeren auf Wasserbasis sind sehr hohe Drehzahlen nicht zu empfehlen, da bei ca. 2500 RPM (rotations per minutes) der Wassertropfen einfach abgeschleudert wird und kaum Polymer auf der Oberfläche zurückbleibt. Bei den Versuchen wurden immer 10 µl der vorpolymerisierten Lösung auf die Elektroden aufgebracht und bei 2000 RPM drei Sekunden über die Oberfläche verteilt. Nach 48 Stunden ist das Polymer schließlich fest und kann für die Messungen verwendet werden. Je nach Polymerisationsmethode wird in einem Schritt der Analyt in das Polymer eingebracht, als Vergleichspunkt wird immer ein Polymer ohne Templat hergestellt und dient als Referenzmaterial. Dieses nicht geprägte Polymer (NIP) wird genau wie das geprägte Polymer synthetisiert und gleichzeitig aufgetragen. Ein Nachteil von Acrylaten ist ihre Basenempfindlichkeit, wie Abb. [15] zeigt. Der Quervernetzer kann basisch zersetzt werden, das Polymer wird zerstört, dabei entsteht eine gelbliche Flüssigkeit.

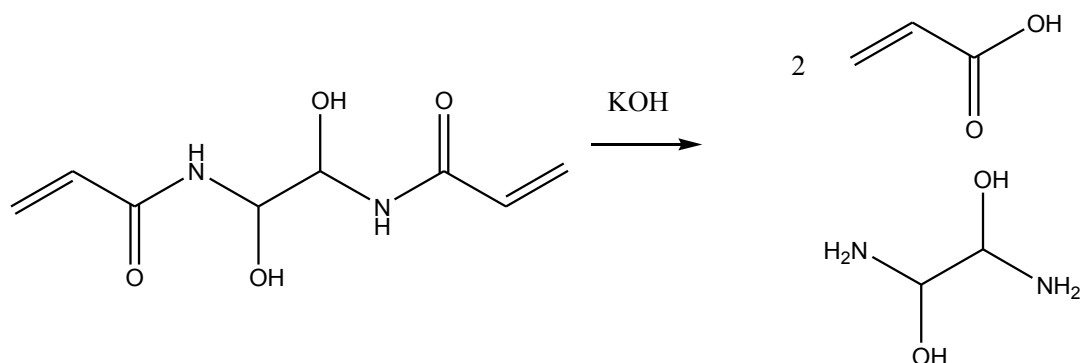


Abbildung 15: Zersetzung des Quervernetzers unter stark basischen Bedingungen

Die Auswahl der Prägemethode kann auch einen Einfluss auf das Ergebnis haben, im Zuge dieser Arbeit wurden mehrere verschiedene Methoden getestet und entwickelt. Prinzipiell wäre es auch möglich eine Volumenprägung mit BSA durchzuführen. Hierzu wurde ein Versuch mit dem Polymerrezept angesetzt, für den MIP wurde die Radikalstarterlösung jedoch modifiziert. Während beim NIP die Standardlösung genommen wurde, befand sich beim MIP zusätzlich zum Radikalstarter 1 mg/ml BSA in der Lösung. Eine weitere Modifikation betraf die Temperatur, da BSA bei 60°C denaturiert. Aufgrund dessen wurde eine Polymerisationstemperatur von 50°C gewählt. Hier wurde jedoch der Gelpunkt selbst nach 4 Stunden nicht erreicht, der Versuch wurde daher abgebrochen.

2.3.1. Stempel- und Sedimentationsmethode

Aufgrund der vorhersehbaren Limitierungen der Volumenprägung wurden weitere Prägemethoden angewendet. Die Stempeltechnik wurde bereits im Theorieteil kurz erläutert. Hierfür wird, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, der Polymeransatz in 3ml Radikalstarterlösung vorgelegt und bei 70°C polymerisiert, bis der Gelpunkt erreicht wird. Auf beide Elektroden werden 10 µL der Oligomerlösung aufgetragen und 3 Sekunden bei 2000 RPM mittels spin-coating verteilt. Auf einem Glasstempel mit 5 mm Kantenlänge wurden 5 µL 100 mg/ml BSA-Lösung aufgebracht und anschließend gewartet, bis das Wasser fast bis zur Trockenheit verdampft. Anschließend wird der Stempel mit dem Protein auf das Polymer gedrückt und mit

einer Klemme fixiert. Bei der Referenzelektrode wird hingegen kein Stempel aufgebracht. Das Polymer lässt man anschließend 48h bei Raumtemperatur aushärten. Die Quarze werden anschließend eine Stunde in Wasser gelegt, dabei löst sich der Glasstempel von selbst von der Polymeroberfläche ab.

Als alternative Methode zur Stempeltechnik wurde die sogenannte Sedimentationstechnik verwendet. Bei dieser Technik wird das Polymer, wie vorhin beschrieben, vorpolymerisiert und auf die Elektroden aufgetragen. Bei einer Elektrode die schließlich als MIP fungiert, wird anschließend 1µl einer 100mg/ml BSA-Lösung auf das Polymer getropft und weitere zwei Sekunden bei 2000 RPM über die Messelektrode verteilt. Um den Sedimentationseffekt zu verstärken, wird auf die Messelektrode ein leerer PDMS Stempel mit einer Klemme fixiert. Als Referenzsystem wird das gleiche Polymer verwendet, jedoch wird auf dieses keine Lösung aufgetragen. Nach dem Aushärten legt man den Quarz wieder eine Stunde in Wasser, um den Stempel sanft zu entfernen.

2.3.2. Selbstorganisierte Volumenprägung

Im Rahmen dieser Arbeit kam es zur Entwicklung einer neuen Prägemethode, die sogenannte selbstorganisierte Volumenprägung (So-VP), beschrieben in Kapitel 1.2.3.2. Diese funktioniert ähnlich der Volumenprägung, jedoch wird bei der Vorpolymerisation kein Templat hinzugegeben. Eine ähnliche Methode wird von Norbet L. et. al. beschrieben¹⁰¹. Die Autoren fügen das Templat ihrem Polymeransatz erst nach der Vorpolymerisation zu, da es sonst selber polymerisieren würde und daher in der Polymerstruktur gebunden ist. Bis jetzt wurde diese Methode nicht für Proteine eingesetzt. Um eine geprägte Polymermischung herzustellen, werden 60 mg DHEBA; 12 mg MAA und 24 mg N-3-DPMA in 2,7 ml in 2 mg/ml Radikalstarterlösung bei 70°C vorpolymerisiert, dies stellt eine leichte Modifikation des ursprünglichen Rezeptes dar. Anschließend lässt man die Lösung dreißig Minuten abkühlen, hat die Oligomerlösung Raumtemperatur erreicht, gibt man zu 900 µl des Vorpolymers 100 µl einer 20 mg/ml BSA Lösung hinzu und lässt diese 30 Minuten stehen, damit sich das funktionelle Monomer an die Bindungsstellen des Polymers anordnen kann. Zur Herstellung des NIP werden ebenfalls 900 µl des

Oligomergemisches vorgelegt und 100 µl Wasser hinzugegeben, es wird ebenfalls 30 Minuten stehen gelassen. Danach werden beide Polymere bei 2000 RPM drei Sekunden mittels spin-coating aufgetragen und 48 Stunden bei Raumtemperatur gelagert, um eine vollständige Härtung des Polymers zu gewährleisten.

2.3.2.1. Kontrollpolymer

Um die Prägemethode weiter zu charakterisieren, wurde ein weiteres Polymer nach einem modifiziertem Rezept analog Tabelle [3] hergestellt. Mit diesem soll gezeigt werden, dass die Prägemethode auch auf andere Polymere beziehungsweise Polymersysteme anwendbar ist.

Menge	Stoffbezeichnung	Molprozent
25mg	<i>N,N'</i> -(1,2-Dihydroxyethylene)bisacrylamide	50
6mg	4-Vinylpyrrolidon	35
4mg	Acrylsäure	15
2mg/ml	Natriumperoxidisulfat	---

Tabelle 3: Zusammensetzung des Kontrollpolymersystems

Außerdem kann mit einem zweiten Polymerrezept die erfolgreiche molekulare Prägung bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde ein weiteres Acrylatsystem gewählt. DHEBA fungiert immer noch als Quervernetzer, als funktionelle Gruppen wurden jedoch Vinylpyrrolidon und Acrylsäure verwendet. Als Radikalstarter wurde wie beim Standardpolymer Natriumperoxidisulfat als 2mg/ml Lösung verwendet. Zur Herstellung wurden 50 mg DHEBA, 12mg Acrylsäure und 18 mg Vinylpyrrolidon vorgelegt und 3 ml Radikalstarterlösung hinzugefügt. Das Polymer wurde nach So-VP Methode hergestellt und mittels spin-coating auf die Quarze aufgetragen. Danach wurden die Schichten zwei Tage bei Raumtemperatur ausgehärtet.

2.3.3. Darstellung von Polymernanopartikeln

Mittels selbstorganisierter Volumenprägung ist es auch möglich, geprägte Nanopartikel herzustellen. Zu diesem Zweck wurde ein Vorpolymer nach So-VP Methode hergestellt. Die Herstellung der Nanopartikel ist in Abb. [16] schematisch dargestellt.

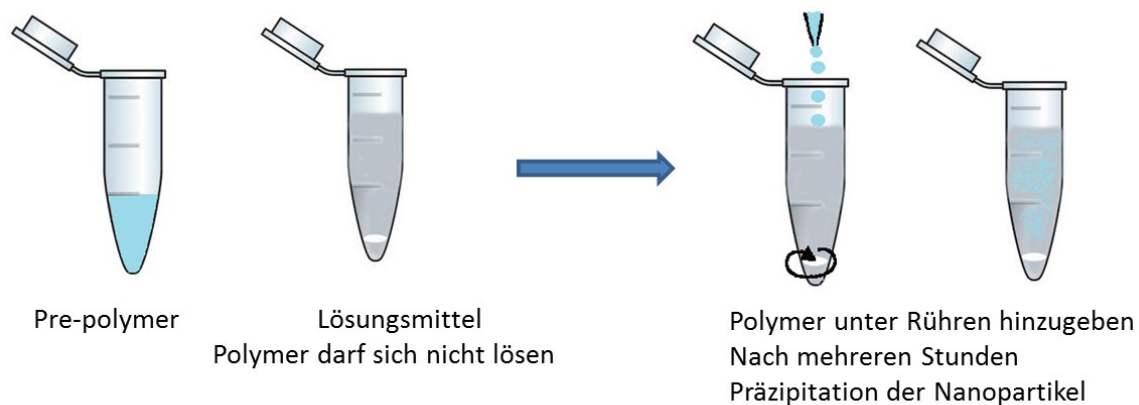


Abbildung 16: Schematische Abbildung: Fällung von Polymernanopartikeln¹⁰²

Anstatt die Lösung aufzutragen, wurde zu der Oligomerlösung 10 ml Acetonitril hinzugefügt und die Lösung 48 Stunden mittels Magnetrührers gerührt. Hierbei kommt es zur Ausbildung von Nanopartikeln. Nach Abschluss dieses Prozesses werden die NP bei 4000 RPM vier Minuten abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wird entfernt und die Nanopartikel in einen halben Milliliter Acetonitril aufgenommen. Da die Nanopartikel dabei nicht vollständig suspendieren, wird die Lösung für 20 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Diese konzentrierte Nanopartikellösung kann als funktionelle Schicht für massensensitive Sensoren dienen, indem man 10 µl der Lösungen auf die Elektroden aufträgt.

2.3.4. Bestimmung der Polymereigenschaften

Der Gelpunkt ist schwer reproduzierbar zu erreichen, daher wäre auch ein quantifizierbares Maß wünschenswert. Bei Polyurethan ist dies möglich, hier wird der Gelpunkt anhand der Abnahme der Isocyanatbande mittels FT-IR bestimmt¹⁰³. In einer analogen Strategie wurde der Reaktionsverlauf des Acrylats mittels IR verfolgt. Hierzu wurde ein Infrarotspektrum der Reaktionsmischung (Abb. [17]) bei verschiedenen Polymerisationszeiten mittels Totalreflexion-Infrarot (ATR-IR) aufgenommen. Zwischen den Messungen wurde die Oberfläche mittels Aceton gewaschen, die Acetonpeaks sind im Spektrum zwischen 1400 und 1200 cm^{-1} sichtbar und sind nicht Bestandteile des Polymersystems.

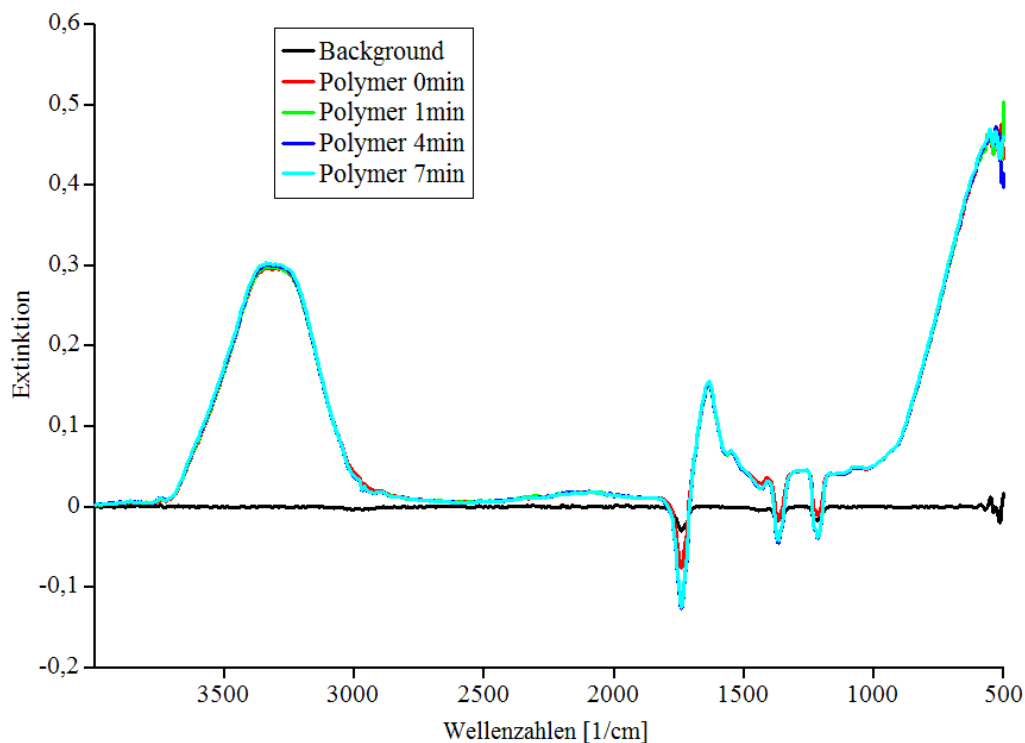


Abbildung 17: Aufnahme des Polymersystems bei verschiedenen Polymerisationszeiten.

Nach siebeneinhalb Minuten bildeten sich in der Lösung bereits Polymerklumpen aus, es war daher nach sieben Minuten keine vernünftige Messung mehr möglich. Bei 3500-3000 cm^{-1} sieht man die Banden der Hydroxy- und Aminogruppen, diese

nehmen aber während des Reaktionsverlaufes nicht zu oder ab. Die C=C-Bande und die aliphatischen CH₂-Banden sind anscheinend nicht intensiv genug, um einen statistisch signifikanten Unterschied erkennen zu können. Es ist daher leider nicht möglich, den Gelpunkt mittels FT-IR zu bestimmen.

Die Schichtdicke und Qualität der Prägung kann am Netzwerkanalysator überprüft werden. Wird eine Polymerschicht aufgetragen, kommt es zu einer Änderung der Resonanzfrequenz des Quarzes. Nach dem Prägen kommt es erwartungsgemäß zu einer Erniedrigung der Resonanzfrequenz, dieses Verhalten ist in Abb. [18] dargestellt.

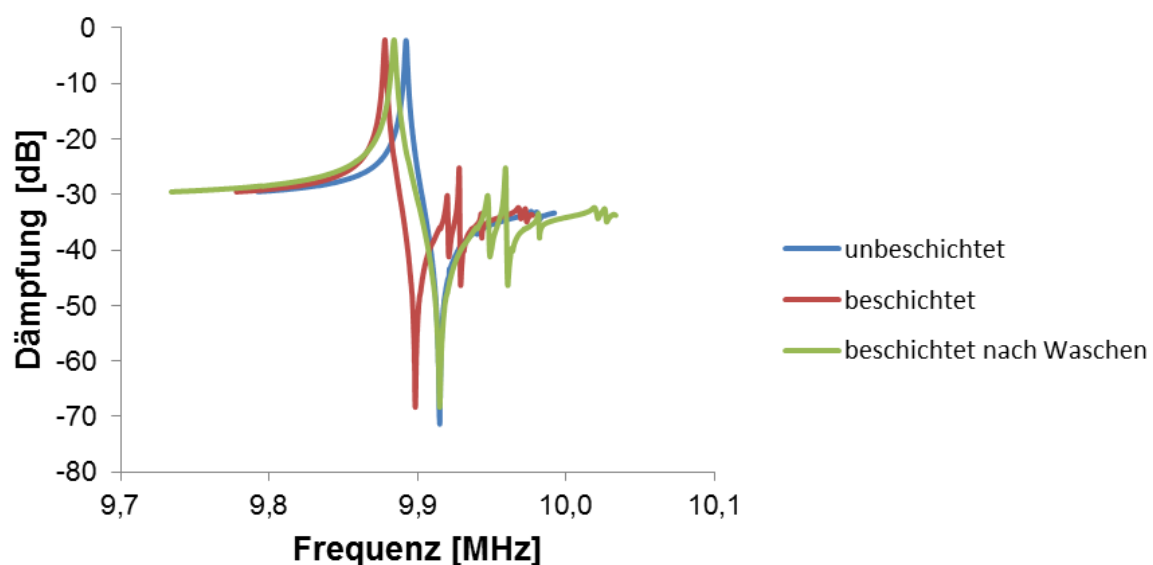


Abbildung 18: Resonanzfrequenzen eines Schwingquarzes; MIP: Elektrode: blau: unbeschichtet; rot: nach beschichtung; grün: nach Waschen

Hier kommt es bei der MIP Elektrode nach der Prägung zu einer Frequenzerniedrigung, jedoch nach einem Waschschrift wieder zu einer signifikanten Frequenzerhöhung. Dieses Phänomen lässt sich durch das Auswaschen des Analyten aus dem Polymer erklären. Bei NIP kommt es zwar zu einer Frequenzänderung, nach dem Waschen zeigte sich jedoch kein signifikanter Frequenzunterschied. In Tab. [4] sind die Werte zusammengefasst.

MIP		
	Frequenz [MHz]	[dB]
unbeschichtet	9,892245461	-2,26
beschichtet	9,878049539	-2,15
nach Waschen	9,885365512	-2,55
NIP		
	Frequenz [MHz]	
unbeschichtet	9,898499461	-1,76
beschichtet	9,892621539	-2,56
nach Waschen	9,895403191	-2,21

Tabelle 4: Eigenresonanzfrequenzen eines Schwingquarzes nach verschiedenen Stadien der Schichtherstellung

Nach Sauerbrey lässt sich die Schichtdicke des Polymers aus der Frequenzänderung berechnen, 1000Hz entsprechen hierbei bei einer Dichte von 1 g/ml 40 nm. Aus der Frequenzdifferenz zwischen Goldoberfläche und beschichteter Oberfläche nach Waschen ergibt sich eine Schichtdicke von 275 nm für den MIP sowie 235 nm für den NIP. Die hergestellten Polymere weisen generell eine Schichtdicke von durchschnittlich 250 nm auf. Schichtdicken können auch mittels Rasterkraftmikroskopie bestimmt werden, wie in Abb. [19] dargestellt.

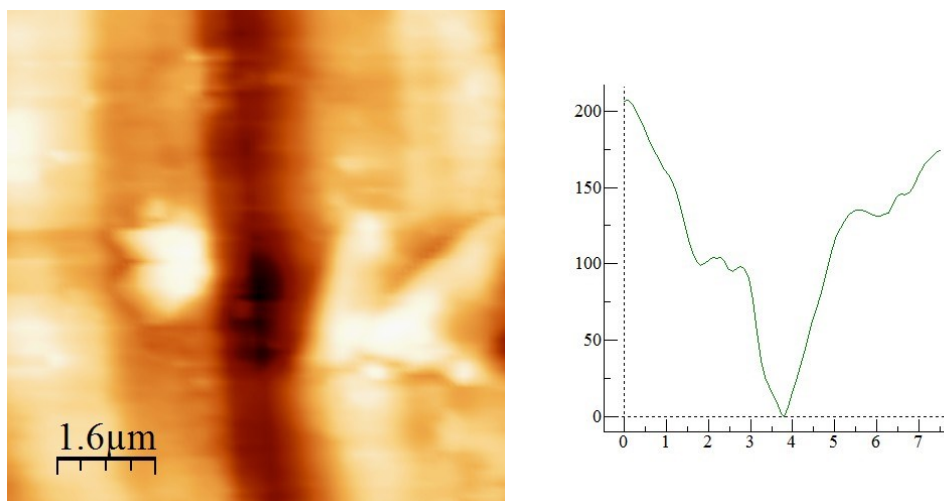


Abbildung 19: Höhenprofil einer Schichtdickenmessung, Vertikale Distanz von 227nm

Hierzu wird mittels einer Rasierklinge ein Spalt in das Polymer geritzt. Diese Spalttiefe entspricht dann der Höhendifferenz zwischen Goldelektrode und Polymeroberfläche. Es zeigte sich, dass die Schichtdicke gut mit den am Netzwerkanalysator gemessenen Schichtdicken korrelierte. Rasterkraftmikroskopie eignet sich außerdem für die Darstellung der Oberflächentopographie, das hergestellte So-VP geprägte Polymer (So-VP-MIP) wurde daher im Rasterkraftmikroskop auf Kavitäten untersucht, wie in Abb. [20] dargestellt.

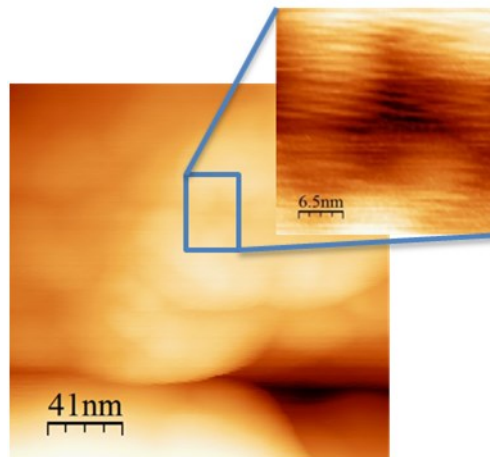


Abbildung 20: Oberfläche des molekular geprägten Polymers, gemessen mittels tapping mode

Es kann kein direkter Beweis für Kavitäten gefunden werden, dennoch deuten kleine Hohlräume auf deren Bildung hin. Wie im Ausschnitt gezeigt, können Vertiefungen im Polymer gefunden werden, deren Dimensionen dem Analyten entsprechen. Aufgrund der Rauheit des Polymers lässt dennoch sich nicht klar definieren, ob es sich um Kavitäten handelt oder nicht. Mit dem Siebdruckverfahren ist es möglich Oberflächen mit einer Rauheit in der Größenordnung von 10 nm herzustellen. Das Polymer verstärkt das Phänomen, es entsteht eine Oberfläche mit einer Rauheit von 20nm, in der es sehr schwierig ist, Kavitäten der Größe eines Proteins aufzulösen. Ein Vergleich zum nicht geprägten Polymer ist bei solch kleinen Arealen kaum möglich, da es sich aufgrund der rauen Oberflächenstruktur des Polymers um Messartefakte handeln könnte.

2.4. Einschwingen der Quarzmikrowaage

Nachdem der Quarz in der Messzelle fixiert und diese verschlossen wurde wird durch eine Pumpe ein konstanter Wasserfluss von 0,45 ml/min durch die Messzelle gespült. Eine Erhöhung der Pumpengeschwindigkeit wirkt sich insofern auf die Messung aus, als das Rauschen größer wird. Quarzmikrowaagen sind gemäß der Sauerbrey Gleichung empfindlich auf Masse sowie auf Dichteänderungen. Daher kommt es beim Spülen der Messzelle mit Wasser zu einer Frequenzänderung. In Abb. [21] ist das Einschwingen eines QCM-Sensors dargestellt.

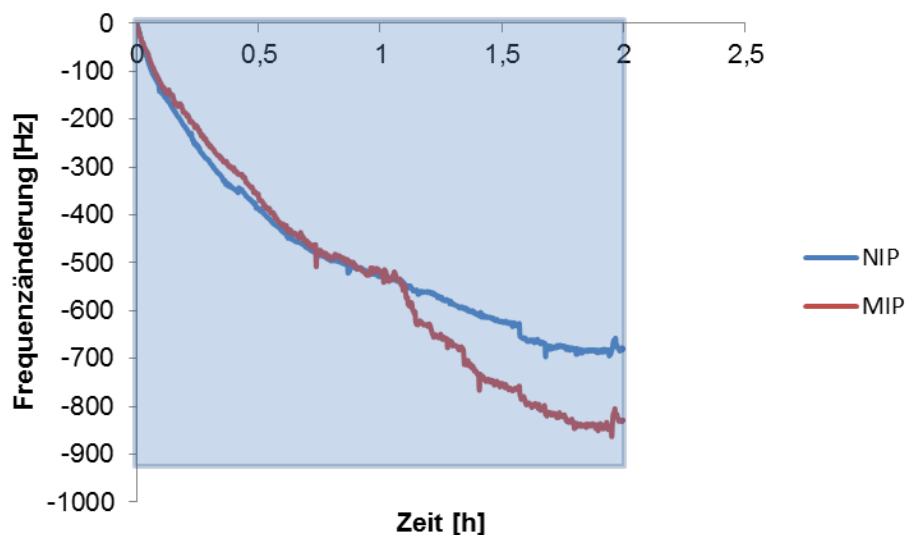


Abbildung 21: Einschwingen eines beschichteten Quarzmikrowaagensensors, So-VP MIP und NIP zeigen geringe Unterschiede in der Frequenzabnahme. Rot: MIP; Blau: NIP

Dieser Drift kann sich über mehrere Stunden erstrecken, bis die Frequenz schließlich konstant wird. Diese Zeit muss abgewartet werden, bevor eine Messung gestartet werden kann. Grund für diese Frequenzänderung ist das Aufquellen des Polymers durch den Kontakt mit Wasser. Es lagert also Wassermoleküle ein, wodurch es zu einer Massebeladung und Änderung der viskoelastischen Eigenschaften der Schicht kommt. Des Weiteren können die Wassermoleküle mit der Sensorschicht Wechselwirken und van-der-Waals Wechselwirkungen oder

Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Durch die Prägung des MIP Sensors und die dadurch entstandene höhere Oberfläche ist der Drift auf der Messelektrode etwas größer als auf der Referenzelektrode, außerdem beeinflusst die Schichtdicke das Signal. Es kann beim Auftragen des Polymers zu leichten Schichtdickenunterschieden zwischen den beiden Elektroden kommen. Sind die Analytmoleküle noch nicht vollständig aus den Kavitäten entfernt, kann häufig auch Anti-Sauerbrey-Verhalten des Sensors beobachtet werden, d.h. es kommt zu einer Frequenzsteigerung. Sobald das Plateau erreicht wurde, kann mit der Aufnahme der Basislinie begonnen werden, diese sollte dann konstant sein. Falls es zu einem starken Frequenzabfall kommt, muss länger gewartet werden. Die Basislinie sollte sich in einer Stunde um nicht mehr als 10-30 Hz ändern, dann kann sie als konstant betrachtet werden. Bei der Messung wird diese Grundlinie als Nullpunkt angesehen. Kommt es zu einem dauernden Frequenzabfall von mehreren tausend Herz, ist dies meist auf eine fehlerhafte Konfiguration der Oszillatorschaltung oder auf eine schlechte Kontaktierung des Quarzes in der Messzelle zurückzuführen.

2.5. Herstellung der Waschlösungen – Waschschritte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Waschlösungen verwendet, da es nicht möglich war, das Bovine Serum Albumin (BSA) mittels Wasser aus dem Polymer zu entfernen. Während der Waschschritte mit den unten beschriebenen Waschlösungen wurde die Messung pausiert, da es während des Waschschrittes zu einer Frequenzänderung von mehreren tausend Herz kommt. Daher wäre die graphische Darstellung sehr schwierig, da sich die Signale im Größenbereich von einigen hundert Hertz bewegen.

2.5.1. Waschschritt mittels Phosphatpuffer und Natriumdodecylsulfat

Die ersten Waschlösungen, Phosphatpuffer und Natriumdodecylsulfat wurden schon in einer anderen Arbeit¹⁰⁸ erfolgreich angewendet und daher für die ersten Versuche

verwendet. Zur Herstellung von 1 mM Phosphatpuffer (PBS) wird ein 100 mM PBS mit pH 7,4 nach folgendem Rezept dargestellt. Diese Pufferlösung wird anschließend verdünnt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten.

80g	NaCl
2g	KCl
14,4g	Na ₂ HPO ₄
2,4g	KH ₂ PO ₄
800ml	Wasser

Tabelle 5: Mengenangaben zur Darstellung des Phosphatpuffers

Ein Liter 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS) Lösung wurde als Waschlösung ohne Verdünnungsschritt direkt hergestellt. Sowohl die SDS-Lösung als auch die konzentrierte Pufferlösung wurden über Nacht gerührt, um alle Bestandteile im Wasser zu lösen. Erst danach wurde der pH- Wert des PBS-Puffers eingestellt, dieser auf einen Liter aufgefüllt und anschließend verdünnt. Um die Zersetzung des PBS-Puffers zu vermeiden, wurde dieser im Kühlschrank gelagert. Die hergestellten Lösungen wurden schließlich verwendet, um BSA aus dem Polymer zu entfernen. Vor der Messung wurden die Quarze je 30 Minuten in 100 mM PBS, 0,1% SDS und Wasser gelegt. Nach der Messung wurde die Messzelle mit den Waschlösungen gespült. Hierzu wurde, nachdem das Gleichgewicht des Signals erreicht wurde, je 15 Minuten mit 0,45 ml/min Pumpengeschwindigkeit zuerst mit 100 mM PBS-Puffer, anschließend mit 0,1% SDS und schließlich mit Wasser gewaschen.

2.5.2. Waschschrift mittels Essigsäure

Der PBS-SDS-Wasser Waschschrift ist mit 45 Minuten sehr zeitintensiv, daher wurde auch eine weitere Alternative getestet. Konzentrierte Essigsäure mit 96% (v/v) wurde 1:10 verdünnt, um eine 9,6% (v/v) Essigsäure zu erhalten. Zum Waschen des Polymers wurde je 15 Minuten bei einer Pumpengeschwindigkeit von 0,45 ml/min. zuerst mit Essigsäure und anschließend mit Wasser gespült.

Immobilisierungsstrategien für BSA

2.6. Immobilisationsstrategie

Eines der Ziele dieser Arbeit ist die Charakterisierung von BSA MIP mittels Peak-Force-QNM. Dafür muss BSA auf einer AFM-Spitze immobilisiert werden. Hierzu wird zuerst eine aminofunktionalisierte Oberfläche hergestellt, die als Grundgerüst für die weitere Immobilisierung dient. Der schematische Reaktionsablauf ist in Abb. [22] dargestellt.

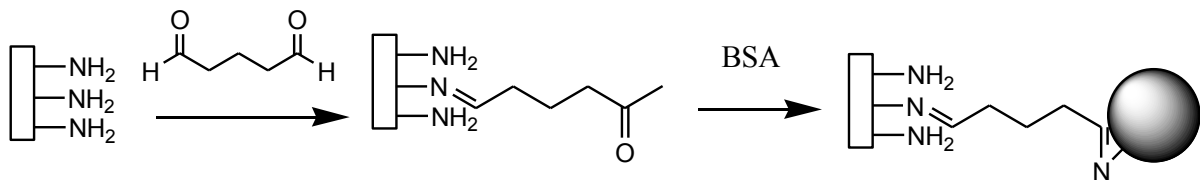


Abbildung 22: Schematischer Reaktionsablauf der Immobilisierungsschritte des BSA

Die Methode wurde zuerst auf Silizium Wafern getestet und entwickelt. Die aminofunktionalisierte Oberfläche kann hierbei mittels Aminotriethoxysilan (APTES) oder Ethanolamin hergestellt werden. Das Protein soll mittels Glutaraldehyd an die Oberfläche gebunden werden. Die einzelnen Arbeitsschritte werden mit HATR-FTIR überprüft. Hierzu wird zuerst ein Untergrundspektrum mit einer nicht funktionalisierten Oberfläche gemessen, anschließend werden die Spektren der funktionalisierten Oberfläche mit dem Blindwertspektrum verglichen. Die immobilisierte Oberfläche wurde auch im AFM visualisiert und die erfolgreiche Immobilisierung mittels QCM überprüft. Ebner A. et. al. beschreiben als alternative die Möglichkeit eines Polyethylenglycolaldehyds mit Schutzgruppe zur möglichst selektiven Bindung an eine AFM Spitze¹⁰⁴. Die Synthese ist jedoch sehr zeitaufwendig und teuer, es wurde daher der einfachere Ansatz über den kommerziell gut erhältlichen Glutaraldehyd gewählt. In der Literatur wird die erfolgreiche Immobilisierung von Proteinen und Enzymen mittels Glutaraldehyd an aminofunktionalisierte Oberflächen beschrieben¹⁰⁵.

2.7. Aminofunktionalisierung

Bevor mit der Funktionalisierung begonnen werden kann, muss die Oberfläche aktiviert werden, das heisst die Hydroxidgruppen an der Glasoberfläche werden aktiviert. Im Fall der Siliziumwafer erfolgte das mittels Plasma-Discharger. Für die Immobilisierung auf QCM werden die Quarze zuerst im Ofen bei 300°C für eine Stunde thermisch vorbehandelt. Dieser Prozess bewirkt die Oxidation von an der Sensoroberfläche immobilisierten Thiolen aus der Luft und damit deren Reinigung. Da die Goldoberfläche sofort mit Thiolen aus der Luft reagieren kann, muss sie sofort weiterverarbeitet werden. Aktivierung mit Piranha-Lösung, wie in der Literatur beschrieben¹⁰⁶, erwies sich bei den durch Siebdruck selbst hergestellten Quarze als nicht zielführend: vorhandene Reste von kolloidalem Gold lösen sich von der Quarzoberfläche (die Brenntemperatur muss niedriger als das für die Glanzgoldpaste publizierte Optimum von 700°C gewählt werden). Die Aktivierung der AFM Spitze erfolgte jedoch mittels Waschen mit Chloroform, wie in der Literatur¹⁰⁴ beschrieben. Eine Aktivierung mittels Piranha Lösung oder Plasma Discharger kam aufgrund möglicher Beschädigung der Spitze nicht in Betracht.

2.7.1. Funktionalisierung mittels APTES

Die erste Methode ist die Bildung eines selbst organisierenden Monolayers (self assembled monolayer - SAM) mit Hilfe von Aminopropyltriethoxysilan (APTES). Diese Verbindungen sind wasserempfindlich, die Reaktionen sollen daher unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt werden. Hierzu wird ein Kolben mit Aceton gewaschen und anschließend im Trockenschrank bei 110° getrocknet. Ein mit Stickstoff gefüllter Ballon wird an einem Übergangsstück mit Olive und Hahn befestigt, der Kolben mit Stickstoff gespült und das Übergangsventil am Kolben befestigt. Der Hahn wird geöffnet, der Kolben steht unter Stickstoffatmosphäre und man lässt ihn auskühlen. Anschließend wird eine 10%-ige APTES Lösung in Toluol vorgelegt und die zu modifizierenden Siliziumwafer hineingelegt, der Kolben wird

wieder mit Stickstoff gespült. Das Verbindungsstück wird am Kolben befestigt und der Hahn geöffnet. Die Reaktion dauert fünf Stunden. Die Plättchen werden mit einer Methanol/Toluol (1:1) Lösung und anschließend mit Toluol gewaschen. Die Plättchen werden anschließend unter leichten Argonstrom getrocknet.

2.7.2. Funktionalisierung mittels Ethanolamin

Die Funktionalisierung auf einer AFM Spitze mittels Ethanolamin wird bereits in der Literatur beschrieben. Dabei wurden auch die Moleküle pro Fläche untersucht und es zeigte sich, dass die Immobilisierung mit Ethanolamin bessere Ergebnisse lieferte als APTES, jedoch wurde eine Immobilisierung mit APTES in Gasphase und nicht in flüssiger Phase untersucht¹⁰⁷. Für die sogenannten „Ethanolamin-Spitzen“ werden 3,3g Ethanolamin Hydrochlorid in 6,6ml DMSO vorgelegt. Wie bei der Immobilisierung mit APTES wurde der Kolben vorher bei 110°C im Trockenschrank getrocknet und mit Argon gespült. Die Lösung wird auf 60°C erwärmt, bis sich das gesamte Ethanolamin Hydrochlorid gelöst hat. Anschließend wird 10% (v/v) 4Å Molekularsieb hinzugefügt und man lässt die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur abkühlen. Anschließend gibt man die zu funktionalisierende Oberfläche in den Kolben. Der Kolben wird 30 Minuten an eine Wasserstrahlpumpe gehängt und ein Vakuum angelegt. Anschließend wird der unter Vakuum stehende Kolben mit Argon gespült, man lässt die Reaktionsmischung unter Argonatmosphäre über Nacht stehen. Die so modifizierten Oberflächen werden mit DMSO und Ethanol gewaschen.

2.7.3. Funktionalisierung mittels Cysteamin

Die vorher beschriebenen Methoden können nicht auf der Goldelektrode eines QCM angewendet werden, daher wurde der QCM in eine 5%(v/v) Cysteamin Lösung in 10% Ethanol gelegt. Die Oberfläche wurde mittels Toluol gewaschen.

2.8. BSA Immobilisierung

Nach der Aminofunktionalisierung werden die zu funktionalisierende Oberflächen für eine Stunde in 10% Glutaraldehydlösung gelegt und anschließend mit 50% Ethanol und Wasser gewaschen. Anschließend wird die Oberfläche in 100 mg/ml BSA Lösung gelegt. Nach einer Stunde wird diese mit Wasser gewaschen und unter sanftem Argonstrom getrocknet.

3. Ergebnisse

Charakterisierung der BSA geprägten QCM Sensoren

3.1. Vergleich der verschiedenen Prägetechniken – QCM

3.1.1. Stempelprägung

Mittels Stempeltechnik wurde ein QCM Sensor hergestellt. Nachdem die Basislinie erreicht wurde, wurde eine 100 mg/L BSA Lösung mit 0,45 ml/min durch die Messzelle gepumpt. Die erhaltene QCM Messung ist in Abbildung [23] dargestellt.

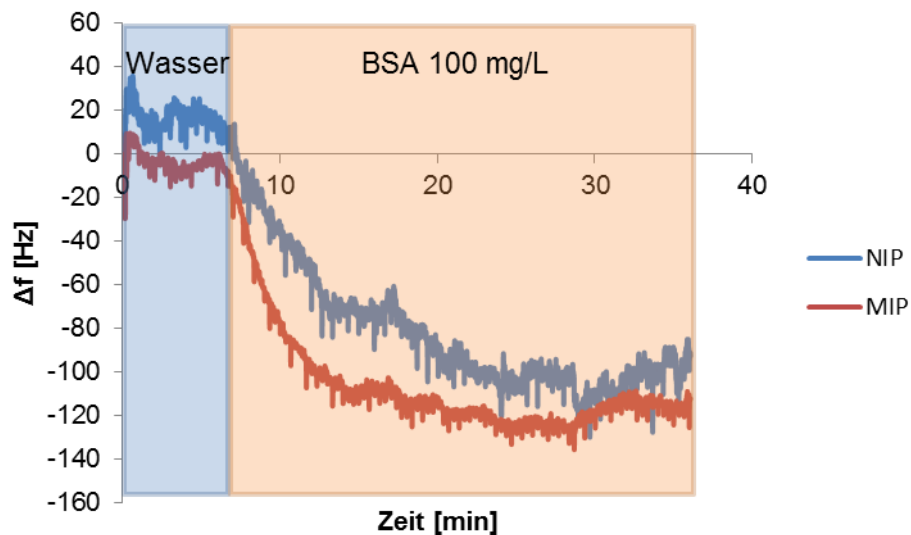


Abbildung 23: Stempeltechnik. MIP, NIP: 120Hz, keine Signaldifferenz

Aufgrund der Zugabe kam es bei beiden Elektroden erwartungsgemäß aufgrund der Konzentrationsänderung zu einer Frequenzerniedrigung. Jedoch war zwischen MIP und NIP kein Frequenzunterschied zu erkennen. Beide Elektroden zeigten eine Frequenzänderung von 120Hz, also war die molekulare Prägung nicht erfolgreich. Das zeigt den Bedarf nach weiterer Optimierung: Beim Festklemmen vom Stempel an der Messelektrode ließ sich beobachten, wie das Wasser an der Seite des Stempels entlang aufgrund des Kapillareffekts aus der Oberfläche floss. Da BSA sehr gut in Wasser löslich ist, bestand der Verdacht, dass sich das BSA vom Stempel löst und ausfließt, bevor es überhaupt zu einer Prägung kommt. Um diese Problematik zu umgehen, existieren verschiedene Strategien, diese sind hier nur stichpunktartig aufgeführt.

- Optimierung der Zeit bei der Selbstorganisation am Stempel
- Immobilisierung des Bovinen Serum Albumins auf den Stempel
- Polymerisation im organischen Lösungsmittel
- Verwendung von PDMS als Stempelmateriale
- Funktionalisierung der Glasoberfläche zur besseren Haftung des Templats

Da diese Sensoren in ersten Ergebnissen jedoch kein Signal bei BSA Zugabe zeigten, wurden die oben genannten Schritte nicht mehr getestet.

3.1.2. Sedimentationstechnik

Der Sensor wurde mit Sedimentationstechnik, wie im experimentellen Teil beschrieben, hergestellt. Daraus resultierten die in Abbildung [24] ersichtlichen Sensorantworten.

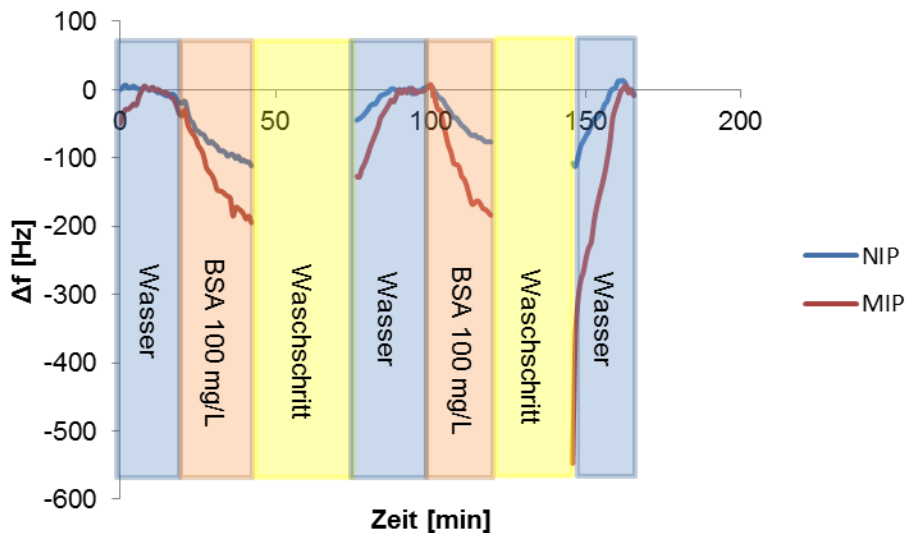


Abbildung 24: QCM-Sensorantwort eines mit Sedimentationstechnik hergestellten Sensors. Signal bei 100mg/L: 100Hz; 110Hz. Rot: MIP; Blau: NIP.

Nach dem Einschwingen und wird BSA mit einer Konzentration von 100 mg/L zugegeben. Erwartungsgemäß kommt es auf beiden Elektroden zu einer Frequenzerniedrigung, bei dieser Prägemethode kommt es am MIP zu einer Frequenzänderung von 200 Hz und am NIP zu einer Frequenzänderung von 100 Hz, was einem effektiven Analytsignal von 100Hz entspricht. Da sich die Polymere chemisch voneinander nicht unterscheiden, kann diese Differenz auf das molekulare Prägen zurückgeführt werden. Führt man einen Waschschrift durch, erreicht das Sensorsignal wieder die Basislinie. Dies zeigt eindeutig, dass die Signale reversibel sind. Bei einer weiteren Zugabe konnte ein Signal von 110 Hz erreicht werden, aufgrund des Rauschens von 2-5 Hz kann man daher von einem reproduzierbaren Signal sprechen. Dieser Erstversuch zeigt, dass es generell möglich ist, einen Sensor herzustellen. Es sind aber auch einige Limitierungen zu erwarten: Aufgrund des niedrigen Signals in dieser Messung wäre die theoretische Nachweisgrenze nicht sehr hoch. Auch der Unterschied zwischen Mess- und Referenzsignal beträgt gerade 2. Für einen analytischen Sensor oder eine Trenntechnik ist die Sensitivität also noch nicht zufriedenstellend. Die Reaktionszeit des Sensors ist mit 2 Stunden vergleichsweise lang, liegt aber im Bereich anderer in der Arbeitsgruppe erhaltener Ergebnisse¹⁰⁸. Ein möglicher Grund für die geringe Sensitivität könnte sein, dass es bei Zugabe des BSA in Wasser zu Verdünnungseffekten des Polymers kommt.

Ein generelles Problem der Oberflächenprägung ist, dass das Polymer ebenfalls am Stempel auspolymerisiert. Wird dieser entfernt, kann es zu einer Ablösung von Teilen der Schicht kommen.

3.1.3. Selbstorganisierte Volumenprägung

Zur Untersuchung wurden Sensoren gemäß der So-VP Methode, wie im experimentellen Kapitel 1.2.3.2 beschrieben, dargestellt. Im ersten Schritt wurde der Unterschied zur Oberflächenprägung untersucht. Dies ist in der folgenden Abbildung [25] dargestellt.

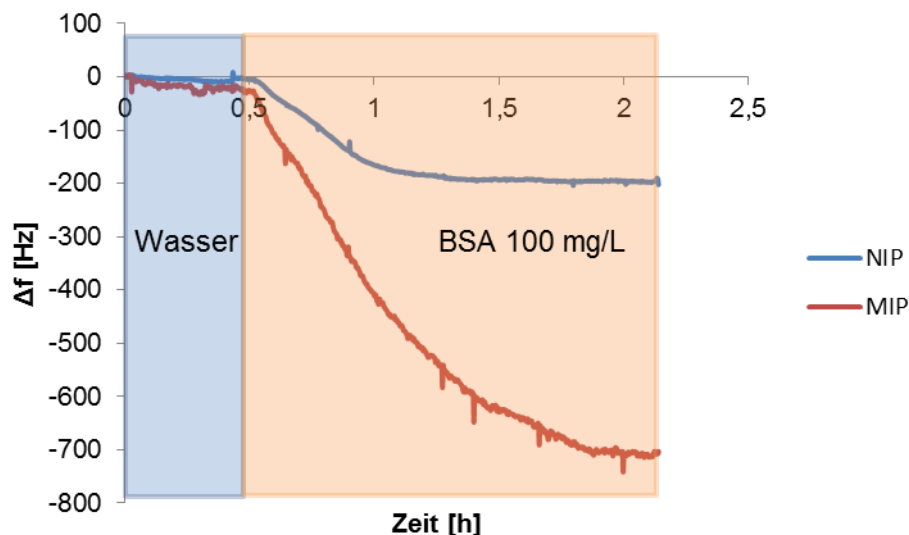


Abbildung 25: QCM-Sensorantwort eines So-VP Sensors, Signal bei 100 mg/L 490Hz; Rot: MIP; Blau: NIP

Nach Zugabe des Analyten zeigt sich ein deutlicher Frequenzunterschied zwischen MIP und NIP, dies ist wieder auf die molekulare Prägung zurückzuführen und zeigt, dass die Prägemethode funktioniert. Für 100 mg/L erhielt man ein Signal von 490Hz. Dies bedeutet ein viel geringeres theoretisches Detektionslimit von 10 mg/L unter Einbeziehung des Rauschverhaltens. Der Unterschied zwischen MIP und NIP ist mit einem Faktor 3,5 bedeutend höher als bei der Sedimentationsmethode. Dieser Unterschied bedeutet, dass der Sensor sensitiv auf das BSA reagiert und daher für

eine Messung mittels Kraft-Abstands-Kurven geeignet ist, eine weitere zusätzliche Optimierung ist also nicht notwendig. Die Vorteile der Methode für Proteine sind vielseitig: Durch die Zugabe bei RT kann eine Denaturierung des Proteins vermieden werden, bei pH-empfindlichen Proteinen könnte man mit Puffersystem als Lösungsmittel arbeiten. Des Weiteren ist eine Darstellung von molekular geprägten Polymernanopartikeln möglich, welche mittels Stempel und Sedimentationstechnik technisch nicht machbar sind. Fehler bei der Einwaage und der Synthese des Polymers können minimiert werden, da für die Versuche mehrere Milliliter vorpolymerisierte Lösung hergestellt werden können, welche zu 100% dieselbe chemische Zusammensetzung sowie wahrscheinlich auch denselben Polymerisationsgrad besitzen. Im Gegensatz hierzu müssen bei Volumenprägung die Polymere separat synthetisiert werden. Dabei kann es nicht nur zu Fehlern bei der Einwaage kommen, auch ändert sich meist durch die Zugabe eines Templats die Polymerisationsdauer, daher kann es bei NIP und MIP zu unterschiedlichen Polymerisationsgraden kommen. Wenn man das Messergebnis in Abb. [25] mit der Sedimentation vergleicht, zeigt sich, dass sich das Signal des Sensors durch die Wahl der Prägemethode beeinflussen lässt wie in Abb. [26] ersichtlich ist.

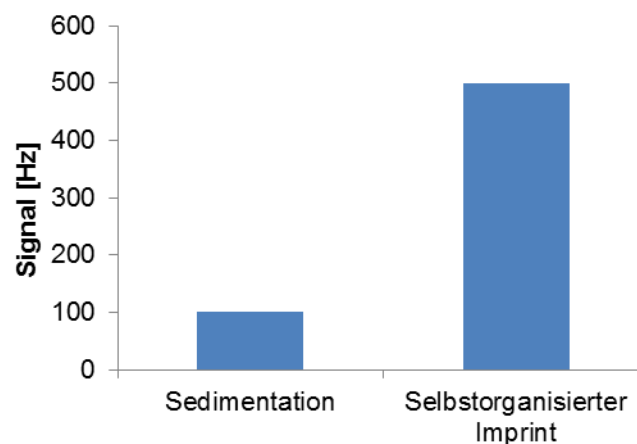


Abbildung 26: Vergleich Sedimentationstechnik und selbstorganisierendem Polymer. Vierfache Steigerung der Sensitivität, 100 Hz für Sedimentation und 490 Hz für selbstorganisiertem MIP bei einer Konzentration von 100mg/L BSA

Durch die Änderung der Prägemethode bei gleicher Wahl des Polymers konnte die Sensitivität gegenüber dem Analyten verdoppelt werden und das Signal sogar um einen Faktor vier gesteigert werden. Nicht nur resultiert die selbstorganisierte

Volumenprägung in sensitiveren Sensoren, die Synthese und Darstellung dieser Sensoren ist mit wesentlich weniger Aufwand verbunden, als bei der Stempeltechnik. Das Hineinpressen des Stempels stellt zudem eine mögliche Fehlerquelle dar, dies kann die Reproduzierbarkeit der Sedimentationsmethode negativ beeinflussen.

3.2. Vergleich der verschiedenen Prägemethoden - optisch

Die Stempelprägung führte zu keiner erfolgreichen molekularen Prägung, ein vermuteter Grund war, dass sich das Albumin beim Aufbringen des Stempels nicht auf der Oberfläche befindet. Zur Untersuchung der Stempelherstellung wurden Messungen mit fluoreszenzmarkiertem BSA der Firma Sigma Aldrich an einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Zuerst wurde die Herstellung des Stempels kontrolliert. Nach dem Auftragen des Analyten ordnet sich dieser theoretisch selbst auf den Glasplättchen an, das Wasser lässt man fast bis zur Trockene verdampfen. Wartet man zu kurz, kommt es bei wässrigen Polymeren zu einer Verdünnung, wartet man zu lange, bildet der Analyt einen Ring an der Außenseite des Tropfens, wie in Abb. [27] dargestellt und es könnte dadurch auch zu Konformationsänderungen des Proteins kommen.

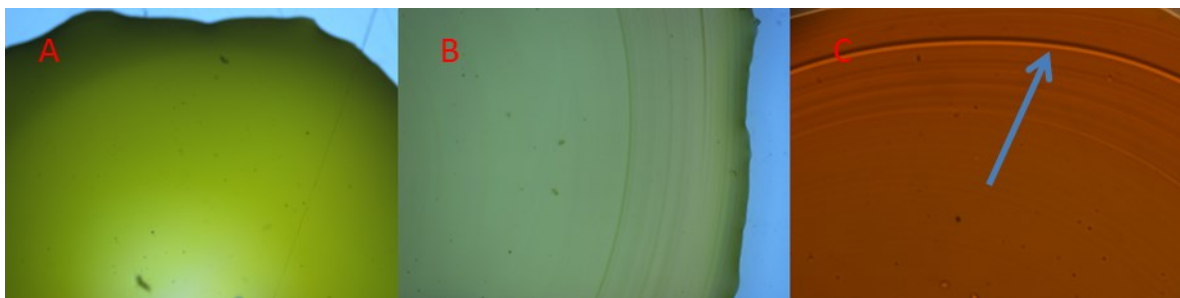


Abbildung 27: Mikroskopiebilder von Polymeren nach verschiedenen Arbeitsschritten: A) UV Lampe frische Lösung; B) UV Lampe eingetrocknet; C) Durchlicht eingetrocknet. Es zeigt sich, dass sich der Analyt am Rand sammelt

Zudem ergab sich während erster Stempelvorgänge der Verdacht, dass BSA unter dem Stempel herausgepresst wird, was optisch bestätigt werden konnte, wie in Abb. [28] gezeigt wird.

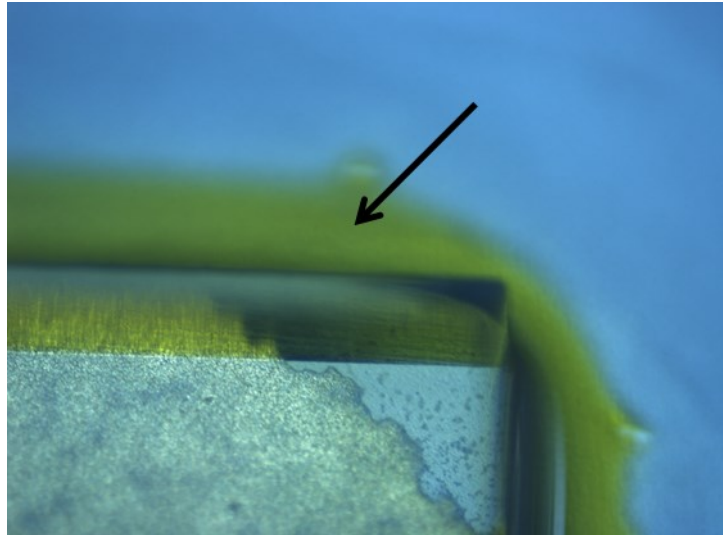


Abbildung 28: Mikroskopaufnahme einer Stempelprägung (UV Lampe) man sieht wie sich die Lösung außerhalb des Stempels befindet.

Die fluoreszierende Lösung befindet sich in diesen Bildern außerhalb des Stempels, in dieser Lösung befindet sich Analyt, dieser kann also nicht in die Oberfläche des Polymers gepresst worden sein. Aufgrund dieses Verhaltens ist die Ausbildung von Oberflächenkavitäten durch Prägen stark eingeschränkt, womit sich also auch keine brauchbaren Sensoren herstellen lassen. Es bestünde die Möglichkeit, das BSA auf dem Stempel zu immobilisieren, diese Idee wurde aufgrund der Möglichkeit einer Konformationsänderung zunächst jedoch verworfen, und alternative Methoden getestet. Außerdem zeigte sich bei AFM Untersuchungen der Immobilisationsmethoden, dass BSA Inselwachstum zeigt. Dies bedeutet, dass nicht einzelne Moleküle in die Schicht geprägt werden, sondern Ansammlungen von Proteinen. Nach molekularer Prägung des Polymers mit fluoreszenzmarkiertem BSA mit Stempelprägung bzw. selbstorganisierter Volumenprägung wurden die Oberflächen im Lichtmikroskop mittels Fluoreszenzmessungen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sich sowohl bei So-VP als auch bei der Stempelprägung noch fluoreszierendes Protein an der Oberfläche befindet. In Abb. [29] sind die Mikroskopbilder der So-VP dargestellt.

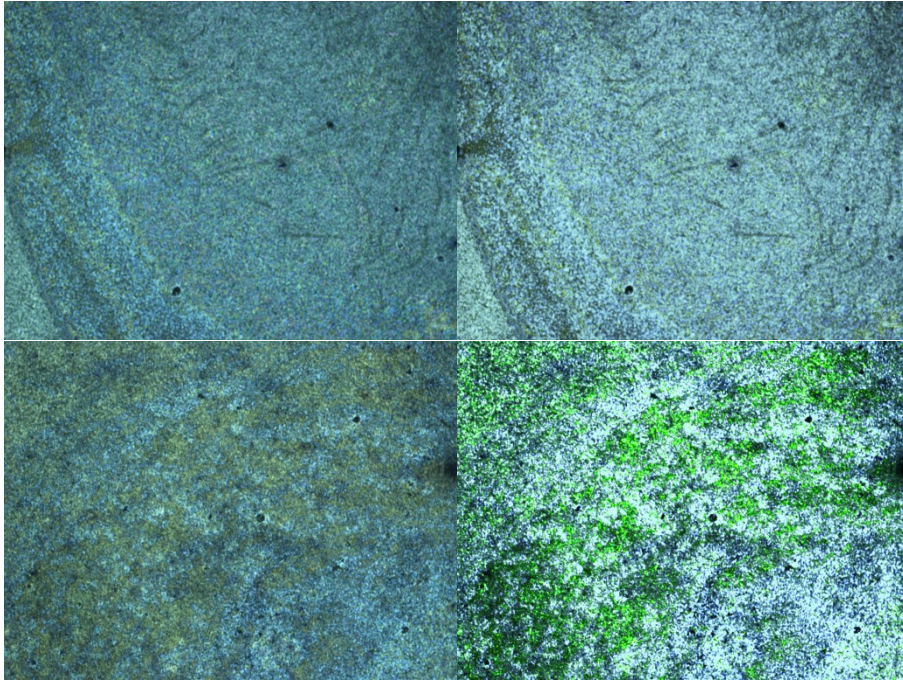


Abbildung 29: Selbstorganisierte Prägung mit fluoreszierendem BSA; Oben: NIP-Oberfläche; Unten: MIP-Oberfläche. Links: jeweils Originalbilder; rechts: bearbeitete Bilder

Hier ist ein eindeutiger Unterschied zwischen geprägter und nicht geprägter Fläche zu erkennen. Es zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung des BSA über die Oberfläche des MIP. Im Vergleich hierzu erkennt man bei der Stempelprägung vor allem im Randbereich des Stempels einen deutlicher Unterschied wie in Abb. [30] dargestellt.

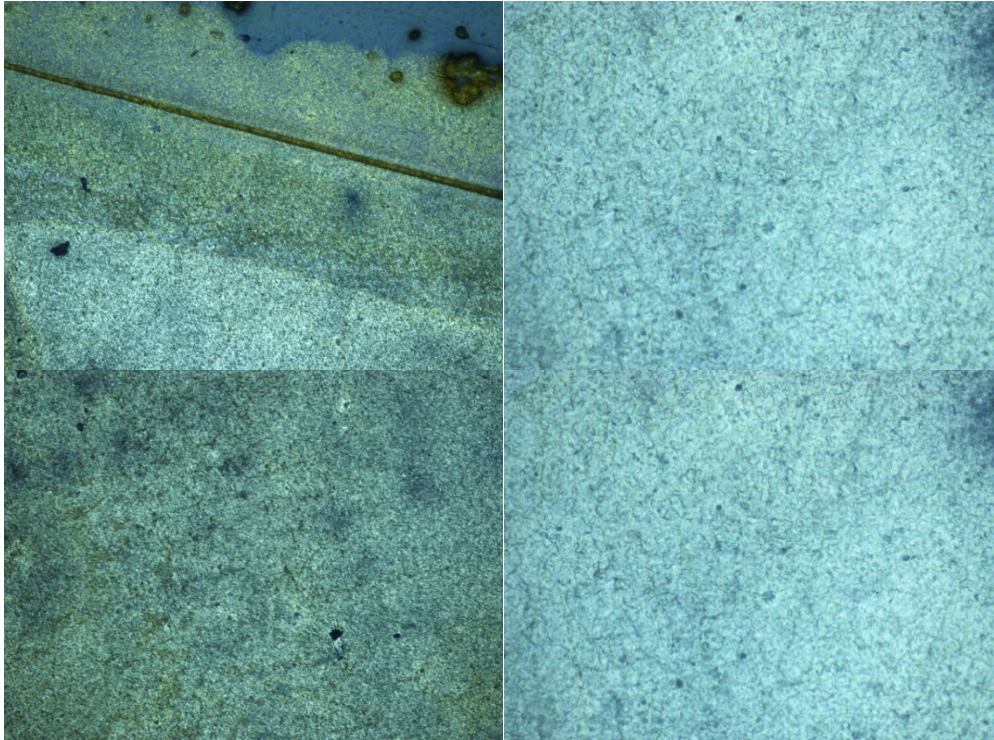


Abbildung 30: Stempeltechnik mit fluoreszenzmarkiertem BSA; Vergleich MIP-Oberfläche im Randbereich (oben), MIP-Oberfläche (unten) gegen NIP-Oberfläche (links)

Im Randbereich erkennt man, dass die Albuminkonzentration am Rand des Stempels am höchsten ist. Zur besseren Darstellung wurde der Randbereich des Stempels mit Photoshop bearbeitet und ist in Abb. [31] dargestellt.

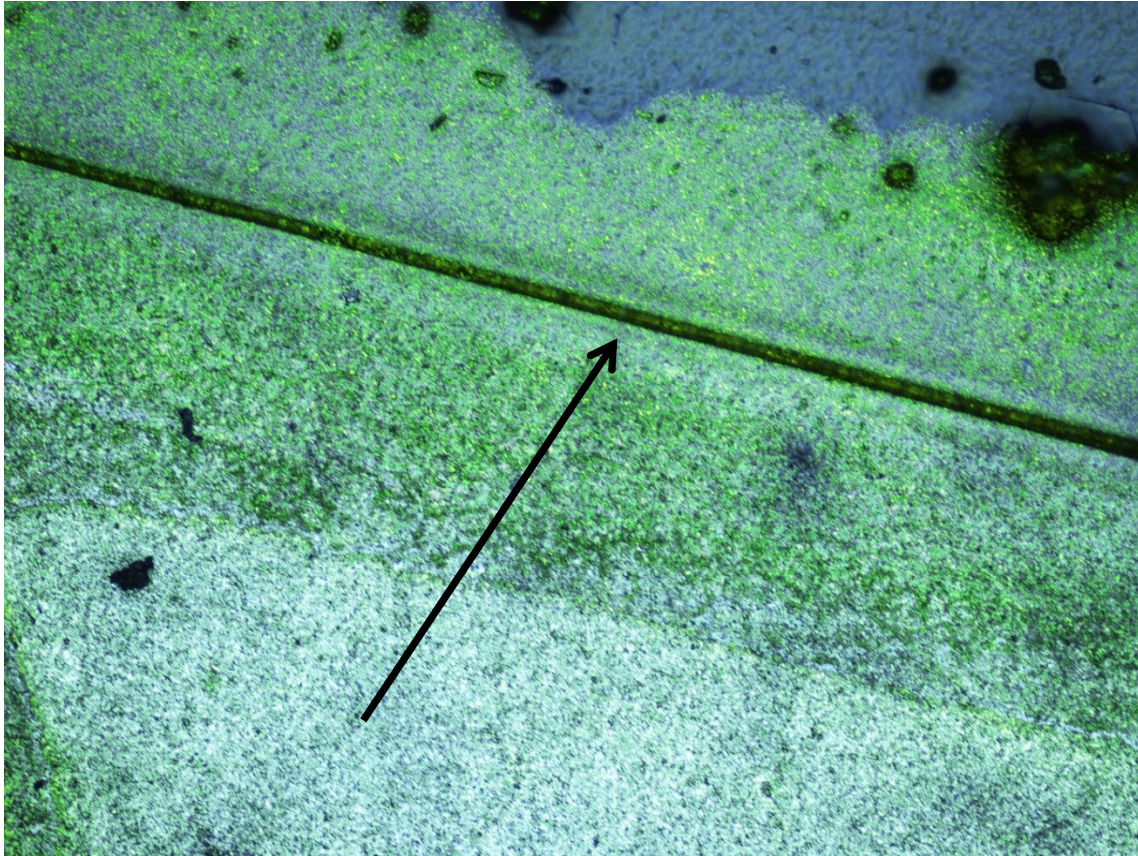


Abbildung 31: Stempeltechnik im Randbereich des Stempels mit fluoreszenzmarkiertem BSA. Bearbeitetes Bild

Hier zeigte sich bei der Stempelprägung, dass an den Randgebieten das BSA außerhalb des Stempels liegt. Neben dem Randgebiet befinden sich weitläufige freie Flächen, in denen sich kein BSA befindet. Es zeigt sich auch keine gleichmäßige Verteilung des BSA, was sicherlich die Probleme der Stempeltechnik verursacht, nämlich kein Analytsignal sowie schlechte Reproduzierbarkeit. Durch Optimierung der Selbstorganisation des Analyten und der Auftragung des Stempels könnte man die Stempeltechnik verbessern¹⁰⁸, jedoch stellt die So-VP eine effizientere Prägemethode dar. Der direkte Vergleich der beiden Methoden im nachfolgenden Bild [32] bestätigt dies.

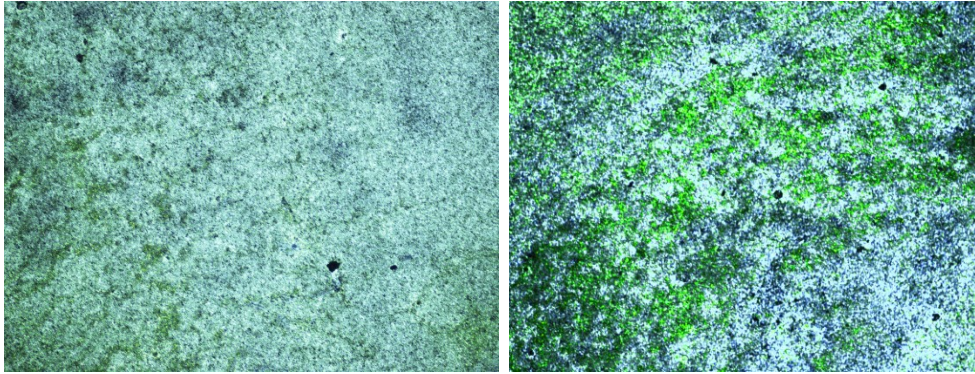


Abbildung 32: Vergleich bearbeiteter Bilder, Oberfläche mit Stempelprägung (rechts) gegen selbstorganisiertes Polymer (links)

Die Verteilung des fluoreszierenden BSA ist bei So-VP gleichmäßiger und gesättigter als bei Stempelprägung. Dies allein ist noch kein Qualitätskriterium, schließlich könnte es auch darauf hindeuten, dass bei selbstorganisierter Prägung die Proteine zusammenklumpen und daher es zu einer ungenaueren Prägung kommt. Aufgrund der QCM-Sensorsignale ist es jedoch wahrscheinlicher, dass die Stempeltechnik bei wasserbasierenden Polymeren zu weniger guten Resultaten führt.

3.3. Charakterisierung der selbstorganisierten Volumenprägung

3.3.1. Waschschritte – Entfernung des Analyten aus dem Polymer

3.3.1.1. *Wasser*

Acrylate sind in ihrer Lebensdauer eingeschränkt, durch das Waschen mit basischen oder sauren Lösungen kann der Quervernetzer zerstört werden. Aufgrund dessen wurde getestet, ob der Analyt mit Wasser entfernt werden kann. Hierzu wurde der Quarz vor der Messung anstatt in die Waschlösungen zwanzig Minuten in Wasser

gelegt und anschließend wurde die Messung gestartet, diese ist in Abb. [33] dargestellt.

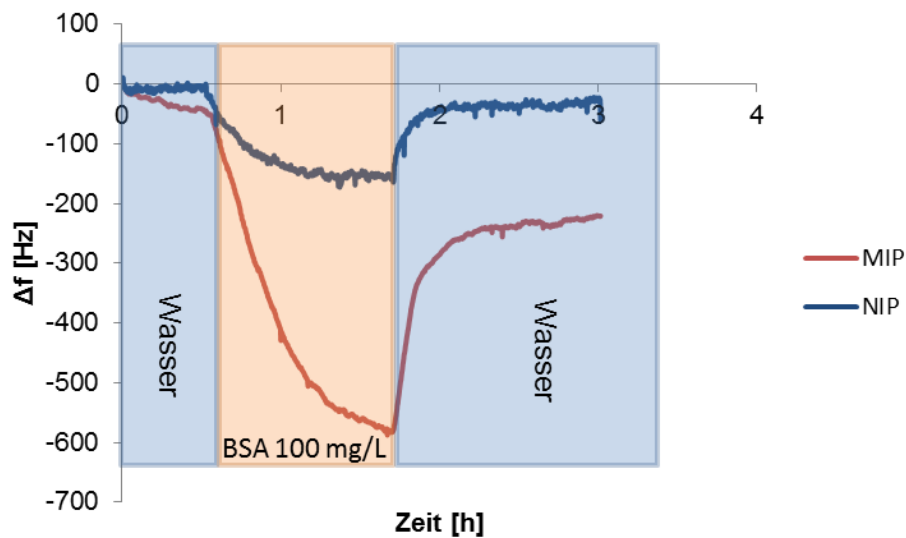


Abbildung 33: QCM-Sensorantwort eines So-VP Sensors. Messergebnis bei 100mg/L: 390Hz. Rot: MIP; Blau: NIP.

Wie auch im Erstversuch zeigte der Sensor ein sehr gutes Ansprechverhalten auf 100 mg/L BSA, jedoch gab er mit 390Hz ein 100 Hz geringeres Signal als beim Erstversuch. Dies deutet bereits darauf hin, dass ein Waschschrift mit Wasser nicht ausreichend ist, um den Analyten aus den Kavitäten zu entfernen. Nach Zugabe des Analyten wurde Wasser durch die Messzelle gespült, diesmal wurde die Messung während des Waschschriftes nicht pausiert. Hier zeigen NIP und MIP unterschiedliche Verhaltensweisen. Beim NIP erreicht das Signal wieder die Basislinie, was bedeutet, dass das BSA von der Oberfläche entfernt werden kann. MIP hingegen zeigt immer noch eine Frequenzänderung von 300 Hz, daher ist noch Analyt auf der Oberfläche vorhanden bzw von dieser gebunden. Dieser kann auch bei längeren Warten (8h; nicht dargestellt) nicht entfernt werden. Aus diesem Unterschied kann man auch eindeutig erkennen, dass der Analyt beim MIP stärker an die Oberfläche gebunden wird als am NIP. Da beide Polymere chemisch ident sind, kann dies nur durch die molekulare Prägung erklärt werden.

3.3.1.2. PBS, SDS und Wasser

Das vorherige Experiment zeigte eindeutig die Notwendigkeit eines funktionierenden Waschschrtes, um den Analyten vollständig zu entfernen. Für einen weiteren Waschversuch wurde ein neuer So-VP Quarz zwanzig Minuten in Wasser gelegt. Anschließend wurde dreimal eine Konzentration von 50 mg/L gemessen, nach jeder Messung wurde der Sensor nur mit Wasser gespült. Nach der letzten Messung wurde schließlich ein Waschschrtr mit PBS, SDS und Wasser durchgeführt. Diese Messung ist in Abb. [34] dargestellt.

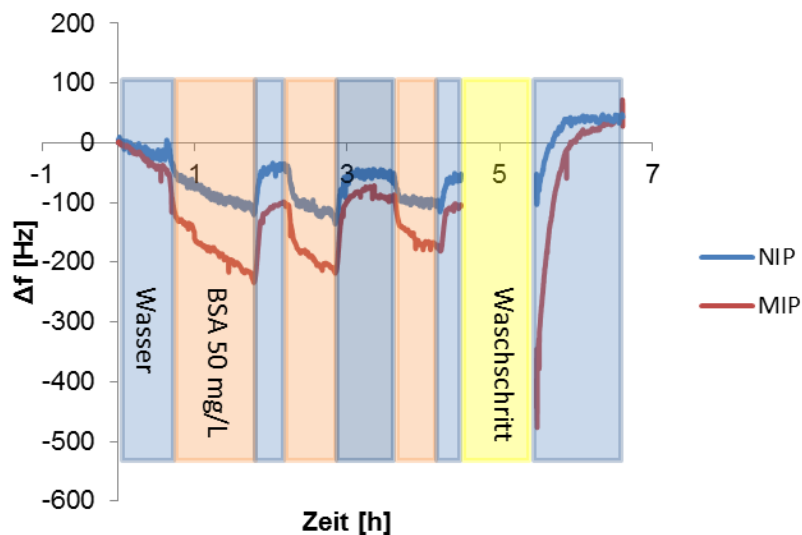


Abbildung 34: QCM-Sensorantwort eines Sensors eines So-VP Sensors. Messergebnis bei 50mg/L: 100Hz; 80Hz; 65Hz. Rot: MIP; Blau: NIP.

In dieser Messung zeigte sich ein ähnliches Verhalten wie bei der vorherigen Messung, der Sensor spricht bei 50 mg/L BSA mit 100 Hz an, jedoch ist es nicht möglich, den Analyten am MIP zu entfernen. Bei einer weiteren Zugabe sank das Signal um 20Hz und bei einer weiteren um 35Hz. Da die Kavitäten noch mit BSA besetzt sind, sind weniger freie Bindungsstellen Bindungsstellen vorhanden, weswegen weniger zusätzliches BSA an der Oberfläche gebunden werden kann. Nach der dritten Zugabe wurde schließlich ein Waschschrtr durchgeführt, hierbei kam es zu einer Erhöhung der Basislinie. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der Sensor vor der Messung nur mit Wasser gewaschen wurde, daher wurde offenbar

nicht das gesamte während des Prägens eingelagerte BSA vor der Messung entfernt. Im Gegensatz hierzu zeigt Abb. [35] eine Messung bei der auf jede Einlagerung ein Waschschrift folgte.

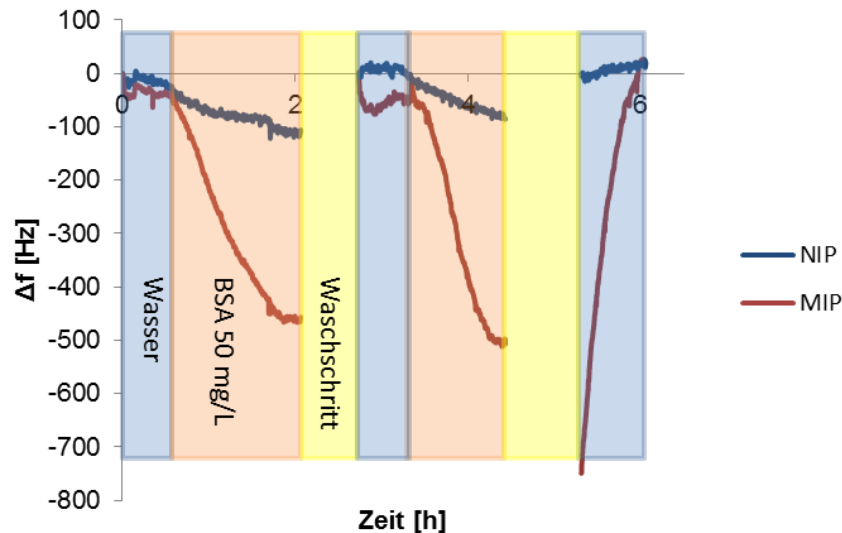


Abbildung 35: QCM-Sensorantwort eines So-VP. Messergebnis bei 50mg/L: 345Hz; 350Hz. Rot: MIP; Blau: NIP.

Im Vergleich zur vorherigen Messung erhielt man bei 50 mg/L ein Sensorsignal von 345 Hz. Dies zeigt, dass der Waschschrift vor der Messung in weitaus besseren Sensorantworten resultiert. Nach dem im experimentellen Teil beschriebene Waschschrift erreicht der Sensor wieder die Basislinie, wiederholtes Zugabe des Analyten resultiert in einem Signal von 350 Hz. Diese Messung demonstriert nicht nur, dass der Waschschrift ausreicht, um das vom MIP gebundene BSA aus den Kavitäten zu entfernen, sondern zeigt auch, dass die Signale reproduzierbar sind. Die So-VP Prägemethode liefert also nicht nur sensitivere sondern auch reproduzierbarere Ergebnisse als die beiden anderen Methoden.

3.3.1.3. Essigsäure

Waschen mit mehreren verschiedenen Waschlösungen ist mit einer Dauer von 45 Minuten sehr zeitaufwendig. Wünschenswerter wäre es das BSA in einem Schritt entfernen zu können, womit sich die Regenerationszeit und damit im Endeffekt auch die Dauer der Messung verkürzte. Aus diesem Grund wurde 10% (v/v) Essigsäure als Waschlösung verwendet. Vor der Messung wurde der Quarz in PBS, SDS und Wasser gelegt und anschließend die Messung gestartet. Das Ergebnis dieser Vorgehensweise ist in Abb. [36] dargestellt.

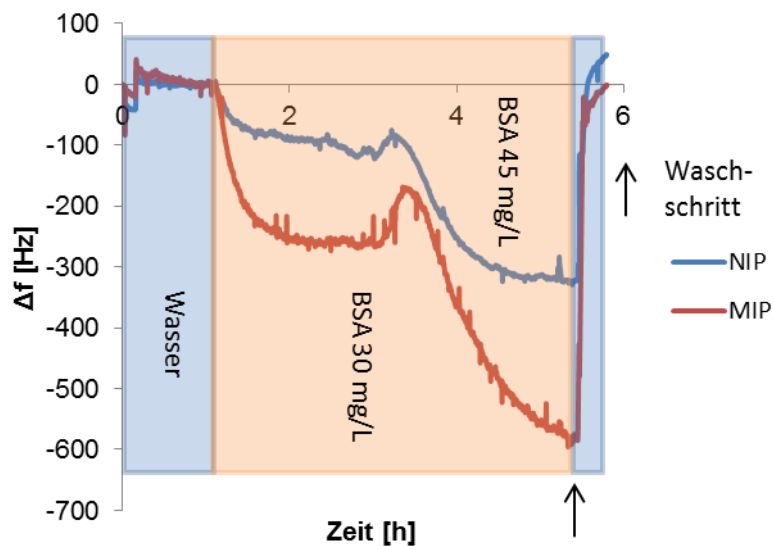


Abbildung 36: QCM-Sensorantwort eines So-VP Sensors. Messergebnis bei 30mg/L: 155Hz; bei 45 mg/L 295Hz. Rot: MIP; Blau: NIP.

Nach Zugabe von 30 mg/L BSA erhielt man ein Signal von 155 Hz, direkt danach erhielt man ein Signal von 295 Hz für 45 mg/L. Nach dem Waschschrift konnte die Basislinie wieder erreicht werden. Da der Sensor zuerst mit PBS-SDS-Wasser gewaschen wurde, und diese das BSA vollständig entfernt, bedeutet dies, dass BSA auch mit Essigsäure vollständig aus dem Polymer entfernt werden kann. Der Waschschrift ist in der Abbildung nicht mehr auf der Zeitachse aufgelöst, da dieser nicht relevant ist. Die Dauer des Waschschriftes konnte von 45 Minuten auf 30 Minuten reduziert werden. Dies erscheint auf den ersten Blick für die einzelne

Messung nicht besonders dramatisch. Bei mehreren Messungen hintereinander ergibt sich jedoch eine Zeitersparnis von mehreren Stunden.

3.3.2. Stabilität

Während den Waschschrift Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass der Sensor reproduzierbare Signale liefert. Jedoch ist damit nicht die Frage nach der Stabilität der Signale nach mehreren Messzyklen geklärt. In Abb. [37] sind mehrere Messungen eines So-VP Sensors dargestellt.

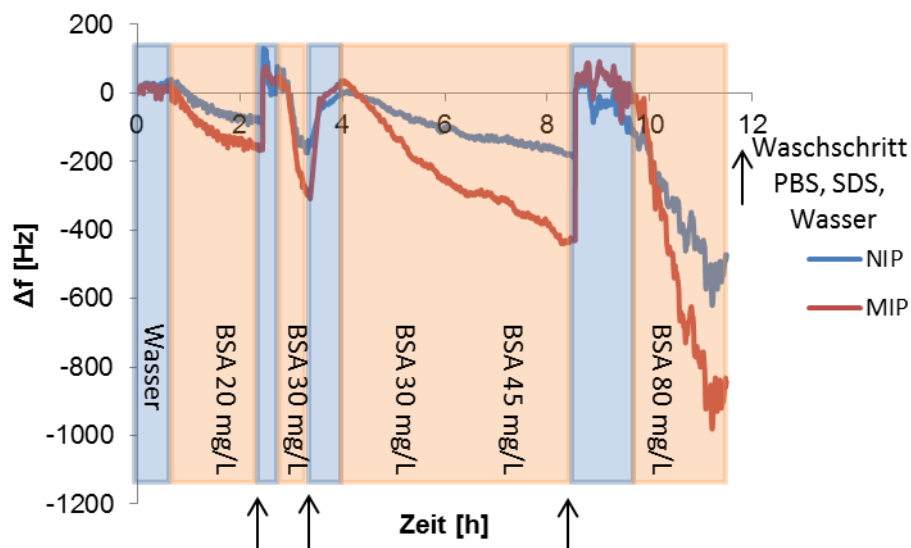


Abbildung 37: QCM-Sensorantwort eines So-VP Sensors. Messergebnis bei 20mg/L: 100Hz; 30mg/ml 145Hz, 150Hz; 50mg/L: 310Hz; 80mg/L: 420Hz.. Rot: MIP; Blau: NIP.

Dieser So-VP Sensor wurde davor bereits 5 Tage lang durchgehend für Messungen verwendet. In der oben gezeigten Messung wurden die Sensorantworten bei Konzentrationen von 20 – 80 mg/L BSA mit einem So-VP Sensor gemessen. Hierbei zeigte der Sensor bei 20 mg/L BSA ein Signal von 100 Hz, bei 30 mg/L 145 bzw. 150 Hz bei 5 mg/L 300 Hz sowie bei 80 mg/L 425 Hz. Bei der letzten Messung mit 80 mg/L kam es zu einer Erhöhung des Rauschverhaltens von 2 auf 10 Hz. Die Erhöhung des Rauschens deutet auf eine Destabilisierung der Polymeroberfläche

hin. Wie bereits erklärt kann der Quervernetzer basisch zersetzt werden. Durch das waschen mit leicht basischer SDS Lösung wird die Formstabilität des Polymers mit der Zeit reduziert. Dies zeigt, dass die Sensoren nur eine begrenzte Zeit haltbar sind. Durchschnittlich konnten die So-VP Sensoren eine Woche gemessen werden, bevor eine Erhöhung des Rauschverhaltens auftrat.

3.3.3. Konzentrationsabhängigkeit

Eine wichtige Sensoreigenschaft ist der dynamische Bereich, dies ist der Bereich in der der Analyt detektiert werden kann. Bei höheren Konzentrationen kann es gemäß dem Langmuir verhalten zu einer Sättigung des Sensorsignals kommen. Um den linearen Bereich zu bestimmen wurden mehrere Sensorantworten bei 200mg/L bzw. 400 mg/L bestimmt. Abb. [38] zeigt die QCM Sensorantwort eines So-VP Sensors bei 200 mg/L BSA.

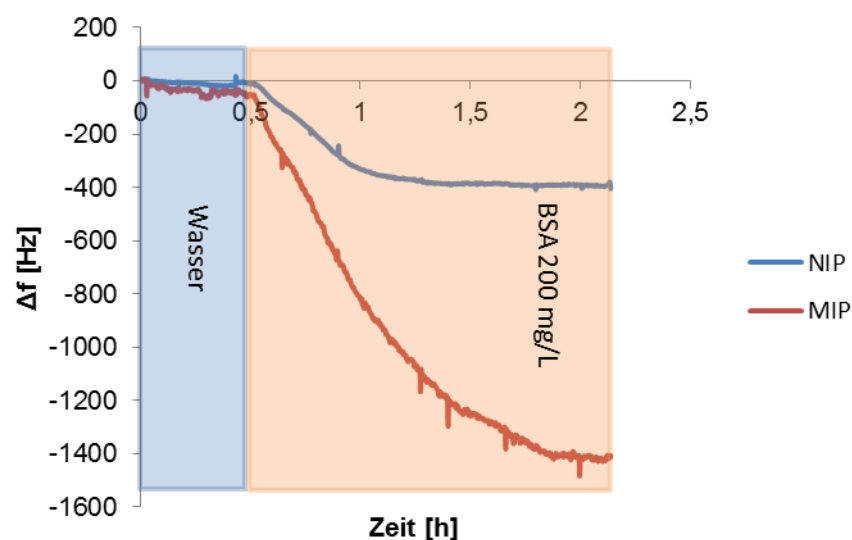


Abbildung 38: QCM-Sensorantwort eines So-VP Sensors. Messergebnis bei 200mg/L 1000Hz Rot: MIP; Blau: NIP. Waschschritt: Essigsäure

Der Sensor zeigt ein Signal von 1000 Hz. Unter Berücksichtigung des Signals von ~500 Hz bei 100 mg/L BSA und der Sauerbrey-Gleichung ist die Sensoroberfläche noch nicht gesättigt. Die Messung bei 400 mg/L BSA Konzentration resultierte in einem Sensorsignal von 1060 Hz, diese Messung ist in Abb. [39] dargestellt.

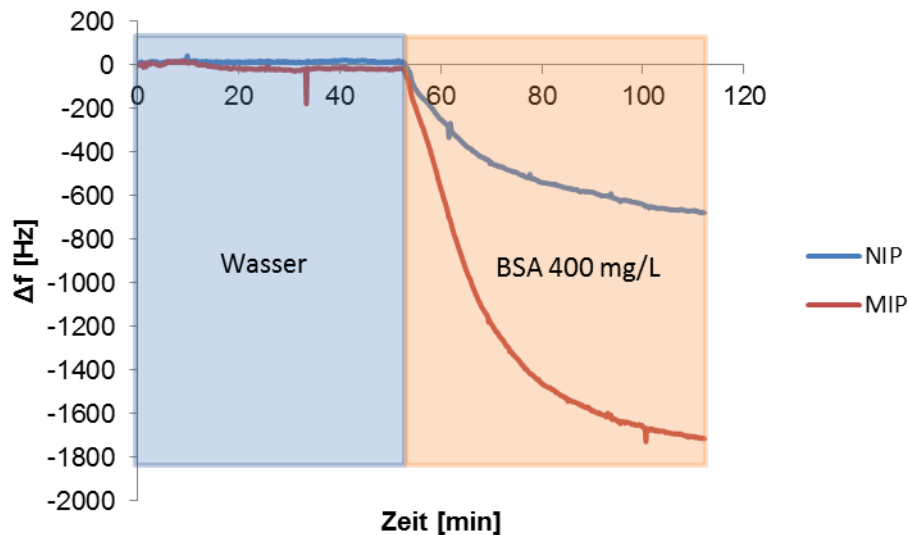


Abbildung 39: QCM-Sensorantwort eines So-VP Sensors. Messergebnis bei 400mg/L 1100Hz Rot: MIP; Blau: NIP. Waschschrift: Essigsäure

Dieses Sensorsignal von 1100 Hz bei 400 mg/L liegt nur 100 Hz über dem erhaltenen Sensorsignal bei 200 mg/L. Dies zeigt deutlich, dass es bei höheren Konzentrationen als 200 mg/L zu Sättigungseffekten kommt, daher ist ab diesem Bereich eine lineare Kalibration des Sensors nicht mehr möglich ist. daher ist ab diesem Bereich eine lineare Kalibration des Sensors nicht mehr möglich ist. Der Unterschied von 100Hz zur vorherigen Messung könnte theoretisch auch durch Wechselwirkung von bereits am MIP gebundenen BSA mit einem weiteren Analytmolekül erklärt werden. Insgesamt ergibt sich für den So-VP Sensor die in Abb. [40] dargestellte Sensorcharakteristik.

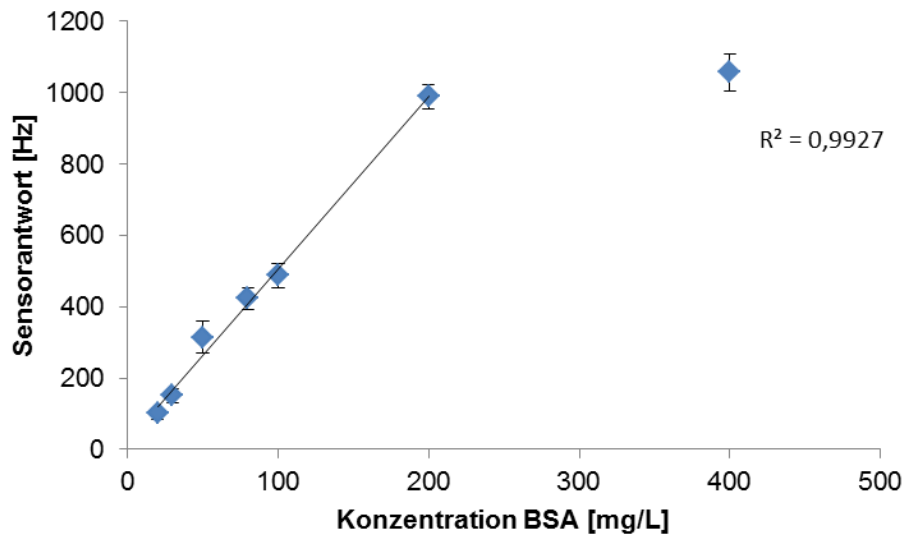


Abbildung 40: Sensorcharakteristik des vororganisierten So-VP MIP

Der selbstorganisierte Sensor zeigt im Bereich von 20-200 mg/L BSA eine lineare Sensorantwort. Aus dem Rauschen von 5 Hz unter Berücksichtigung des drei Sigmas Kriteriums erhält man ein Detektionslimit (LOD) von 5 mg/L. In der Literatur wird ein QCM Sensor mit einem Detektionslimit von 0,5 mg/L HSA beschrieben, der auf Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen basiert¹⁰⁹. Dieser LOD ist zwar geringer als mit diesem So-VP Sensor, jedoch sind Antikörper weitaus teurer und komplizierter in Handhabung und Lagerung als Polymere.

3.3.4. Selektivität

Für eine analytische Sensorschicht ist nicht nur die Sensitivität sondern auch die Selektivität ein entscheidender Faktor. Um die Selektivität des Polymers zu bestimmen, wurde das Signal von verschiedenen Analyten mit dem Signal von BSA verglichen. Die verwendeten Analyte sind in Tabelle [6] aufgeführt.

Analyt	Masse
Bovines Serum Albumin	66 kDa
Pepsin	36 kDa
Casein	28-30 kDa
Bovines γ -Globulin	18,7 kDa
Melamin	126,12 g/mol

Tabelle 6: Analyten zur Bestimmung der Selektivität

Ein BSA So-VP Sensor wurde mit Essigsäure gewaschen und je 100 mg/L des Analyten mit diesem Sensor gemessen. Die QCM Messungen sind in Abb. [41] dargestellt.

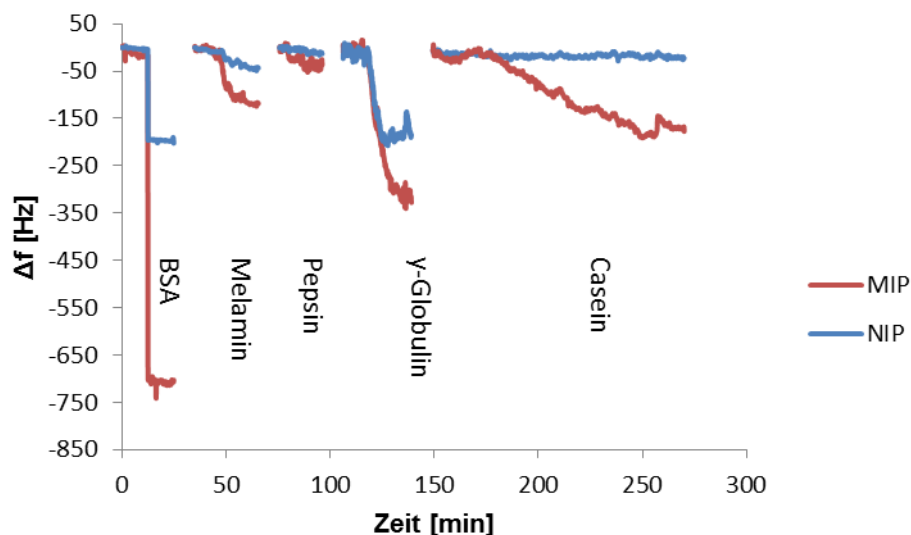


Abbildung 41: QCM-Sensorantwort von verschiedenen Analyten eines So-VP BSA geprägten Sensoren. Jeweils 100 mg/L Analytlösung. Von rechts nach links: BSA 500 Hz, Melamin 90 Hz. Pepsin 35 Hz, γ -Globulin 140 Hz, Casein 145 Hz

Zur einfacheren Darstellung ist der Waschschrift nicht korrekt auf der Zeitachse aufgelöst, ebenso ist nur die analytisch relevante Information zeitlich aufgelöst. Das BSA-Signal benötigt 2 Stunden bis das Gleichgewicht erreicht ist. Bei den anderen Analyten dauert es 20 – 30 Minuten, bis die Frequenz sich nicht mehr ändert. Daher zeigt die Abbildung im Fall des BSA nur die „Stufe“ der Sensorantwort, nicht aber deren exaktes dynamisches Verhalten. Verglichen mit dem Melaminsignal von 90 Hz zeigt BSA ein 4,5-fach höheres Signal. Dies ist insofern relevant, da Melamin drei

Aminogruppen besitzt und daher eine starke Wechselwirkung mit Methacrylsäure zu erwarten ist. Bei Betrachten der molaren Verhältnisse, 0,002 mmol BSA und 0,8 mmol Melamin, zeigt, dass BSA von diesem Sensor stark bevorzugt wird. Auf Acrylatbasis wurde ein Melamin MIP Sensor in der Arbeitsgruppe entwickelt. Dieser zeigt eine vierfach höhere Selektivität auf Melamin als auf BSA⁹⁹. Dies demonstriert, dass molekulare Prägung stark von der Größe des Analyten abhängig ist. Pepsin ergab ein Signal von 35 Hz, was aufgrund des isoelektrischen Punkts von $pI=2$ nicht unerwartet kommt, da das Molekül bei pH 7 stark negativ geladen ist. Die Oberflächenchemie ist also ein entscheidender Faktor der molekularen Prägung. Das Bovine IgG zeigte zwar eine relativ große Frequenzänderung auf beiden Elektroden, dies bedeutet eine starke unspezifische Wechselwirkung mit dem Polymer. Das Signal von 140 Hz ist um einen Faktor 4 geringer. Das Caseinsignal von 145 Hz benötigt eine Stunde um Frequenzstabilität zu erreichen. Der Sensor zeigt auf Casein auch die stärkste Kreuzselektivität, da die Moralität nur um einen Faktor 2 geringer ist. Casein besteht aus mehreren Bestandteilen, daher ist das Signal die Summe mehrerer Kreuzselektivitäten. In Abb. [42] wurden zum besseren Vergleich die Einzelsignale der Elektroden dargestellt, um den Effekt der verschiedenen Substanzen auf molekular und nicht molekular geprägte Schicht vergleichen zu können. Die graphische Darstellung zeigt deutlich, dass das BSA von der selektiven Schicht klar bevorzugt wird.

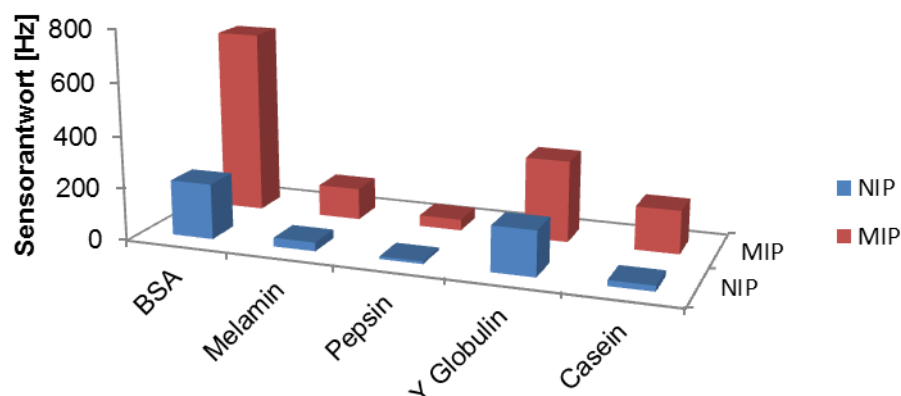


Abbildung 42: Elektrodensignale für verschiedene Analyte gemessen mit So-VP BSA Sensor. Jeweils 100 mg/L Analytlösung. Rot: MIP; Blau: NIP

3.3.5. Nanopartikel

Die So-VP Nanopartikel (So-VP-NP) wurden wie im experimentellen Teil (2.3.3) beschrieben dargestellt. Für die Charakterisierung im Rasterkraftmikroskop wurde die Stammlösung 1:10 verdünnt und die verdünnte Lösung ebenfalls 20 Minuten im Ultraschall behandelt. Die Nanopartikel aggregieren in wässriger Lösung, die Behandlung sorgt für eine gleichmäßige Größenverteilung und verhindert die Klumpenbildung. Sieben Mikroliter der verdünnten Nanopartikellösung werden auf einen Glasstempel bei 2000rpm mittels spin coating aufgetragen. Dies sorgt für die gleichmäßige Verteilung der Nanopartikel auf der Oberfläche. Die so hergestellten Nanopartikelschichten können nun im AFM charakterisiert werden, man erhält Nanopartikel in der Größe von 120-210 Nanometer. Abb. [43] zeigt AFM Bilder von MIP und NIP Polymernanopartikeln.

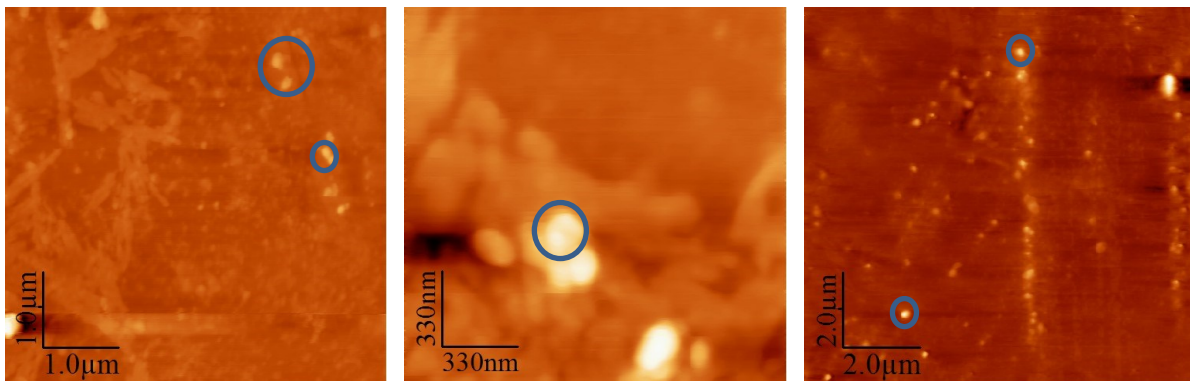


Abbildung 43: Polymernanopartikel gemessen im contact mode von links nach rechts: MIP Polymernanopartikel, MIP Polymernanopartikel vergrößert und NIP Polymernanopartikel

Eine Aufstellung der Größenverteilung ist möglich, wie in Abb. [44] dargestellt.

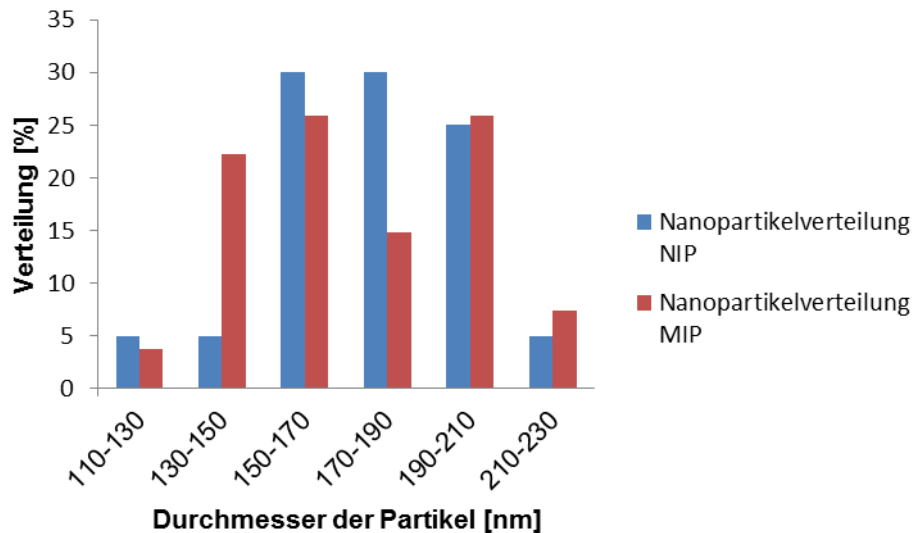


Abbildung 44: Größenverteilung der MIP und NIP Nanopartikel

Für die Größenverteilung wurden zwanzig AFM Bilder mit 10 μm Scangröße aufgezeichnet und die Größe der Partikel gemessen. Die Daten wurden prozentuell ausgewertet, da die Menge der Nanopartikel auf jedem Bild unterschiedlich war.

Mittels QCM Sensoren sollte geklärt werden, ob MIP- und NIP-NP zu unterschiedlichen Sensoreffekten führen, das Ergebnis ist in Abb. [45] dargestellt

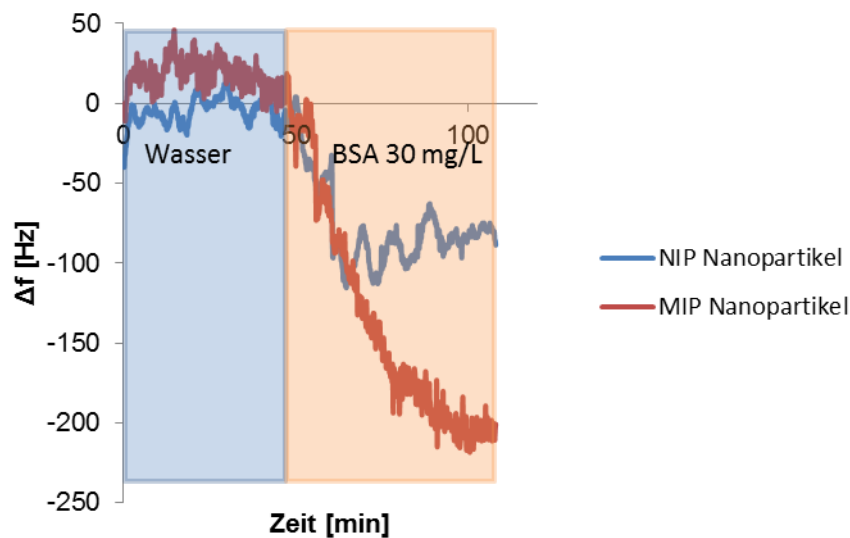


Abbildung 45: QCM-Sensorantwort eines So-VP-NP Sensors; Signal 30 mg/L BSA 100Hz.

Als Analytlösung wurde eine 30mg/ml BSA Lösung in Wasser gewählt um einen guten Vergleich zu den hergestellten Polymerschichten zu bekommen. Hierbei zeigte sich eine Signaldifferenz von 100 Hz zwischen geprägten und nicht geprägten Polymernanopartikeln. Dies zeigt, dass es möglich ist, mittels So-VP-Methode BSA-sensitive Nanopartikel darzustellen. Das Sensorsignal ist aber um einen Faktor 0.75 geringer als bei der Messung mit der Schicht, auch das Rauschen ist mit 10 Hz höher. Außerdem können Nanopartikel durch hohe Pumpengeschwindigkeiten entfernt werden.

3.3.6. Kontrollpolymer

Wie in 2.3.2.1 beschrieben, wurde eine alternative Rezeptur eines Polyacrylats mit der So-VP Methode getestet. Der Quervernetzer dieses Polymers ist ident, jedoch wurden die funktionellen Monomere geändert. Acrylsäure sowie Vinylpyrrolidon wurden anstelle von MAA und N-3-DMPA verwendet. Die Messung des Kontrollpolymers ist in Abb. [46] dargestellt.

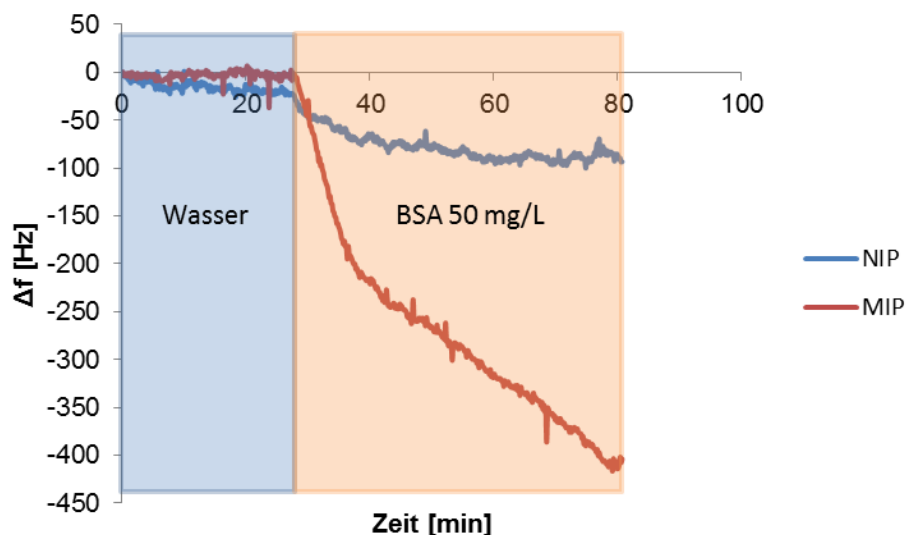


Abbildung 46: QCM-Sensorantwort So-VP Kontrollpolymer. 50mg/L BSA Lösung; 300 Hz Signaldifferenz; Waschschrift Essigsäure

Diese Messung zeigt, dass die Prägemethode auch auf andere Acrylatsysteme anwendbar ist. Das Messsignal ist zwar geringer als beim Polymer mit Methacrylsäure als funktionellem Monomer, dafür ist die Messzeit deutlich verringert. Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde dieselbe Konzentration ein weiteres Material bestimmt wie in Abb. [47] dargestellt.

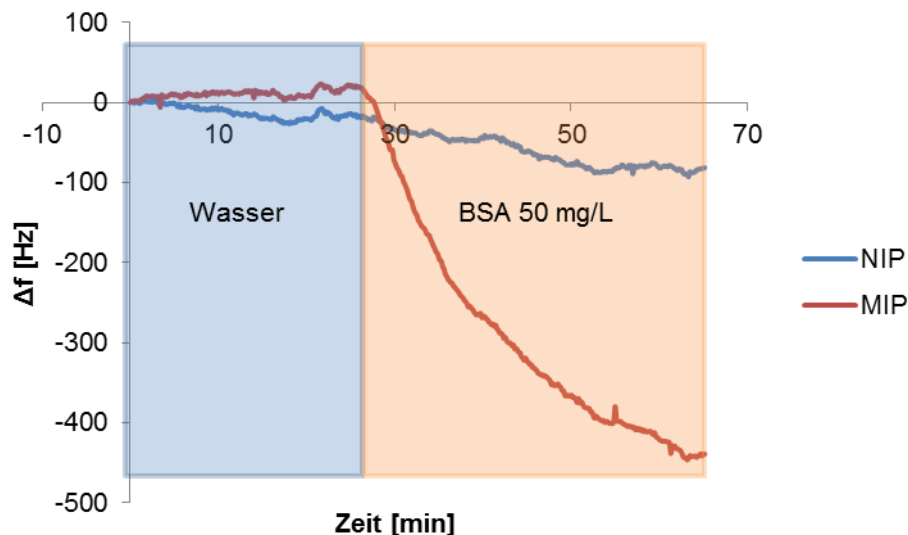


Abbildung 47: QCM-Sensorantwort So-VP Kontrollpolymer. 50mg/L BSA Lösung; 320 Hz Signaldifferenz; Waschschrift Essigsäure

Auch bei diesem Acrylat zeigt sich, dass mittels So-VP Methode reproduzierbare Sensoren dargestellt werden können.

3.3.7. Living Radical Polymerisation

Radikalische Polymerisation ist eine unkontrollierte Polymerisationsmethode. Durch Kontrolle der Reaktionsbedingungen könnten Polymere hergestellt werden, die definiertere Eigenschaften besitzen, daher auch in der Theorie besser für molekulares Prägen geeignet wären. Eine mögliche Strategie zu diesem Zweck ist die lebende radikalische Polymerisation (engl.: living radical polymerization; LRP). Dabei gibt man der Reaktionsmischung einen Mediator zu, der einen Übergangskomplex bildet und so die Menge der freien Radikale reduziert.

Das Problem besteht bei Proteinen wieder in der limitierten Auswahl von möglichen Mediatoren für die radikalische Polymerisation. Es wurde in einem ersten Schritt versucht, die Polymerisation durch Zugabe von Kupfersalzen in verschiedenen Oxidationsstufen zu kontrollieren, wie bereits in der Literatur unter anderen Bedingungen beschrieben¹¹⁰. Zusätzlich wurde tert-Butanol verwendet, alle Mediatoren sind in der nachfolgenden Tabelle [7] zusammengefasst.

Kupfermediator	Substanz	Menge	Ergebnis
Cu (0)	Kupferdraht	---	kein Unterschied
tert-BuOH	t-BuOH	1µl	kein Unterschied
Cu (II)	Cu(II)Br	10 mg	Zerstörung des Quervernetzlers
Cu (I)	Cu(I)S	10 mg	Siehe Abb. [48]; [50]

Tabelle 7: Verwendete Oxidationsstufen des Kupfers zur LRP

Das Kupfer wird zu dem in 2.3.2 beschriebenen Reaktionsgemisch hinzugegeben und dann mittel So-VP Methode hergestellt. Im Gegensatz zur radikalischen Polymerisation (RP) kommt es bei der LRP zu keiner Färbung der Oligomerlösung. Nach einer Stunde wurde die Polymerisation daher abgebrochen und anschließend mittels So-VP Methode ein Sensor hergestellt. Der Sensor wurde mit 50 mg/L BSA getestet diese Messung ist in Abb. [48] dargestellt.

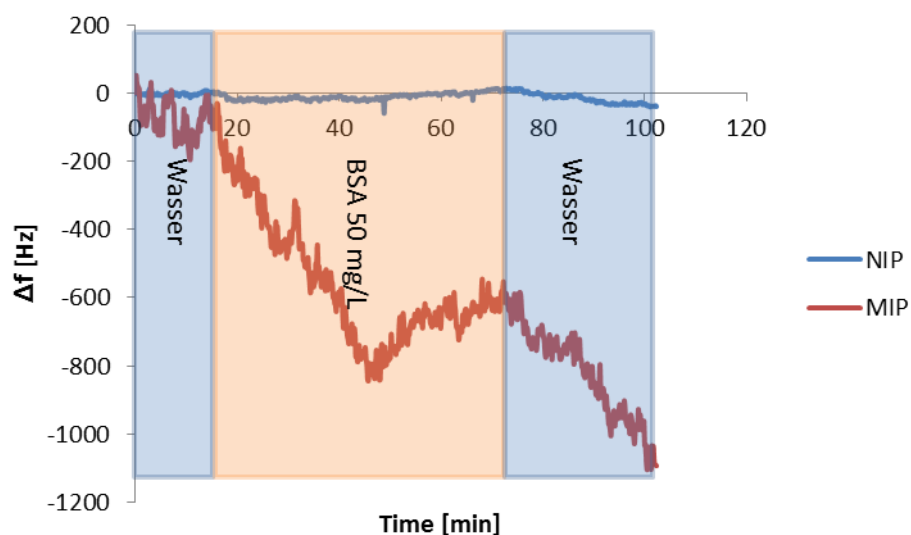


Abbildung 48: QCM-Sensorantwort eines LRP So-VP Sensors; MIP~600Hz NIP~0Hz; kein Waschschrift

Das BSA-Signal von 600 Hz ist wesentlich höher, als das Sensorsignal von 320 Hz bei RP. Wenn man MIP und NIP getrennt betrachtet, gibt der MIP bei RP und LRP eine Frequenzänderung von ~ 600 Hz. Hingegen gibt der NIP bei LRP in dieser Messung keine Frequenzänderung. Dieser Effekt kann durch eine weitaus definierte NIP Oberfläche bei der LRP erklärt werden. Jedoch ist das Rauschen merklich höher (20 Hz), auch kann der Analyt nicht durch Waschen entfernt werden, es kommt sogar zu einer Frequenzerniedrigung. Dies könnte durch ein erhöhtes Aufquellen des Polymers erklärt werden, auch das erhöhte Rauschen am MIP deutet darauf hin. Um diese Methode weiter zu testen, wurde ein weiterer Sensor hergestellt und 30 mg/L gemessen. Die Sensorantworten der einzelnen Elektroden der beiden Messungen sind in Abb. [49] dargestellt.

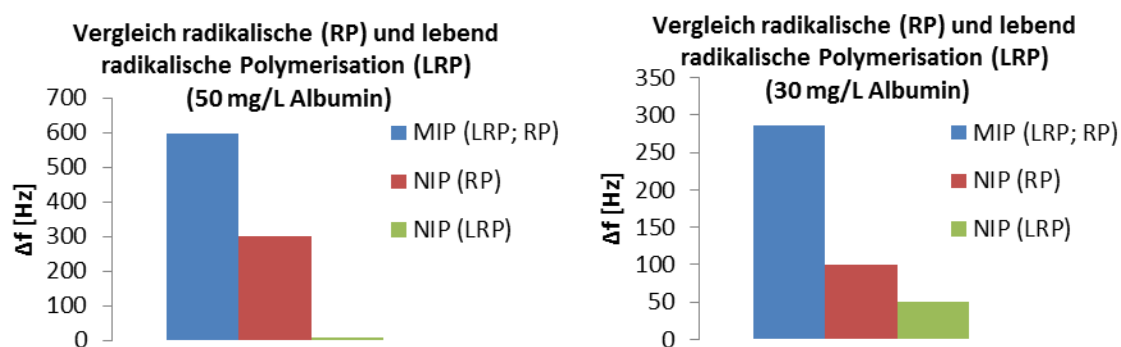


Abbildung 49: Vergleich RP und LRP So-VP bei 50 mg/L BSA (links) und 30 mg/L BSA (rechts)

Interessant ist die Steigerung des NIP Signals bei 30 mg/L gegenüber 50 mg/L. Da es sich um zwei verschiedene Ansätze handelte, auf zu verbessernde Reproduzierbarkeit des Polymerisationsprozesses hindeutet. Die Problematik des hohen Rauschens und der Reproduzierbarkeit kann auf die zu geringe Polymerisationszeit zurückgeführt werden. Im Gegensatz zur RP, bei es zu einer Trübung des Polymers kommt, konnte diese bei LRP nicht beobachtet werden, und die Polymerisation wurde einfach nach einer Stunde abgebrochen. Aus diesem Grund wurde die Polymerisationszeit der LRP verlängert. Nach fünf Stunden war die Oligomerlösung noch immer nicht trüb geworden. Um den Effekt der Zeit näher zu untersuchen wurde die Polymerisation abgebrochen und die vorpolymerisierte Lösung zur Herstellung eines So-VP Sensor verwendet. Abbildung [50] zeigt das Ergebnis für dieses Schichtmaterial.

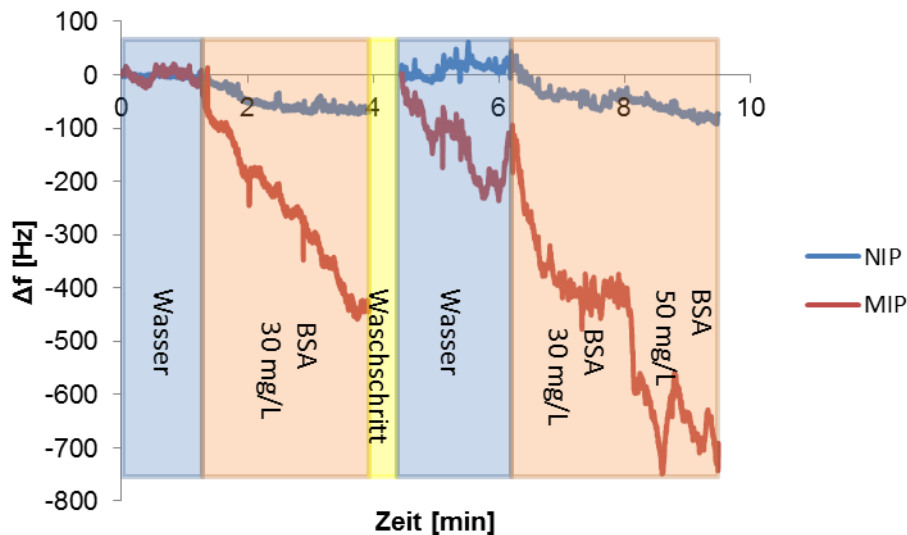


Abbildung 50: QCM-Sensorantwort eines LRP So-VP Sensors; MIP~500Hz NIP~50Hz; Waschschrift: Essigsäure

Wie in den vorherigen Messungen ist der Unterschied zwischen MIP und NIP bei der LRP sehr groß, bei dieser Messung ist auch das Rauschverhalten des Sensors während der ersten Messung mit 5 Hz gering. Nach dem Waschen ist jedoch das Signal nicht mehr stabil, dies deutet darauf hin, dass die Sensoroberfläche weitaus schneller abbaut als bei der RP.

3.3.8. RAFT Polymerisation

Als weitere Alternative wurde ein RAFT¹¹¹ (Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer Polymerization) Prozess versucht. Hierzu wurde zu dem Polymerrezept in [2.3.2] 7 mg Cyanomethyl dodecyltrithiocarbonat hinzugefügt und ein So-VP Sensor hergestellt. Die Strukturformel ist in Abb. [51] dargestellt.

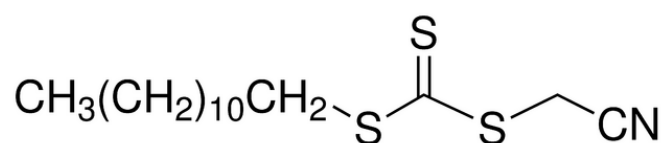


Abbildung 51: Strukturformel Cyanomethyl dodecyltrithiocarbonat

Dieses RAFT Reagenz beeinflusste die Reaktionszeit nicht merklich, es bildete sich eine trübe Flüssigkeit aus. Die QCM-Sensorantwort ist in Abb. [52] dargestellt.

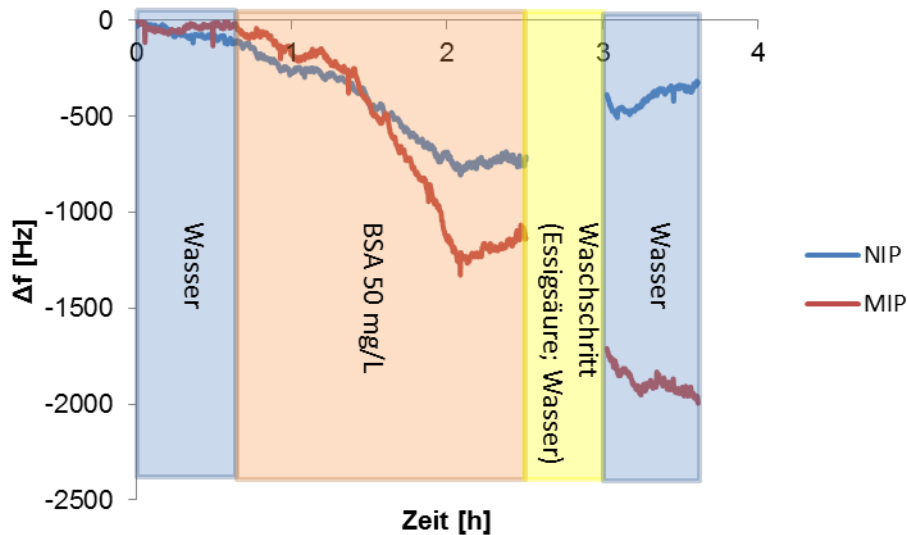


Abbildung 52: QCM-Sensorantwort eines RAFT So-VP Sensors; Sensorsignal ~500Hz 50 mg/L

Das Signal ist mit 500 Hz zwar zufriedenstellend, doch zeigt diese Methode sehr viele Nachteile. Bei der RAFT Methode ist der Unterschied zwischen MIP und NIP geringer, die unspezifische Frequenzänderung sehr groß. Der Sensor kann durch einen Waschschrift nicht regeneriert werden. Beim Vergleich der beiden Methoden ist aber die LRP Methode mit Cu dieser RAFT Methode für weitere Entwicklungen nach derzeitigem Standpunkt vorzuziehen.

BSA Immobilisierung

3.4. Aminofunktionalisierung

3.4.1. Ethanolamin

Siliziumwafer wurden mittels der Ethanolaminmethode präpariert, wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben. Das ATR-IR in Abb. [53] dargestellt zeigt das Ergebnis dieser Vorgehensweise.

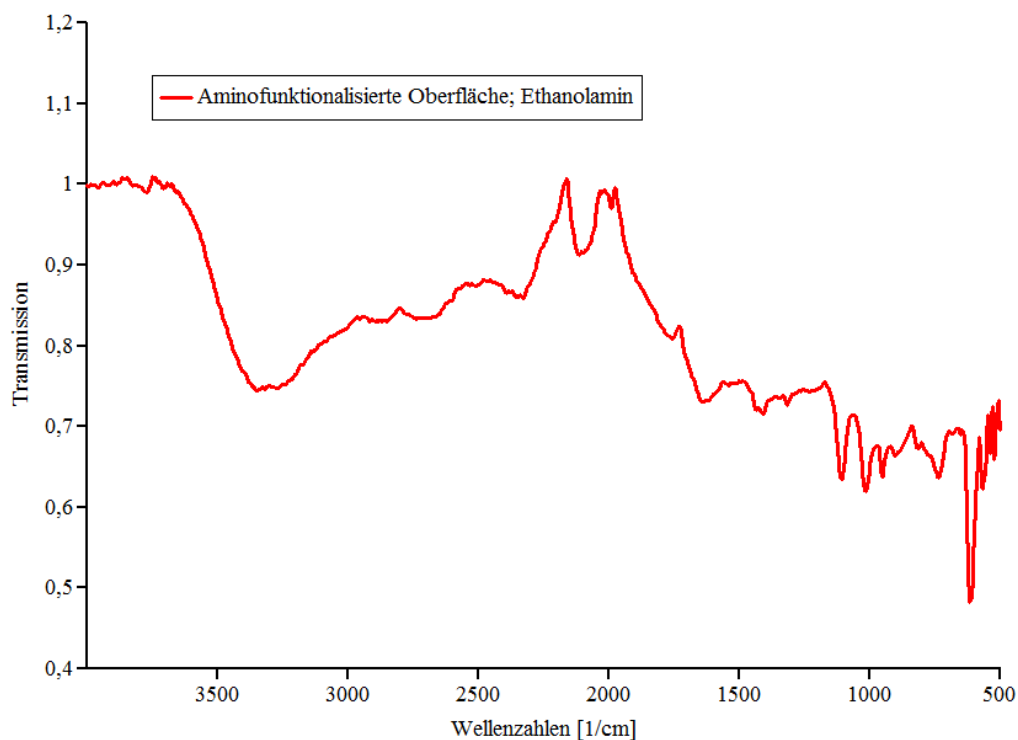


Abbildung 53: ATR-IR Transmissionsspektrum einer mit Ethanolamin modifizierten Oberfläche (rot), 3500-3000 cm⁻¹: Aminogruppe

Es zeigte sich eine deutliche Bande bei 3500-3000 cm⁻¹, das bedeutet eine erfolgreiche Aminofunktionalisierung der Oberfläche. Eine weitere Kontrollmessung brachte keine neuen Ergebnisse, dass Spektrum ist zum größten Teil nicht vom

ersten zu unterscheiden. Dieses Spektrum ist in Abb. [54] dargestellt. Die Plättchen werden bis zur IR Messung in Argonatmosphäre gelagert, um Reaktionen von Luftmolekülen mit der modifizierten Oberfläche zu vermeiden.

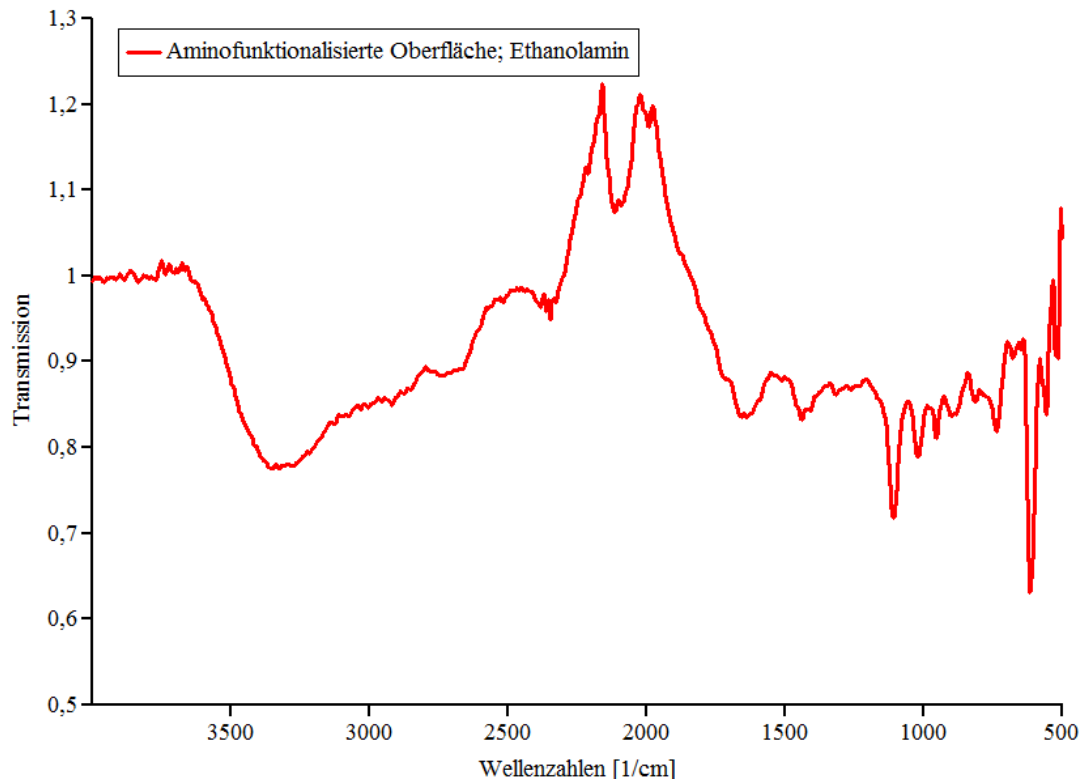


Abbildung 54: ATR-IR Transmissionsspektrum einer mit Ethanolamin modifizierten Oberfläche (rot), 3500-3000 cm^{-1} : Aminogruppe

Weitere Proben zeigten ebenfalls dasselbe Infrarotspektrum. Bei dieser Methode bildete sich bei zunehmendem Alter des Ethanolamins ein schwer abwaschbarer Film auf dem Siliziumwafer, es ist daher darauf zu achten, die Chemikalien so wasserfrei wie möglich zu lagern. Diese Methode zeigte bereits in der Literatur für AFM Spitzenmodifikationen sehr gute Erfolge¹⁰⁴, und wurde daher weiter verwendet.

3.4.2. APTES

Als alternative Methode zur Aminofunktionalisierung wurde die Silanisierung mittels Aminotriethoxysilan (APTES) auf einem Siliziumwafer durchgeführt. Die Funktionalisierung wurde mittels FTIR überprüft wie in Abb. [55] dargestellt.

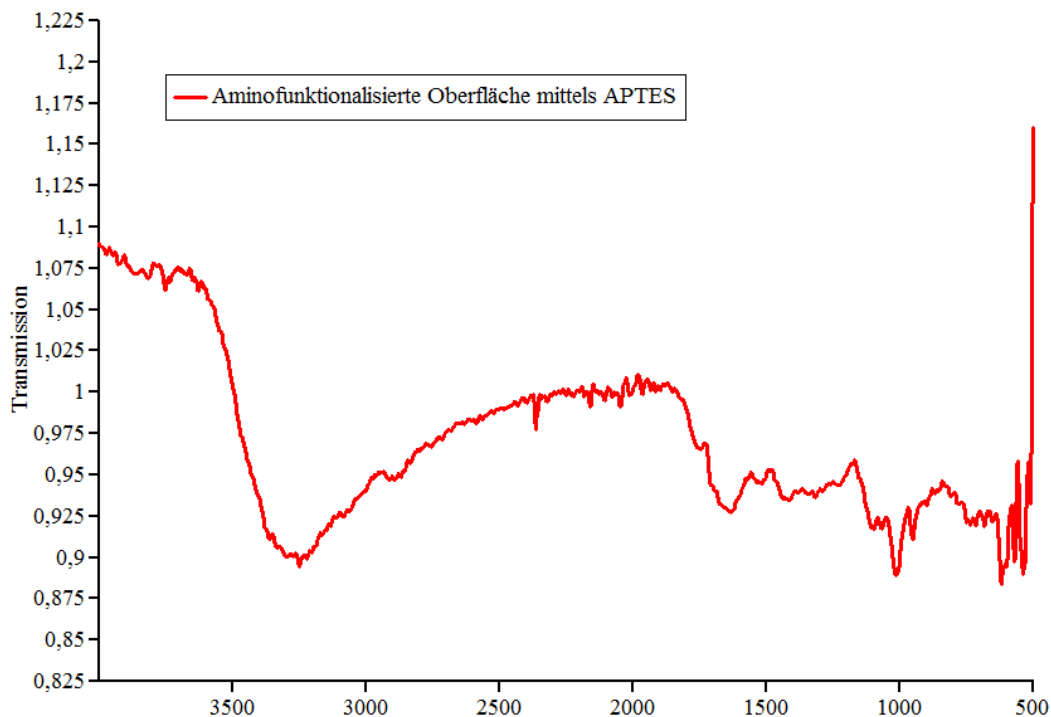


Abbildung 55: ATR-IR Transmissionsspektrum einer mit APTES modifizierten Oberfläche (rot), 3500-3000 cm^{-1} : Aminogruppe

Es ist ein Unterschied zu einem nicht modifizierten Siliziumwafer zu erkennen, besonders in der Region von 3500-3000 cm^{-1} , was ein Hinweis auf Aminogruppen auf der Oberfläche ist. Es ist also möglich mittels APTES eine aminofunktionalisierte Oberfläche darzustellen, dennoch wurde die Methode mit Ethanolamin vorgezogen, da die Substanz wesentlich kostengünstiger ist und bereits Modifizierungen von AFM-Spitzen mittels Ethanolamin durchgeführt wurden. Auch traten weitere Problematiken auf: An der Siliziumoberfläche bildete sich im Gegensatz zu Ethanolamin ein klebriger Film, der jedoch abgewaschen werden konnte. Bei Ethanolamin konnte derselbe Effekt bei späteren Versuchen festgestellt werden als die Chemikalie schon länger der Raumluft ausgesetzt war. Beide Substanzen sind

wasserempfindlich, es dürfte sich um ein Alterungsproblem handeln. Die vollständige Bildung eines APTES-SAM hängt außerdem von sehr vielen Faktoren ab, wie bei Zhang et. al. beschrieben¹¹².

3.4.3. Cysteamin

Auf Gold sind aufgrund der fehlenden Hydroxygruppen an der Oberfläche die beiden oben beschriebenen Methoden nicht durchführbar. Um die erfolgreiche Aminofunktionalisierung analog zum Siliziumwafer mittels ATR-IR zu beobachten, wird eine Funktionalisierung mittels Cysteamin auf einem mit Gold beschichteten Glasplättchen durchgeführt. Das Gold wird auf die Oberfläche mittels sputtern aufgebracht, um die Rauheit zu minimieren. Wieder zeigt sich im Vergleich zur nicht funktionalisierten Oberfläche eine klare Änderung im Bereich der Aminobande, dieser Vergleich ist in Abb. [56] dargestellt.

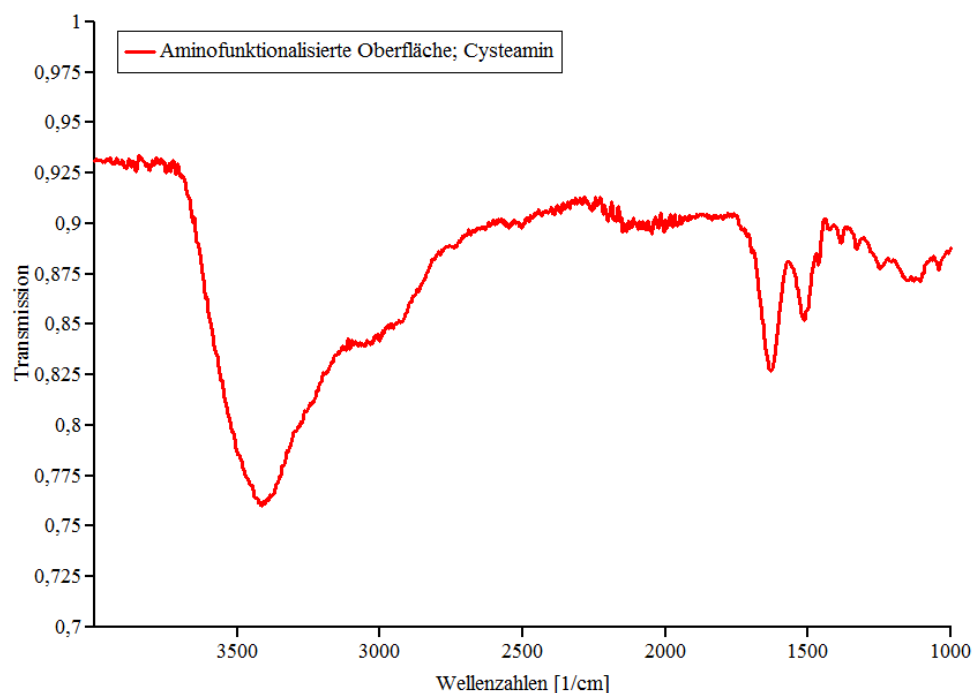


Abbildung 56: ATR Spektrum der Immobilisierung von Cysteamin auf Gold
3500-3000 cm^{-1} : Aminogruppe

3.5. BSA Immobilisierung

3.5.1. Glutaraldehyd

Zur Kontrolle der Bindung des Glutaraldehyds an die aminofunktionalisierte Oberfläche wurde ein Siliziumplättchen unter sanftem Argonstrom getrocknet und ein FTIR-Spektrum aufgenommen, dieses ist in Abb. [57] dargestellt.

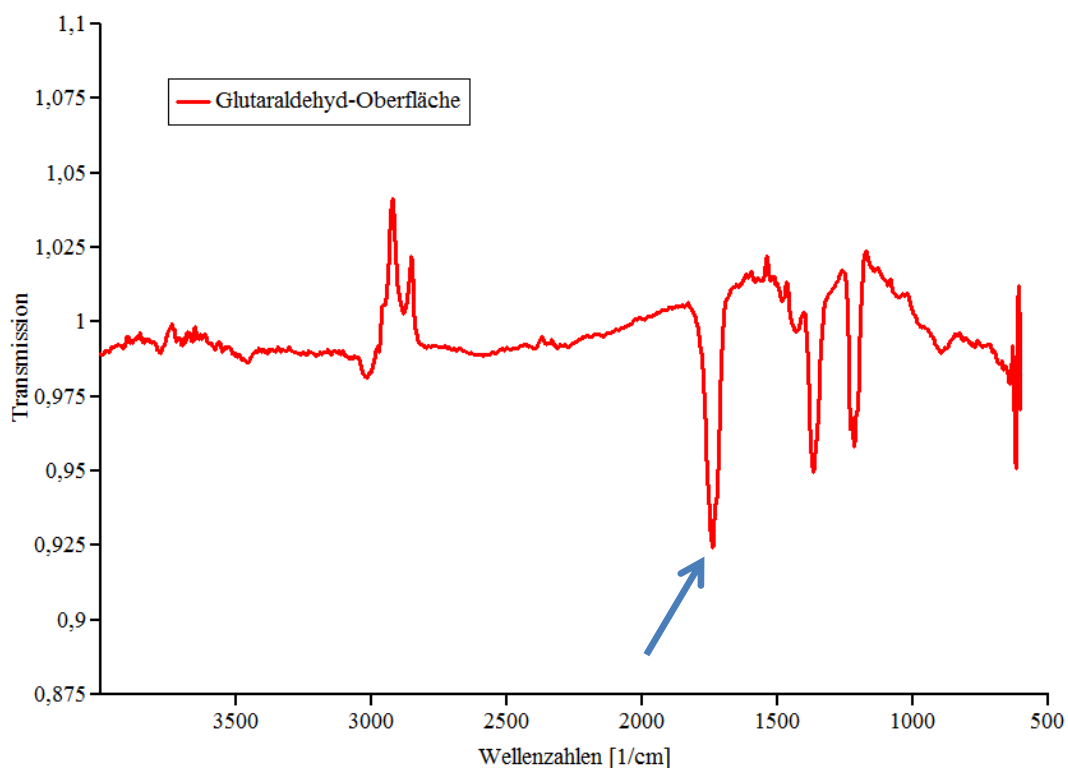


Abbildung 57: ATR Spektrum Glutaraldehyd Immobilisiert; 1800 cm^{-1} C=O Schwingung

Hier lässt sich eindeutig erkennen, dass das Signal der Aminogruppe verschwunden ist, dies zeigt die erfolgreiche Reaktion. Die C=O Bande bei 1800 Wellenzahlen zeigt die erfolgreiche Immobilisation des Glutaraldehyds.

3.5.2. Immobiliertes BSA

Nach der Funktionalisierung des BSA wird ein IR-Spektrum aufgenommen, dies ist in Abb. [58] dargestellt.

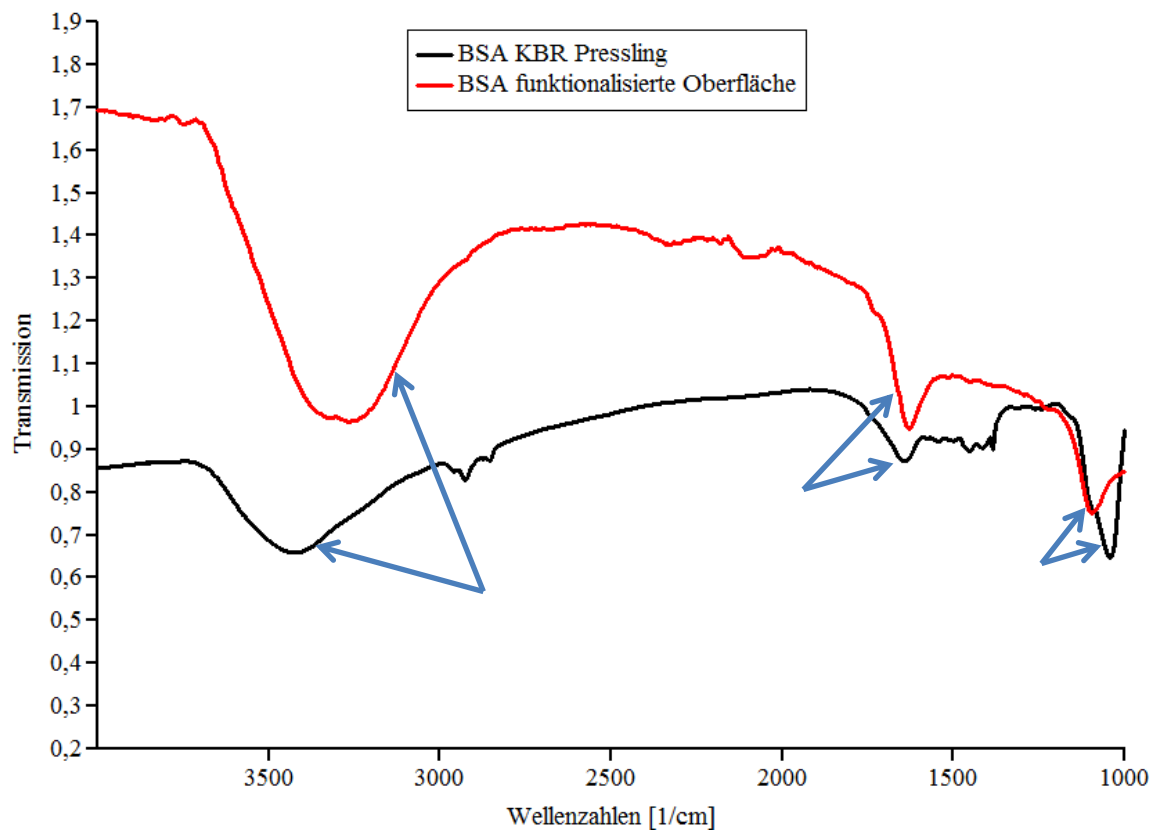


Abbildung 58: ATR-IR Transmissionsspektrum einer mit BSA modifizierten Oberfläche (rot), sowie eines BSA-KBr-Presslings: 3500-3000 cm⁻¹: Aminogruppe; Hydroxygruppe; 1800 cm⁻¹: C=O Schwingung

Es zeigte sich zwar ein unterschiedliches Spektrum zu einer nicht immobilisierten Oberfläche und zur aminofunktionalisierten Oberfläche, es ist jedoch alleine aus dem Oberflächenspektrum nicht ersichtlich, dass es um BSA handelt. Die Aufnahme eines Vergleichsspektrums in Wasser war nicht möglich jedoch konnte ein BSA-KBr-Pressling hergestellt werden, und viele der Peaks in dem Spektrum gefunden werden. Die BSA Immobilisierung war also erfolgreich. Natürlich da es sich bei der einen Methode um ein Oberflächen-IR und bei der anderen um ein Durchlicht-IR handelt kommt es nicht zu komplett identen Spektren.

3.5.3. BSA-Immobilisierung am QCM

Die Immobilisierung kann ebenfalls auf einer Quarzmikrowaage untersucht werden. Hierzu wurde die Eigenfrequenz des Quarzes am Netzwerkanalysator bestimmt und mit der Eigenfrequenz vor den Immobilisierungsschritten verglichen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. [8] dargestellt und zeigen eine Frequenzänderung von 571 Hz und 629 Hz zwischen Goldoberfläche und BSA-immobilisierter Oberfläche. Durch eine Massenanlagerung kommt es zu einer Frequenzerniedrigung, dadurch kann die Immobilisierung am Netzwerkanalysator beobachtet werden.

Elektrode A	
	Frequenz [Hz]
unbeschichtet	9879197
beschichtet	9878626
Differenz	-571
Elektrode B	
unbeschichtet	9912782
beschichtet	9912153
Differenz	-629

Tabelle 8: Frequenzmessungen vor und nach den Immobilisierungsschritten auf zwei verschiedenen Goldelektroden

Für weitere Untersuchungen wurden neue Quarzplättchen nach erfolgreicher Immobilisierung des Glutaraldehyd mit Wasser gewaschen, der Immobilisierungsschritt in-situ mittels QCM verfolgt, dies ist in Abb. [59] dargestellt.

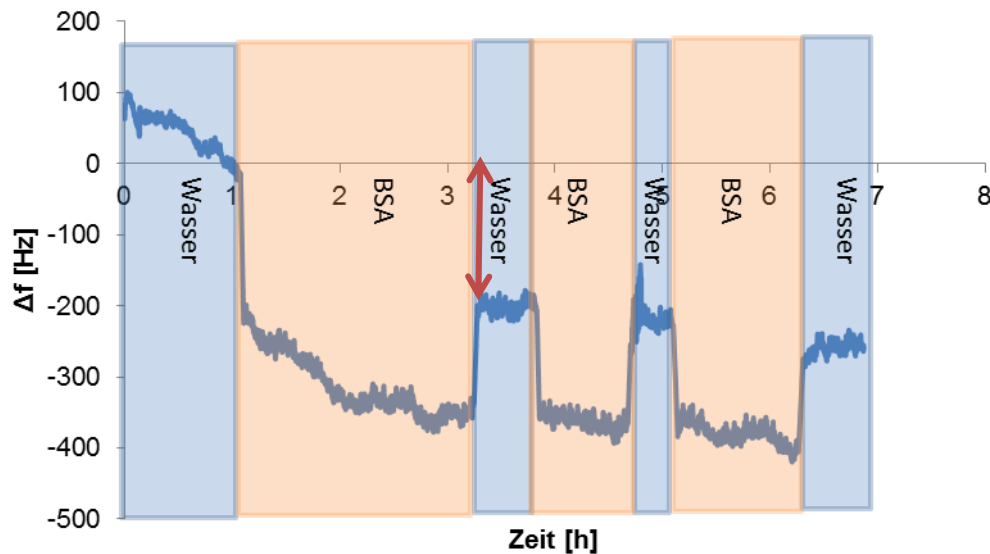


Abbildung 59: In Situ Messung der Immobilisierung von Bovinen Serum Albumin an funktionalisierter Oberfläche. Irreversibler Anteil von 197Hz

Es zeigte sich das nach Waschen mit Wasser die Basislinie nicht erreicht werden konnte. Der irreversible Anteil von 197 Hz deutet auf eine erfolgreiche Immobilisierung des BSA auf der Oberfläche der Quarzmikrowaage hin. Eine weitere Zugabe des BSA und ein weiterer Waschschrift ergab keine signifikante Änderung zur vorherigen Messung. Es zeigte sich jedoch ein Frequenzunterschied von 197 Hz nach zwei Stunden. Dies deutet auf eine Anlagerung des Albumins an die Quarzoberfläche hin. Danach kommt es nur noch zu einer leichten Frequenzreduktion, die aufgrund eines Signaldrifts oder der Bildung von Bi- oder Trimeren von BSA erklärt werden kann. Es zeigt sich also, dass eine Immobilisierung eines Proteins auch auf einer Goldoberfläche möglich ist und auch in-situ beobachtet werden kann.

3.5.4. BSA Immobilisierung an AFM-Spitzen

Um die erfolgreiche Immobilisierung nachzuvollziehen, kann die Resonanzfrequenz einer AFM Spitze bestimmt werden. Mit höherer Massebeladung kommt es wie bei einer Quarzmikrowaage zu einer Frequenzverminderung, was zum Beispiel für

Microcantilever ausgenutzt wird¹¹³. Hierzu wurde zuerst bestimmt, ob sich die Resonanzfrequenz durch einen Spitzentausch nicht ändert. Durch eine veränderte Laserposition oder Beschädigung der Spitze beim Tausch kann es zu einer Frequenzänderung kommen. Die Resonanzfrequenz einer TESPA Spitze der Firma Bruker wurde daher fünf Mal bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. [9] dargestellt.

Resonanzfrequenz der TESPA Spitze					
Frequenz [MHz]	286,2806	286,2987	286,2908	286,2823	286,2736
Mittelwert [Mhz]	286,2823 ± 0,009718				
	Frequenz [MHz]		Änderung [Hz]		
Frequenz unmod. Spitze	272,4599		-		
Frequenz nach Ethanolamin	272,145		-314		
Frequenz nach BSA	270,9794		-1480		

Tabelle 9: Frequenzmessungen zur Bestimmung eines Mittelwerts, sowie Immobilisationsversuche

Es zeigte sich, dass eine Änderung von 9,7 Hz vorliegt, wenn die Spitze getauscht wird. Gemäß des „drei Sigma“ Kriteriums muss sich die Frequenz daher mindestens um 29,1 Hz ändern, um von einer signifikanten Änderung und somit Immobilisierung zu sprechen. Eine TESPA Spitze wurde aminofunktionalisiert, anschließend gewaschen und getrocknet und ihre Resonanzfrequenz vor und nach dem Schritt bestimmt. Eine weitere TESPA Spitze wurde BSA modifiziert und ihre Resonanzfrequenz ebenfalls vor und nach dem Immobilisationsschritt bestimmt. Es zeigte sich hierbei eine Änderung von 319 Hz nach der Aminofunktionalisierung und 1480 Hz nach der BSA Immobilisation. Die einzelnen Ergebnisse sind ebenfalls in Tab. [9] dargestellt. Dies zeigt die erfolgreiche Immobilisierung von BSA auf dem Cantilever. Eine weitere Möglichkeit, die Immobilisation zu charakterisieren, besteht darin, die Oberfläche mittels AFM zu visualisieren. Da Proteine relativ weich sind, wurde der tapping mode gewählt, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Eine mit Protein funktionalisierte Oberfläche wurde im Rasterkraftmikroskop aufgenommen, dies ist in Abb. [60] dargestellt.

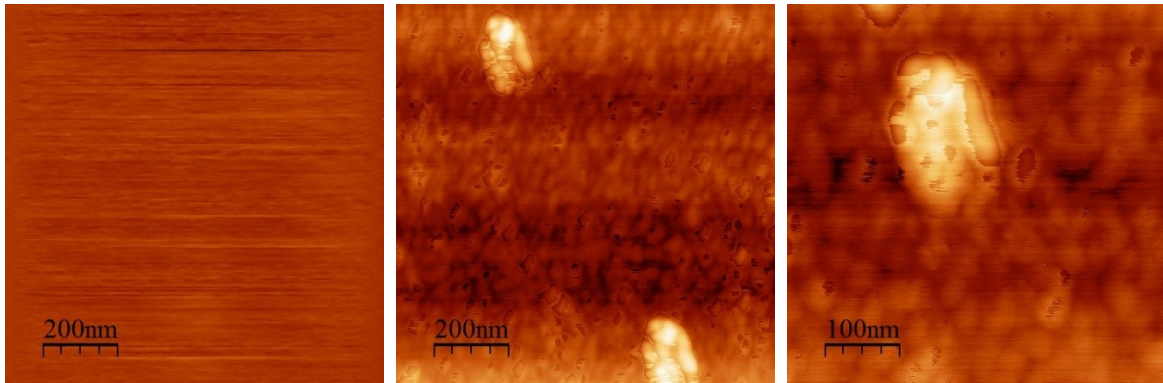


Abbildung 60: AFM Aufnahmen im Tapping Mode, von rechts nach links: unmodifizierter Silizium Wafer; BSA Immobilisiert auf der Oberfläche

Hierbei zeigte sich, dass bei einem Siliziumwafer bei dieser Immobilisierungsmethode nicht der gesamte Bereich mit dem Protein bedeckt ist. Es bildeten sich Inseln, was typisch für ein Inselwachstum von modifizierten Schichten ist. Es könnte daher bei dieser Methode zu erheblichen Problemen bei der Immobilisierung des BSA an die Spitze kommen. Man muss jedoch bedenken, dass die Oberfläche eines polierten Siliziumwafer sehr Glatt ist und daher die Funktionalisierung vielleicht gehemmt ist. Außerdem wurden Siliziumplättchen mit einer Fläche von mehreren Quadratmillimeter funktionalisiert, was eine erhebliche Fläche im Gegensatz zu mikroskopisch kleinen AFM Spitzen ist. Eine höhere Oberflächenbelegung des Proteins wurde daher nicht weiter verfolgt, da die Spitzen selbst auf die erfolgreiche Funktionalisierung überprüft werden können. Ein dreidimensionales Bild der oben dargestellten AFM Aufnahmen ist in Abb. [61] dargestellt.

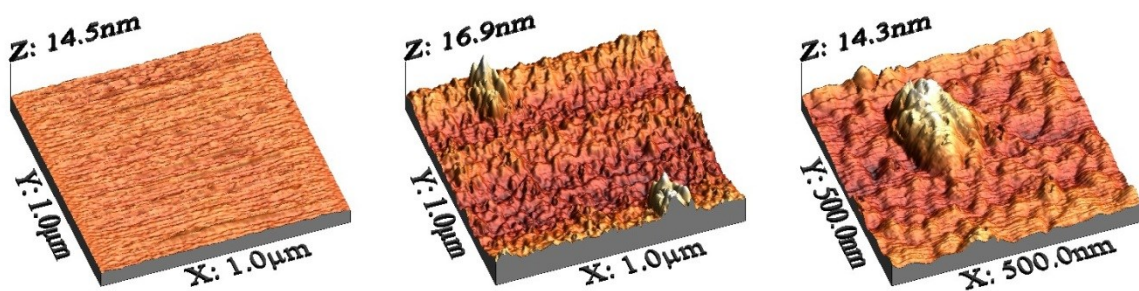


Abbildung 61: AFM Aufnahmen im Tapping-Mode 3D Darstellungen, von rechts nach links: unmodifizierter Silizium Wafer; BSA immobilisierte Oberfläche

Untersuchung der Polymeroberflächen mittels Peak Force QNM

3.6. Vorbereitung Peak-Force-QNM

Die Visualisierung der Polymeroberfläche ist durch die Rauheit des Polymers und dem vergleichsweise sehr kleinem Analyten eine schwierige Aufgabe. Alleine durch das Höhenprofil der Oberfläche kann keine Aussage über die Funktionalität der molekularen Prägung getroffen werden. Mittels Peak-Force-QNM können aber zusätzliche Parameter bestimmt werden, über die neue Erkenntnisse gewonnen werden können. Zur Untersuchung mittels Kraft-Abstands-Kurven muss zuerst die Kraftkonstante des Hebelarms (cantilever) bestimmt werden. Wie in der Theorie beschrieben, ist die Kraftkonstante gemäß des Hook'schen Gesetzes notwendig um die Kraft zwischen Oberfläche und Spitze zu bestimmen. Im ersten Schritt muss zuerst die Sensitivität der Auslenkung des Laserlichts bestimmt werden. Hierzu wird mittels des „Ramp“ Befehls eine Kraft-Abstands-Kurve aufgenommen. Im linear steigenden Bereich ist die Spitze vollständig in Kontakt mit der Oberfläche. Dieser Bereich wird mittels zwei Markern ausgewählt und die Sensitivität der Ablenkung automatisch mittels Knopfdruck bestimmt. Dieser Parameter muss neu definiert werden, wenn sich der Pfad des Laserlichts ändert oder eine neue Spitze verwendet wird¹¹⁶. Eine Beispielkurve, aufgenommen auf einer Glasoberfläche, sowie die Auswahl des linearen Bereichs ist in Abb. [62] dargestellt.

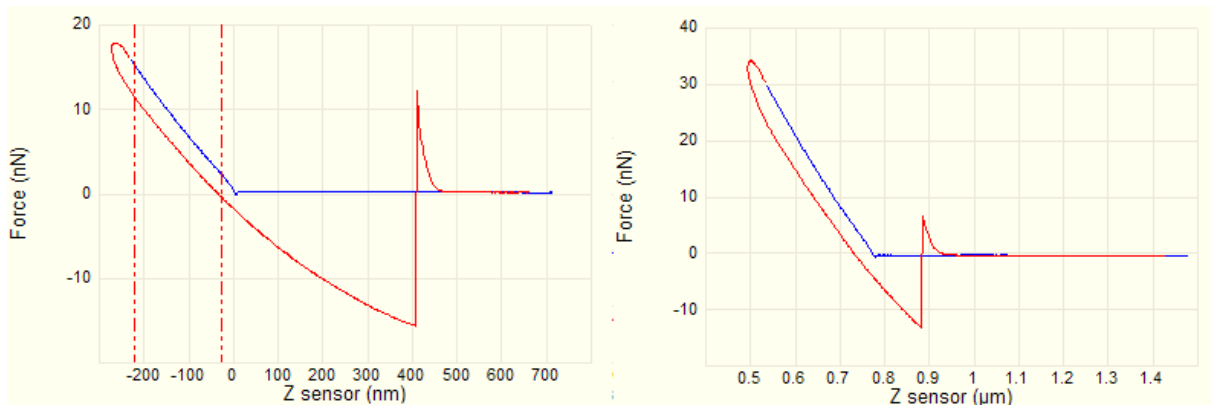


Abbildung 62: Kraft-Abstands-Kurve auf einer Glasoberfläche, zwischen den beiden Markern wird die Sensitivität der Ablenkung des Laserlichts bestimmt. Rechts: vorher; links: nachher

Die Unterschiede in der Z-Achse zwischen Annäherung und Entfernung der Spitze kann durch die Hysterese des piezoelektrischen Materials erklärt werden. Dieser Effekt kann bei AFM zu einer Qualitätsminderung des bildgebenden Verfahrens führen¹¹⁴. Hysterese charakterisiert ein auf die Eingangsgröße bezogenes verzögertes Verhalten der Ausgangsgröße. Allgemein formuliert, handelt es sich um ein Systemverhalten, bei dem die Ausgangsgröße nicht allein von der unabhängig veränderlichen Eingangsgröße, sondern auch von dem vorherigen Zustand der Ausgangsgröße abhängt. Abb. [63] zeigt eine Hysteresekurve eines ferromagnetischen Materials, wobei die erstmalige Magnetisierung in blau, der Ablauf nach wechselseitiger Magnetisierung grün dargestellt ist. Magnetisierung ist ein klassisches Beispiel für Hystereseverhalten, dies wird z.B. bei Kassetten ausgenutzt.

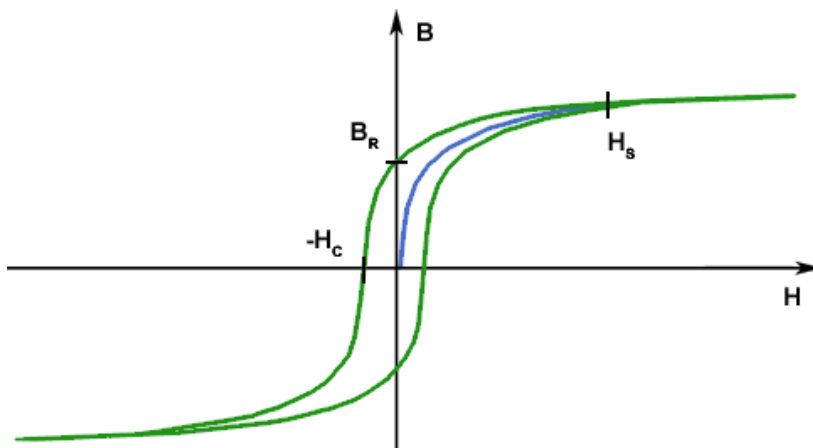


Abbildung 63: Hysteresekurve eines ferromagnetischen Materials¹¹⁵

Nachdem die Sensitivität der Deflektion des Laserlichts bestimmt wurde muss die Kraftkonstante mittels thermal tune Methode bestimmt. Hier wird die Kraftkonstante aus der mechanischen Antwort des Hebelarms auf thermisches Rauschen bestimmt. Die Methode misst die Fluktuation des Cantilevers in Abhängigkeit der Zeit und mittels Fouriertransformation erhält man ein Frequenzspektrum. Diese schnelle und einfache Methode ermöglicht eine verlässlichere Darstellung und Messung von Kraft-Abstands-Kurven, da der bestimmte Wert der Kraftkonstante zur Bestimmung der Kraft-Abstands-Kurven herangezogen wird. Aus einer angepassten Kurve wird mithilfe einer Funktion die Kraftkonstante in Luft oder in Flüssigkeit bestimmt. Üblicherweise liegt der Wert ungefähr 8% unter dem realen Wert, deswegen wird ein Korrekturfaktor angewandt¹¹⁶. Für genaue praktische Ausführung verweise ich auf das Nanoscope Picoforce Handbuch, das Peak-Force-QNM Handbuch beziehungsweise andere praktische Hilfestellungen auf die Bruker Webseite. Eine thermische Bestimmung des cantilevers mittels thermal tune ist in Abb. [64] dargestellt.

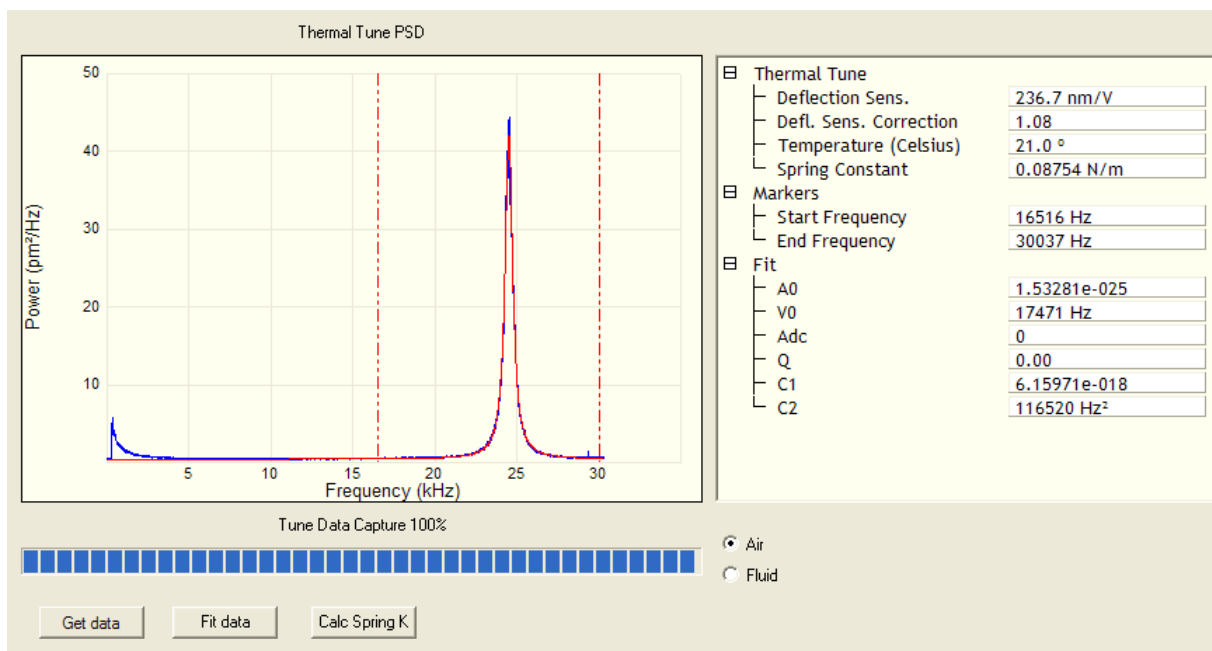


Abbildung 64: Nanoscope IVa Thermal Tune Methode

3.7. Auswahl des Messpunktes

Um einige Überlegungen zur Probennahme zu verdeutlichen ist eine Modellfläche in Abb. [65] dargestellt.

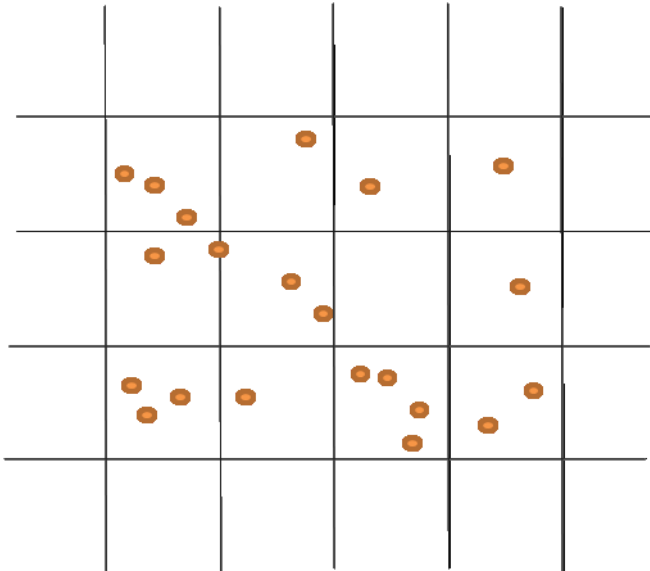


Abbildung 65: Modellrasterfläche mit Analyt und zufälliger Verteilung

Wenn man sich eine Modelloberfläche wie oben vorstellt, ist der Analyt wahrscheinlich nicht komplett gleichmäßig verteilt, vor allem da nur ein kleiner Ausschnitt der Gesamtoberfläche betrachtet werden kann. Je nachdem in welchem der Quadrate man misst, erhält man eine unterschiedliche Anzahl an positiven Resultaten. Eine Strategische Rasterung von rechts nach links und von oben nach unten ergibt keinen Sinn, da große Teile der Oberfläche unter Umständen gar kein positives Signal zeigen können. Daher ist es wichtig für die Messungen möglichst zufällige Punkte auf der Oberfläche zu wählen. Dadurch wird gewährleistet, dass nicht nur ein kleiner Teil sondern ein Querschnitt der gesamten Oberfläche abgedeckt wird.

3.8. Elastizitätsmodul

Mittels Kraft-Abstands-Kurven und Peak-Force-QNM ist es möglich die Steifheit des elastischen Materials zu bestimmen. Dies ist einerseits interessant um die Materialeigenschaften des Polyacrylates zu bestimmen, andererseits müsste der Elastizitätsmodul von Albumin und Polymer unterschiedlich sein, diese Methode könnte also zur Visualisierung von BSA dienen. In einem ersten Schritt soll der Elastizitätsmodul des Acrylats bestimmt werden. Zu diesem Zweck wird das Young'sche Modul des NIP bestimmt. Mittels Rasterkraftmikroskopie kann eine gute dieser sehr gut bestimmt werden. Zur Bestimmung dieses Moduls ist es erforderlich bereits eine gute Schätzung über die mechanischen Eigenschaften des Materials zu besitzen um die richtige AFM-Spitze auszuwählen, wie aus Tabelle [10] ersichtlich ist.

Elastizitätsmodul	Spitze
<20 MPa	ScanAsyst Air
5-500 MPa	Tap150A
200 MPa – 2 GPa	RTESPA; TESPA
1-20 GPa	Tap525
>10 GPa	DNISP-HS

Tabelle 10: Empfohlene Spitzen zur Determinierung des Moduls¹¹⁷

Für sehr weiche Materialien wie PDMS mit einem Modul von 2,5MPa wird von Bruker zum Beispiel eine „ScanAsyst-Air“ Spitze mit einer Kraftkonstante von 0,4 N/m empfohlen. Polymergemische wie Polystyren und Polypropylen weisen ein Elastizitätsmodul von 3-3,5 bzw 1,5-2 GPa auf. Es ist anzunehmen, dass ein Acrylatsystem, selbst wenn für geprägte Polymere meist ein hoher Anteil von Quervernetzer verwendet wird, im selben Bereich liegt. Zur Bestimmung des Moduls einer Polystyrenoerfläche wird eine „TESPA“ Spitze empfohlen. Daher wurde eine dieser zur Bestimmung des Moduls verwendet, sie weist eine Kraftkonstante von 20-40 N/m bei einer nominellen Eigenfrequenz von 320 kHz auf. Die Kalibrierung des Spitzenradius fand auf einer standardisierten Polypropylenoberfläche der Firma

Bruker statt. Wurde der Spitzenradius kalibriert, kann mit der Messung an der unbekannten Oberfläche begonnen werden. Es zeigt sich, dass die Polymeroberfläche eine Rauheit von 40nm besitzt, dies verursacht auch eine Streuung der Werte des Young'schen Moduls wie auch in Abb. [66] gezeigt wird.

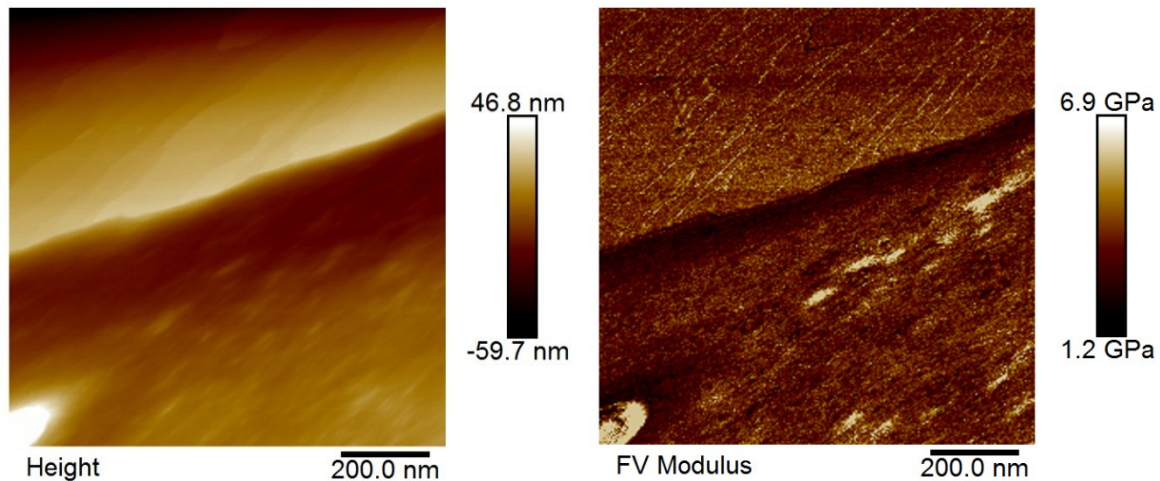


Abbildung 66: Nicht geprägtes Polyacrylat; rechts: Polymeroberfläche; links: Young'sches Modul der dargestellten Oberfläche

Dies könnte an aber auch an der unkontrollierten radikalischen Polymerisation liegen. Sieht man sich die Werteverteilung in Abb. [67] an, zeigt sich eine starke Streuung. Diese starke Wertstreuung kann an jedem Punkt beobachtet werden der Mittelwert ist jedoch konsistent. Jedoch ist aufgrund der hohen Verteilung eine Visualisierung des BSA nicht möglich, diese Methode wurde daher nicht verwendet.

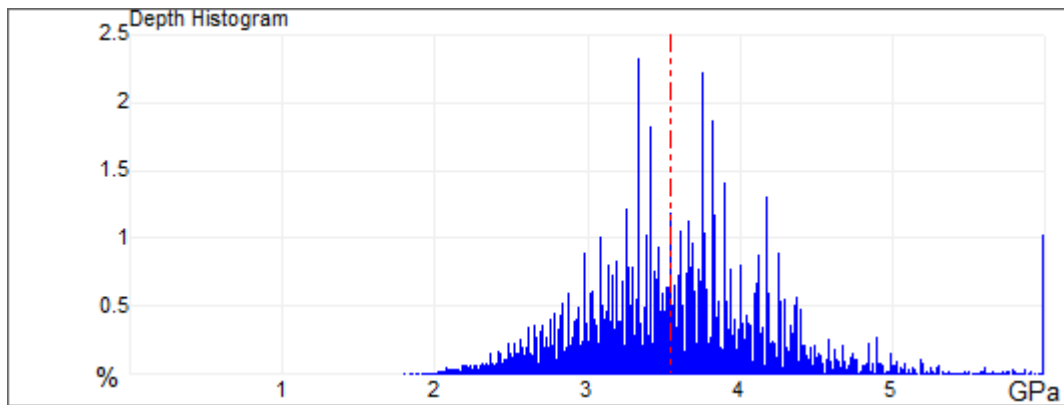


Abbildung 67: Werteverteilung des Youngschen Moduls aus der vorherigen Abbildung.

Der Elastizitätsmodul wurde mittels drei AFM Aufnahmen bestimmt, dies ist tabellarisch aufgeführt.

	R^2	Young Modul [MPa]	Reduziertes Modul [MPa]
Average Fit	0,98958489	3505,442034	3852,132299
Std. Deviation	0,006909	669,7416764	735,9780228
Maximum	0,9989	6885	7566
Minimum	0,9487	1392	1529

Tabelle 11: Berechnungen des Youngschen Moduls der hergestellten Polymeroberfläche

Es zeigt sich wieder die starke Wertstreuung in der relativ hohen Standardabweichung, jedoch ist auch zu bedenken, dass eine Bestimmung mit AFM nicht so exakt wie mit anderen Methoden durchgeführt werden kann. Des Weiteren resultiert die radikalische Polymerisation in einem zwar relativ homogenen Polymer, die Masseverteilung ist aber höher als bei einem LRP-Polymer¹¹⁸. Diese Methode gibt jedoch eine gute Näherung und auch eine räumliche Darstellung des Elastizitätsmoduls. Das hergestellte Polyacrylat besitzt ein Young'sches Modul von 3,5 GPa. Bei der Berechnung des Elastizitätsmoduls spielt die Poissonzahl eine wichtige Rolle, welche die Längen- und Breitenänderung des Materials in Abhängigkeit einer externen Kraft beschreibt. Diese Materialkonstante war für das Polymer nicht bekannt, generell liegt sie zwischen 0,2 und 0,5. Für die Berechnung des Moduls wurde eine Poissonzahl von 0,3 herangezogen, da dies jener eines

generischen Polyacrylats entspricht. Da unser Polymer aber über einen höheren Anteil an Quervernetzer verfügt, sind die erhaltenen Werte für das Young'sche Modul mit Vorsicht zu betrachten. Für Vergleiche mit anderen Methoden sollte man daher eher das reduzierte Modul, welches die Poissonsahl nicht berücksichtigt, heranziehen. Der reduzierte Modul beträgt für das Polymer 3,8 GPa.

3.9. Mechanische Eigenschaften - Adhäsion

3.9.1. Nicht modifizierte Spitze

3.9.1.1. *Polymer nach dem Prägen*

Der Elastizitätsmodul zeigte eine zu große Wertstreuung, daher muss eine Alternative zur Unterscheidung zwischen Polymer und Protein gefunden werden. Eine Möglichkeit wäre die Darstellung der Adhäsion mittels Peak-Force-QNM. Hierzu soll die Adhäsion von MIP und NIP mit einer nicht modifizierten Spitze verglichen werden. Dafür wurde eine Scan-Assyst Air Spitze mit einer nominellen Kraftkonstante von 0,4 N/m eingesetzt. Als Bildgröße wurde 200 x 200nm gewählt, diese Größe musste aufgrund der Proteingröße gewählt werden, da die maximale Auflösung nur 256x256 Punkte beträgt. Das Protein selbst ist ca. 140x40x40Å bei dieser Bildgröße wir ca. jeden Nanometer ein Messpunkt genommen. Würde die Messung in einem Quadrat mit 500nm Kantenlänge durchgeführt, würden pro Polymermolekül im schlimmsten Fall nur vier Datenpunkte aufgenommen werden, was für die Detektion des kleinen Proteins nachteilig sein kann. In Abb. [68] ist eine solche Peak-Force-QNM Messung für den MIP dargestellt.

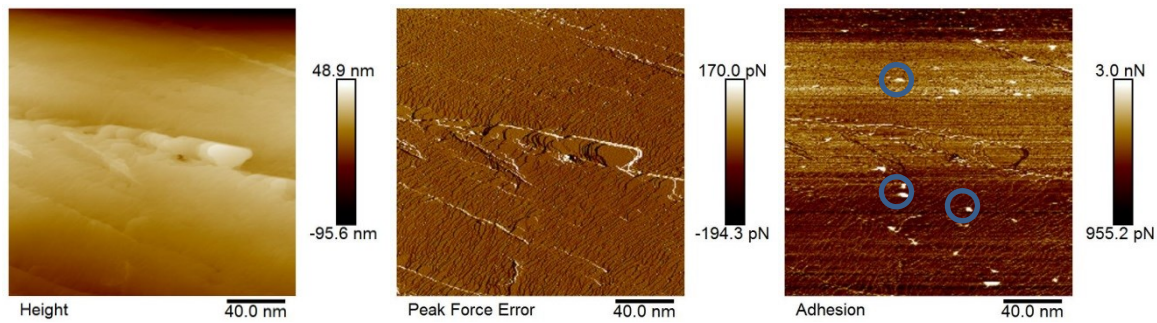


Abbildung 68: Peak Force QNM Messung eines MIPs, von rechts nach links: Höhenprofil, Peak Force Error sowie Adhäsion

Aus der Höhenprofilbestimmung kann kein eindeutiger Schluss auf das Vorhandensein von Proteinen geschlossen werden. Wie bereits in vorherigen Messungen beobachtet wurde, ist das Polymer zu rau um Proteine an der Oberfläche von der Polymeroberfläche signifikant unterscheiden zu können. Doch kann diese Methode noch andere Eigenschaften darstellen. Wie im Theorieteil dieser Arbeit in Kapitel 1.5.4 beschrieben, wird bei dieser Methode die maximale Kraft konstant gehalten, der Peak Force Error gibt wie beim klassischen AFM Bild der Fehler der Auslenkung des direkten Photoelektrodensignals wieder. Im ‚Adhäsionsbild‘ kann der Unterschied zwischen der angenäherten und der zurückgezogenen Spitze beobachtet werden. Hierbei zeigt sich eine Oberfläche mit einer Adhäsion von ca. 1,7nN mit kleinen kugelförmigen Inseln mit 2,6-3,2nN Adhäsion. Diese Kugeln haben eine Größe von 3-7nm was der Proteingröße (14x4x4nm) entspricht. Zum Vergleich wurde ein nicht geprägtes Polymer herangezogen welches in Abb. [69] dargestellt ist.

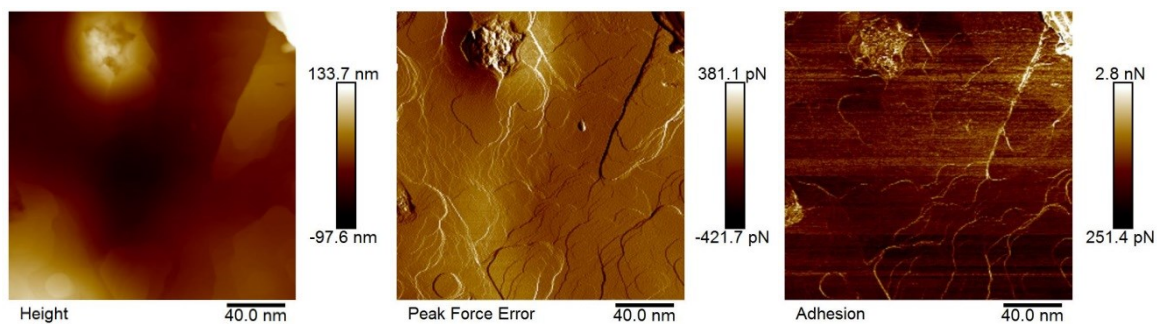
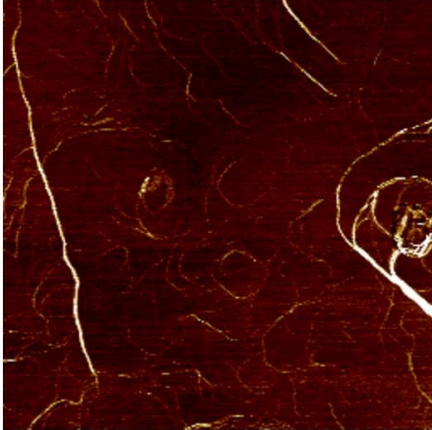
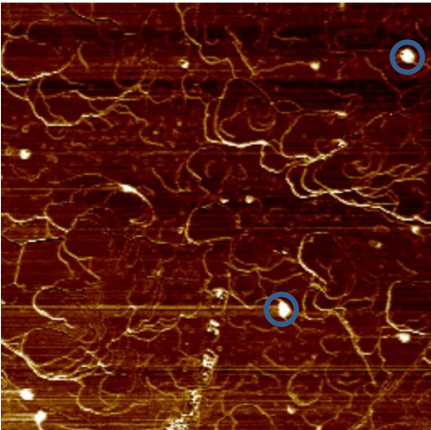
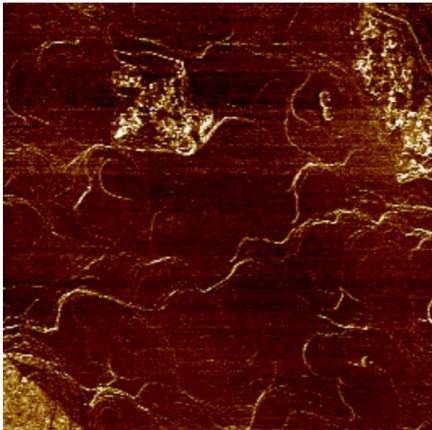


Abbildung 69: Peak-Force-QNM Messung eines NIPs, von rechts nach links: Höhenprofil, Peak Force Error sowie Adhäsion

Hier können im Höhen- und Fehlerbild keine signifikanten Unterschiede zur geprägten Oberfläche erkannt werden. Im Adhäsionsbild ist ebenfalls eine Oberfläche mit 1,7nN zu sehen. Im Gegensatz zum vorherigen MIP Bild sind Regionen mit höherer Adhäsion sehr groß. Dies deutet darauf hin, dass kein BSA auf der Oberfläche zu finden ist. Genauere Aussagen können jedoch erst nach weiteren Messungen getroffen werden. Weitere Beispielbilder für MIP und NIP Polymer sind in der nachfolgenden Tabelle [12] dargestellt.

Molekular geprägte Oberfläche	Nicht geprägte Oberfläche
 Adhesion 40.0 nm	 Adhesion 40.0 nm
 Adhesion 40.0 nm	 Adhesion 40.0 nm

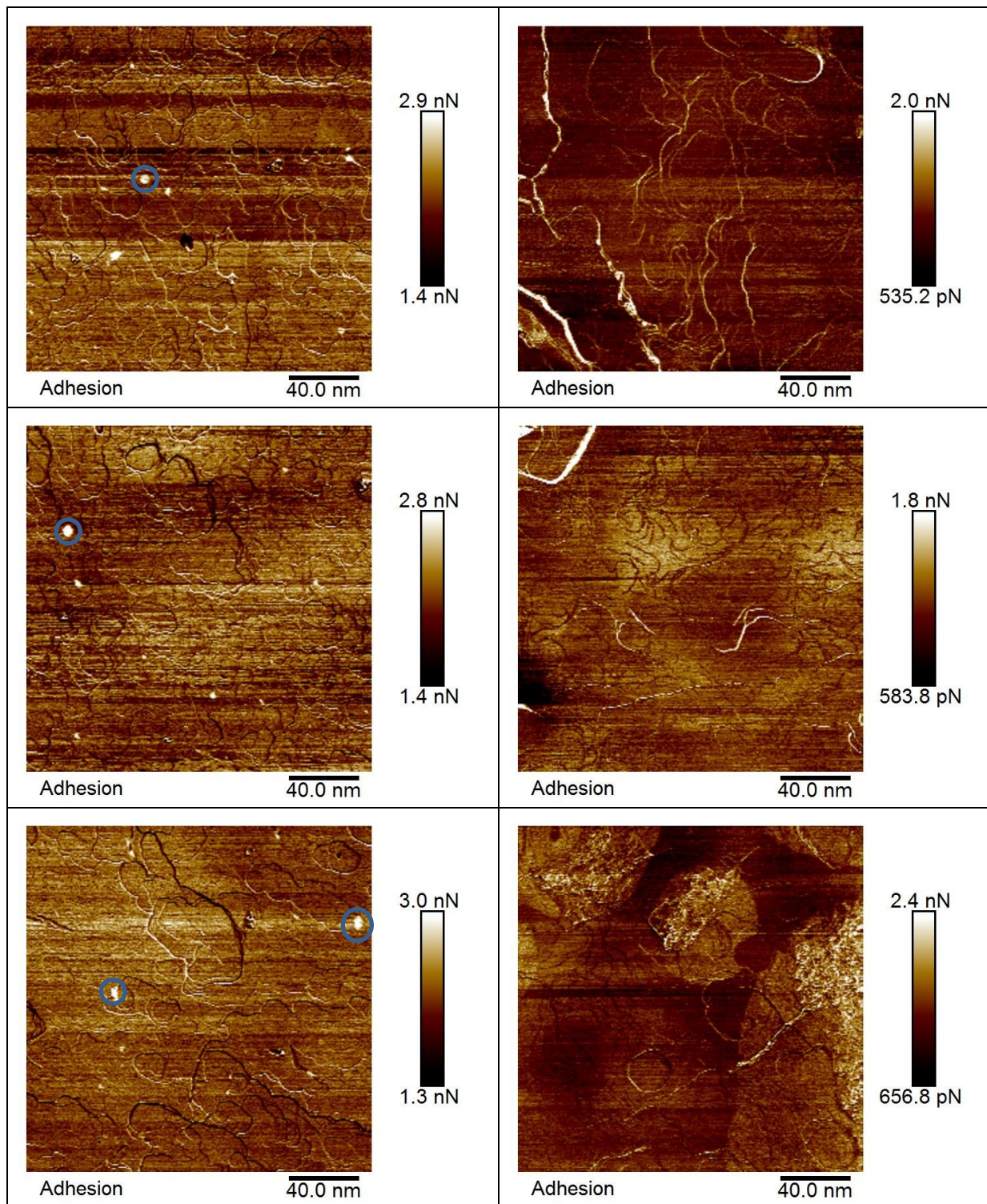


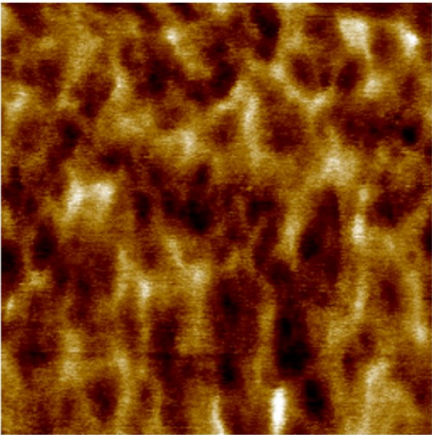
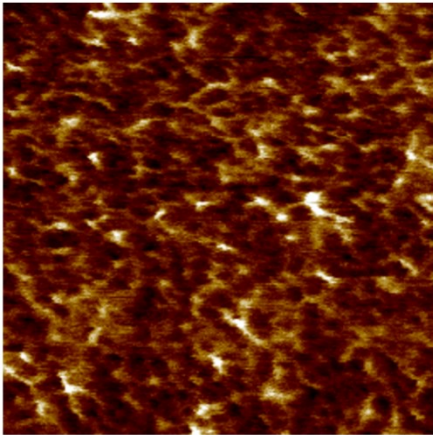
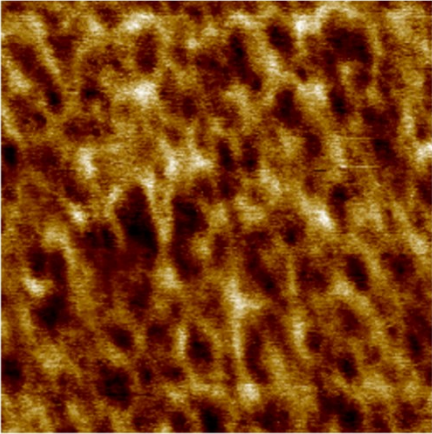
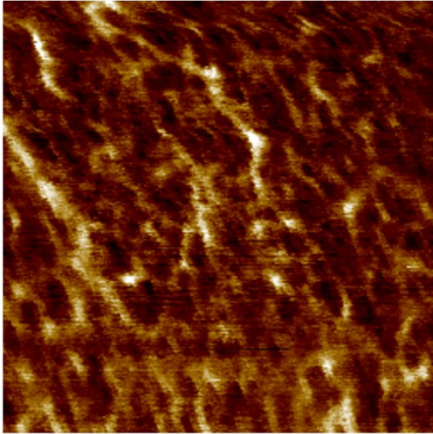
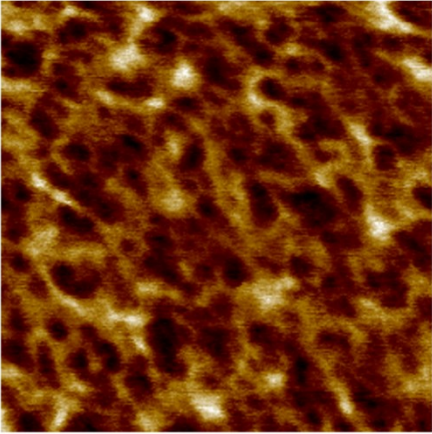
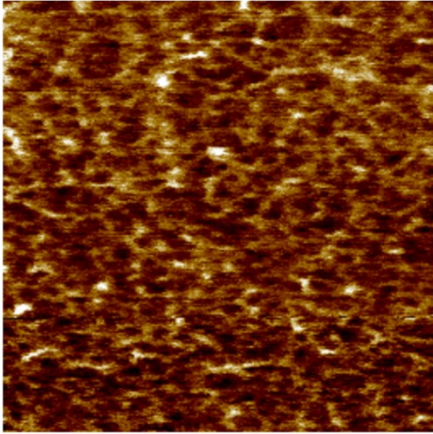
Tabelle 12: Vergleich von MIP (links) und NIP (rechts) mittels Peak-Force-QNM Adhäsionsbildern

Hier zeigten sich wieder kleine Adhäsionsinseln auf den meisten AFM-Bildern der MIP Oberfläche. Diese befinden sich jedoch nirgends auf der NIP Oberfläche werden. Jedoch wurden auf beiden Oberflächen wieder Klumpen gefunden. Dies

könnte auf eine unvollständige oder nicht homogene Polymerisation hindeuten, was durch die radikalische Polymerisation erklärt werden kann. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass die hergestellten Polymere nicht so homogen sind, wie bisher angenommen. Durch die chemische Inhomogenität zusätzlich zur Rauheit der Oberfläche können die nicht perfekte Reproduzierbarkeit sowie verschiedene weitere Probleme wie Zersetzung des Polymers erklärt werden. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesen Klumpen um kristalline nicht vollständig polymerisierte Rückstände handeln könnte. Diese würden zwar nach dem Waschen entfernt werden, dabei jedoch die Oberflächenbeschaffenheit des Polymers stören, was für die molekulare Erkennung natürlich kontraproduktiv wäre. Besonders die erhöhte Rauheit an der nicht geprägten Oberfläche würde zu einer theoretischen Verschlechterung des Gesamtsignals führen, da sich hier zufällig Kavitäten durch das Herauswaschen von kristallinen Rückständen der Polymerisation bilden können.

3.9.1.2. *Polymer nach Waschen*

Um die Vermutung zu bestätigen, dass es sich bei den Adhäsionsinseln um BSA handelt, wurde ein Waschschrift durchgeführt. Hierzu wurde das Polymer für 15 min. mit Wasser, anschließend je 15 min. mit 0,1M PBS, 1% SDS und Wasser gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Dies sollte das verbliebende BSA aus dem Polymer entfernen, wie in den Quarzmessungen bereits gezeigt wurde. Nach diesem Waschschrift sollten sowohl MIP als auch NIP wieder mittels Peak Force QNM verglichen werden, die erhaltenen Bilder sind in Tabelle [13] dargestellt.

Waschschritt mit 0,1M PBS, 1% SDS und Wasser	
Molekular geprägte Oberfläche	Nicht geprägte Oberfläche
 Adhesion 40.0 nm	 Adhesion 40.0 nm
 Adhesion 40.0 nm	 Adhesion 40.0 nm
 Adhesion 40.0 nm	 Adhesion 40.0 nm

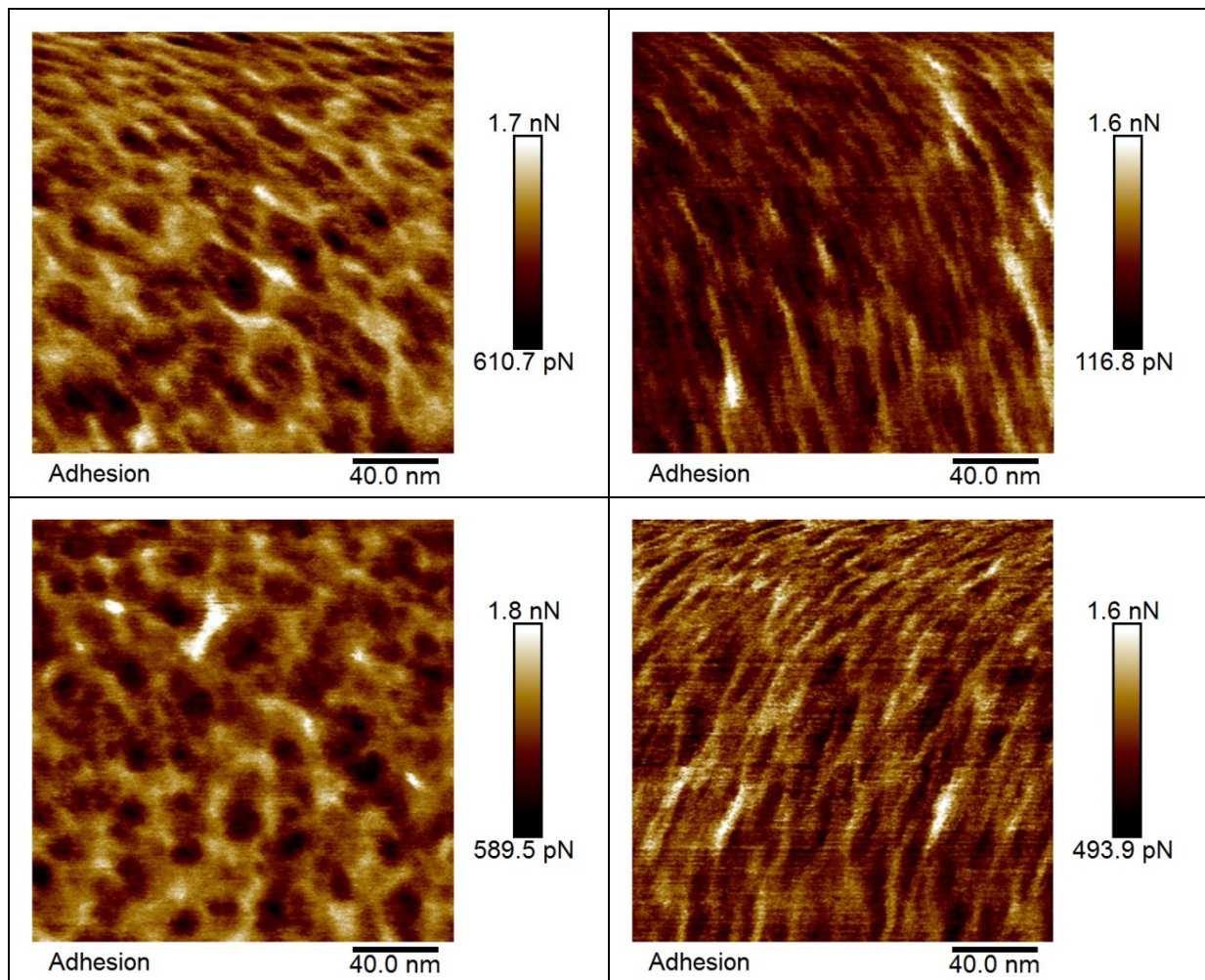


Tabelle 13: Vergleich von MIP (links) und NIP (rechts) nach Waschschrift mit 0,1MPBS/1% SDS Wasser mittels Peak-Force-QNM Adhäsionsbildern

Dieser Waschschrift sollte gemäß den vorherigen Quarzmessungen, siehe 3.3.1.2 ausreichen um das BSA vollständig von der Polymeroberfläche zu entfernen. Zwischen MIP und NIP kann bei diesen Messungen kein signifikanter Unterschied gefunden werden, auch keine kristallinen Adhäsionsstrukturen, wie sie in den vorherigen Messungen auftraten. Dies bedeutet einerseits, dass diese kristallinen Strukturen durch das Waschen entfernt werden können. Außerdem zeigt es das MIP und NIP von ihren Adhäsionseigenschaften ziemlich ähnlich sind. Theoretisch könnten durch die Rauheit der Oberfläche Messfehler und Artefakte auftreten. Da die Oberfläche am MIP etwas rauer ist als am NIP, könnte man dadurch die Adhäsionsinseln der vorherigen Messung erklären, allerdings müssten sie dann ebenfalls nach dem Waschen sichtbar sein. Da die Spitze nicht funktionalisiert ist, kann auch keine zusätzliche Adhäsion durch Kavitäten erzeugt werden. Deswegen

sieht man in diesen Bildern keinen Unterschied zwischen den beiden Oberflächen. Die Adhäsionsinseln im Bereich von 1,8nN sind nicht mit denen in den oberen Bildern vergleichbar, obwohl die Farbe gleich erscheint, ist dies allein auf eine unterschiedliche Skalierung zurückzuführen. Die Messungen unterstützen die Theorie, dass es sich bei den vorher gefundenen signifikanten Unterschieden zwischen MIP und NIP tatsächlich um das im geprägten Polymer vorhandene BSA handelt. Sollte diese Annahme korrekt sein müssten diese Unterschiede bei Wiedereinlagerung des Proteins wieder auftauchen. Diese kristallinen Rückstände könnten auch den leichten Masseverlust am nicht geprägten Polymer bei der Messung der Resonanzfrequenz mittels Netzwerkanalysator nach dem ersten Waschschrift des Polymers erklären.

3.9.1.3. *Wiedereinlagerung BSA*

Gemäß der Theorie des MIP und wie aus den Quarzmessungen ersichtlich, muss der MIP das BSA in das Polymer einlagern. Um diesen Schritt zu darzustellen, wurde das gewaschene Polymer für 10 Minuten in eine 10% BSA Lösung gelegt und anschließend 2 Sekunden mit Wasser gespült um Protein, welches nur auf der Oberfläche haftet, zu entfernen. Die Quarzmessung legt nahe, dass die Sättigung mit BSA erst nach zwei Stunden zu erreichen ist. Eine Einlagerung von 10 Minuten erscheint daher zu kurz. Bei näherer Betrachtung einer Quarzmessung wie in Abb. [70] unten nochmals dargestellt, zeigt sich jedoch, dass es ein exponentielles Signalwachstum in den ersten Minuten gibt, das immer mehr abflacht.

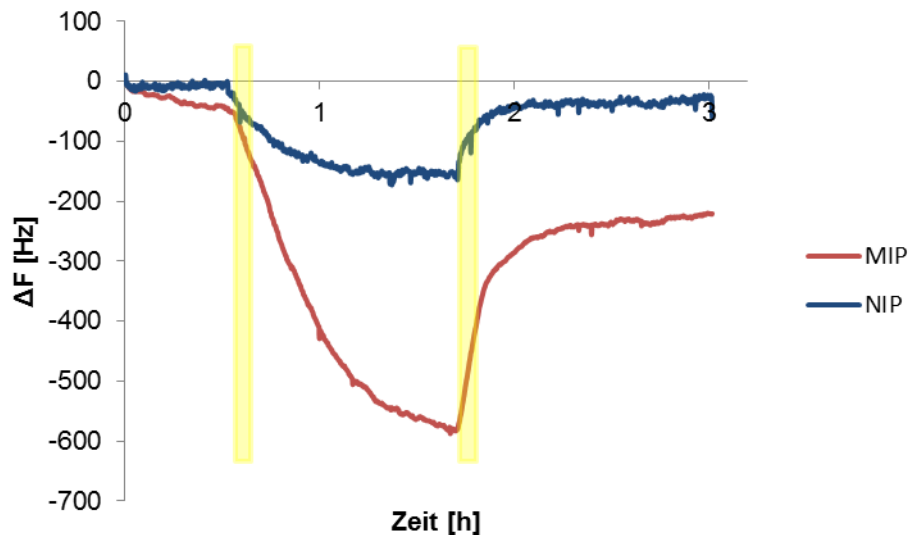
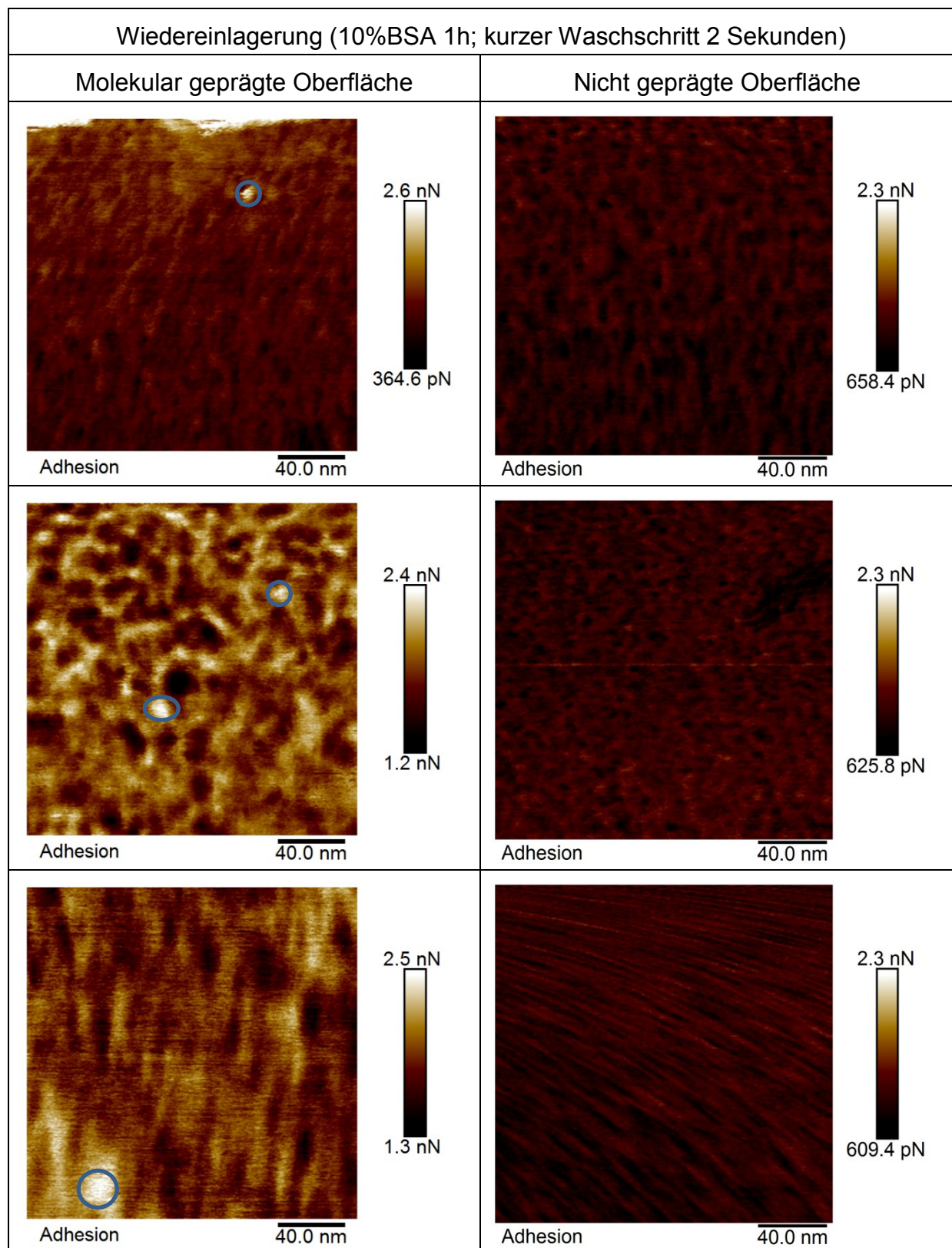


Abbildung 70: QCM-Sensorantwort; dynamischer Bereich gelb markiert: Dauer 10 Minuten

Protein wird daher in den ersten Minuten stark angereichert und danach nimmt die Aufnahmefähigkeit des Polymers stark ab. Daher kann auch eine hohe Belegung schon mit kurzen Waschschritten und hohen Proteinkonzentrationen erreicht werden. Besser wäre es jedoch, den Quarz in-situ im AFM zu Messen um dies zu bestätigen. Dies wäre zwar hypothetisch bei einer Messung in flüssiger Phase möglich, jedoch stellt sich hier das Problem, dass die Proteine sicher nicht am Polymer kleben, sondern sich in einer realen Messung im chemischen Gleichgewicht zur Umgebung befinden und es zu einer ständigen Ad- und Desorption des Proteins kommt, was messtechnisch sehr schwierig zu fassen ist. Aus dem oberen Bild können wir auch Schlussfolgerungen auf den Waschschrift ziehen. Wie auch bei der Einlagerung kommt es zu einer exponentiellen Änderung des Signals, diesmal einer Zunahme. Für die Messung sollte der Waschschrift daher einerseits möglichst kurz sein, um die Wahrscheinlichkeit zu maximieren Protein zu finden. Dies ist mit einem kurzen Waschschrift von 2 Sekunden mit Wasser gewährleistet. Durch Vergleich zwischen MIP und NIP kann ausgeschlossen werden, dass es sich dabei nicht um zufällig auf der Oberfläche liegende Proteine handelt. Einige Beispielbilder sind in der nachfolgenden Tabelle [14] dargestellt.



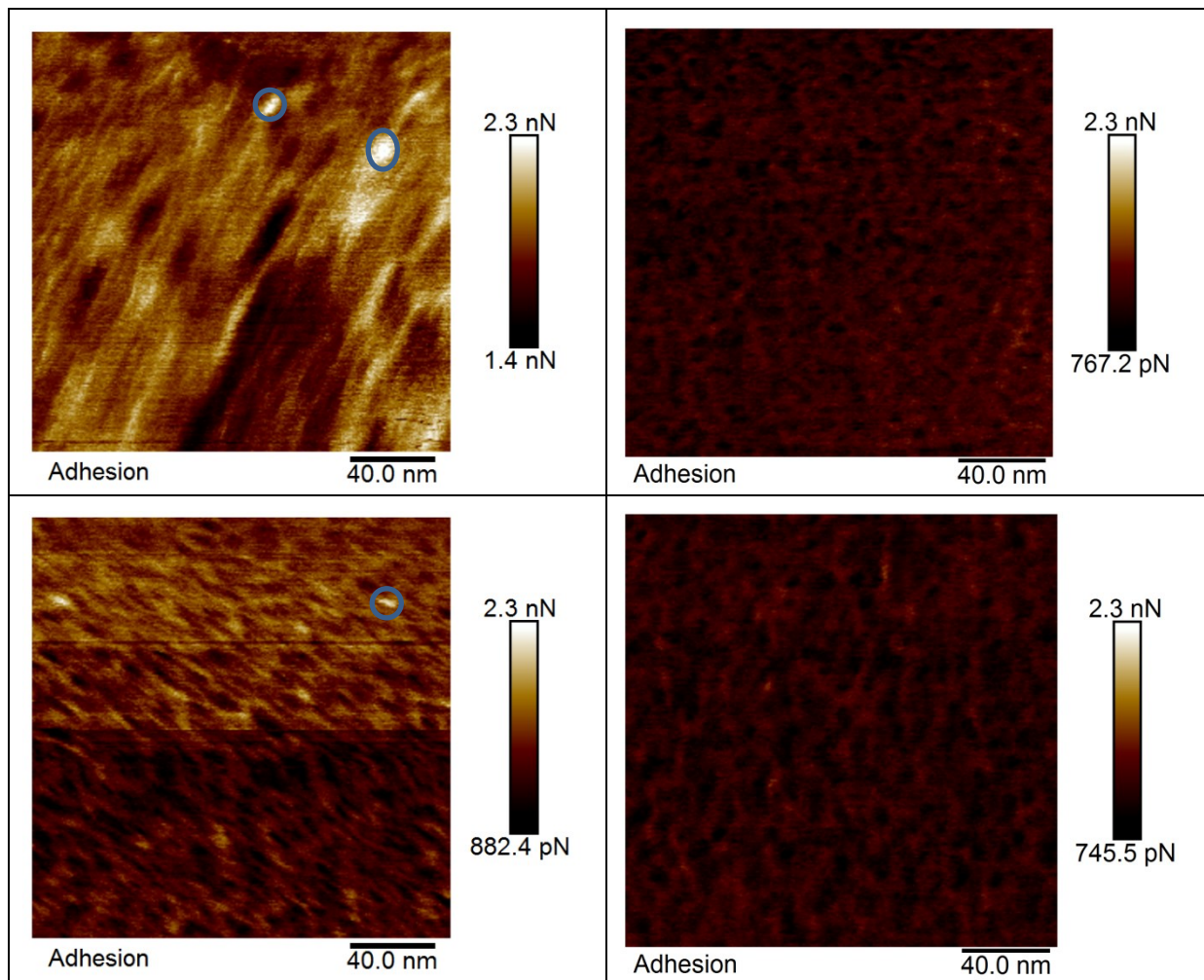


Tabelle 14: Vergleich von MIP (links) und NIP (rechts) nach Wiedereinlagerung durch 10 Minuten 10%BSA und kurzem 2 Sekunden Waschschrift mit Wasser mittels Peak-Force QNM Adhäsionsbildern

Diese Bilder zeigen wieder einen signifikanten Unterschied zwischen MIP und NIP, wenn die Skalierung wieder berücksichtigt wird. Bei dem geprägten Polymer treten nach der Einlagerung wieder Adhäsionsinseln auf, diese sind auch nur auf dem MIP zu finden. Das zeigt, dass es sich bei diesen Adhäsionsinseln tatsächlich um BSA handelt. Zwar kann ein leichter Unterschied zur ersten Messung festgestellt werden, dies kann jedoch dadurch erklärt werden, dass das Protein und das Polymer noch nicht komplett trocken sind, da die Messungen zwei Stunden nach dem Einlagern durchgeführt wurde, während die ersten Messungen nach 48h Trocknen des Polymers durchgeführt wurden. Um die Größe der Adhäsionsinseln zu untersuchen und um zu bestätigen, dass es sich nicht um Messartefakte handelt, wurde ein kleinerer Abschnitt einer Messung genauer untersucht. Hier kann zwar keine

genauere Auflösung erreicht werden, die Bilder erlauben dennoch genauere Größenbestimmung, wie aus Abb. [71] ersichtlich ist. Hier wurde an einer Stelle ein kleinerer Bereich mit derselben Auflösung noch einmal gemessen, und die Adhäsionsinseln konnten auch in der Vergrößerung gefunden werden.

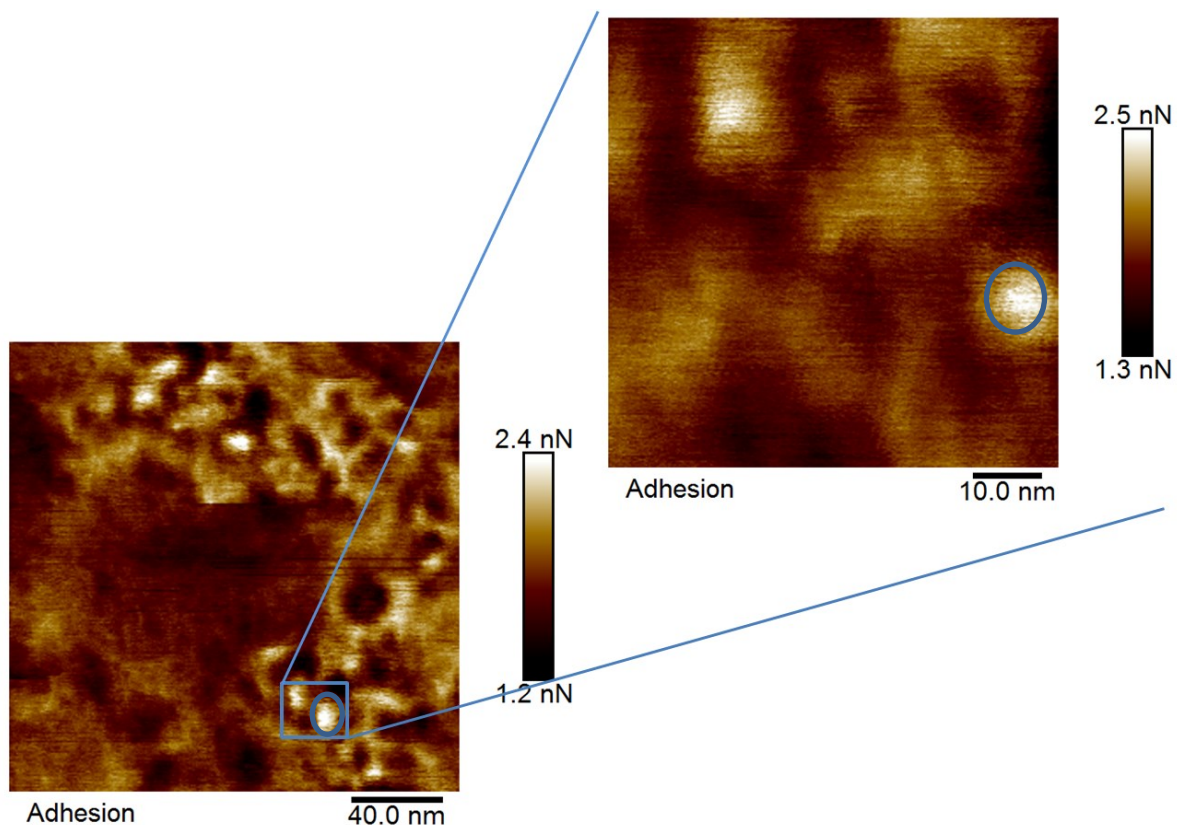


Abbildung 71: Adhäsionsbild einer geprägten Oberfläche nach Wiedereinlagerung (10% BSA 10 Min.; Waschschrift Wasser 2 Sek.) mit Vergrößerung der Messung

In diesen Bildern zeigt sich, dass die Größe ungefähr 5-7nm beträgt, dies stimmt mit der Größe des Proteins überein. Bei einem längeren Waschschrift kann kein Unterschied zwischen MIP und NIP mehr gefunden werden. Dies bedeutet jedoch nicht, dass sich kein Protein auf den Oberflächen befindet, sondern die Wahrscheinlichkeit eine Stelle mit Protein zu finden, wird natürlich deutlich geringer. Dies erklärt auch die Diskrepanz zwischen QCM und AFM Messung. Während die Quarzmessung zeigt, dass nicht das gesamte BSA entfernt wurde, konnte bereits nach etwas längeren Waschzeiten kein Albumin auf der Oberfläche gefunden werden. Zur Visualisierung der Wiedereinlagerung wurden die einzelnen Schritte in

einer Tabelle angeführt, die Skalierung wurde optimiert um den Unterschied noch deutlicher zu gestalten.

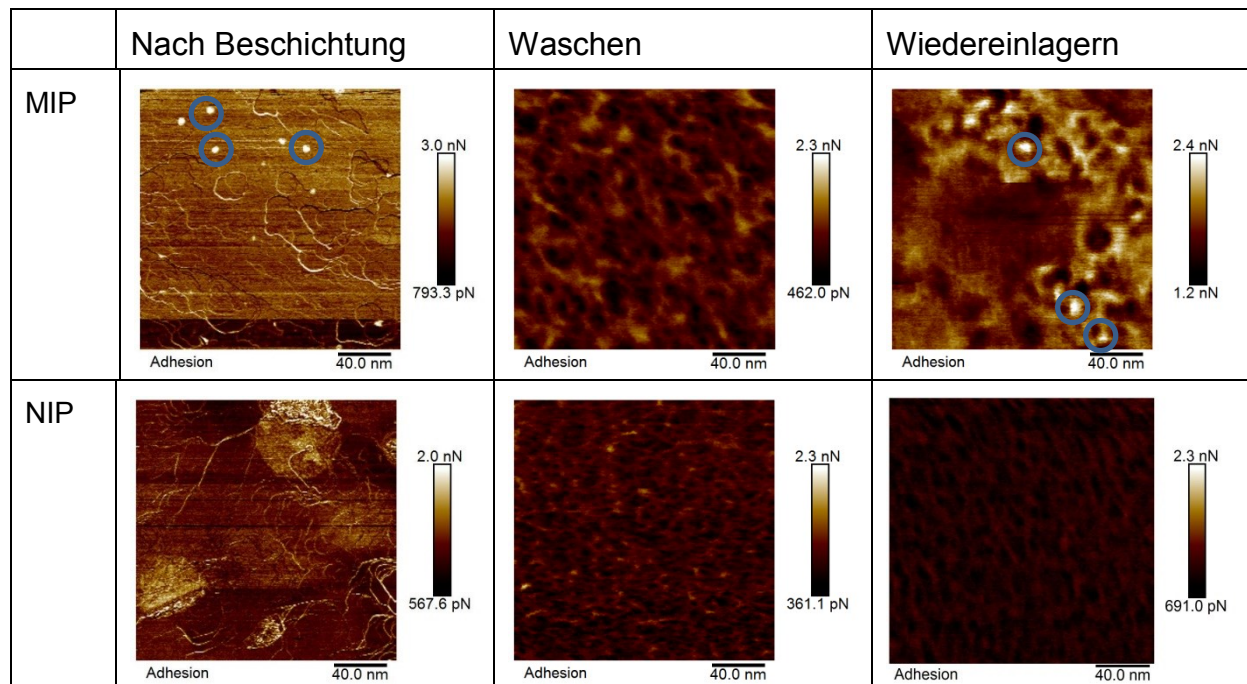


Tabelle 15: Darstellung der einzelnen Schritte mittels Peak-Force-QNM Adhäsionsbildern mit optimierter Skalierung

Diese erfolgreichen Wasch- und Einlagerungsversuche wären mit simplen Höhenmessungen aufgrund der Rauheit des Polymers nicht möglich gewesen. Durch Peak Force QNM hingegen kann das Prinzip des molekular geprägten Polymers sehr gut veranschaulicht werden. Es kann gezeigt werden, dass sich das Protein bevorzugt auf der geprägten Oberfläche anlagert. Leider kann nicht eindeutig gezeigt werden, dass sich Protein in Kavitäten einlagert, da diese auch mit dieser Methode nicht aufgelöst werden können.

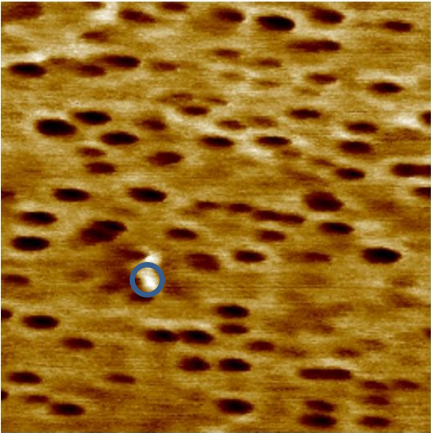
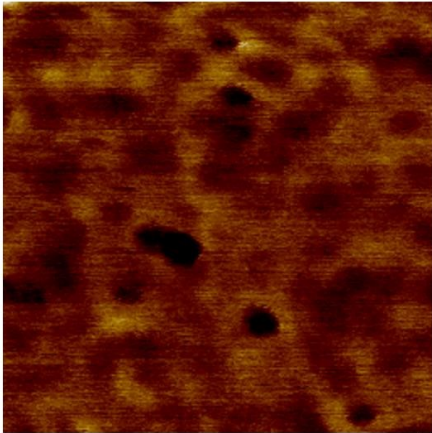
3.9.2. Modifizierte Spitze

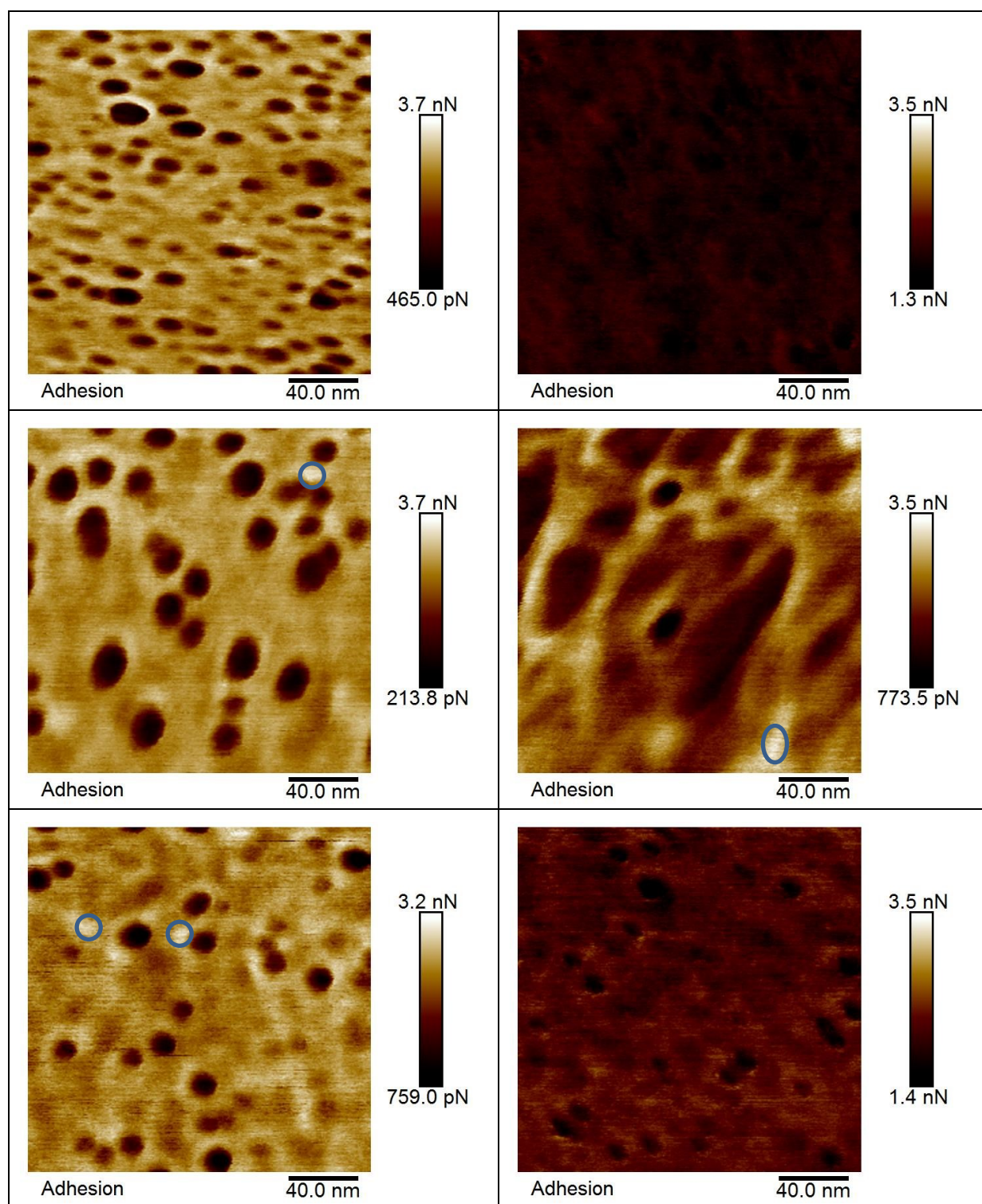
Wenn man einen MIP betrachtet, sollten an diesem Kavitäten ausgebildet sein, an denen der Analyt stärker mit der Oberfläche wechselwirkt als in der Umgebung. An diesem Punkt müssen sich daher auch die Adhäsion einer funktionalisierten Spitze

und der Kavität von einem anderen Punkt unterscheiden. Daher sollte es möglich sein, die Kavitäten mittels Peak-Force-QNM zu visualisieren, allerdings muss aufgrund der erhöhten Oberfläche der Spitze die Auflösung geringer werden.

3.9.2.1. Modifizierte Spitze - Luft

In einem ersten Versuch sollte untersucht werden, ob bei Messung in Luft bei Verwendung einer modifizierten Spitze ein Unterschied zwischen MIP und NIP festgestellt werden kann, beziehungsweise sogar Kavitäten aufgelöst werden können. Zwar wird an der Luft das immobilisierte Protein zerstört, dennoch bleiben funktionelle Gruppen des Polymers zurück, mit denen die Oberfläche wechselwirken kann. Hierzu wurde eine ScanAssyst Air Spitze gemäß dem Protokoll in 2.8 mittels BSA funktionalisiert. Diese Spitze wurde anschließend verwendet, um eine gewaschene MIP und NIP Oberfläche zu untersuchen. Hierzu wurden MIP und NIP synthetisiert, auf eine Goldelektrode aufgetragen und je 15 Minuten in Wasser, 0,1M PBS-Puffer, 10% SDS-Lösung und anschließend wieder in Wasser gelegt. Gemäß den Quarzmessungen sollten diese Waschschrte ausreichen, um das BSA aus den Kavitäten zu entfernen. Einige Beispielbilder sind in Tabelle [16] dargestellt.

Gewaschene Oberfläche	
Modifizierte Spitze - Luft	
Molekular geprägte Oberfläche	Nicht geprägte Oberfläche
 Adhesion 40.0 nm	 Adhesion 40.0 nm



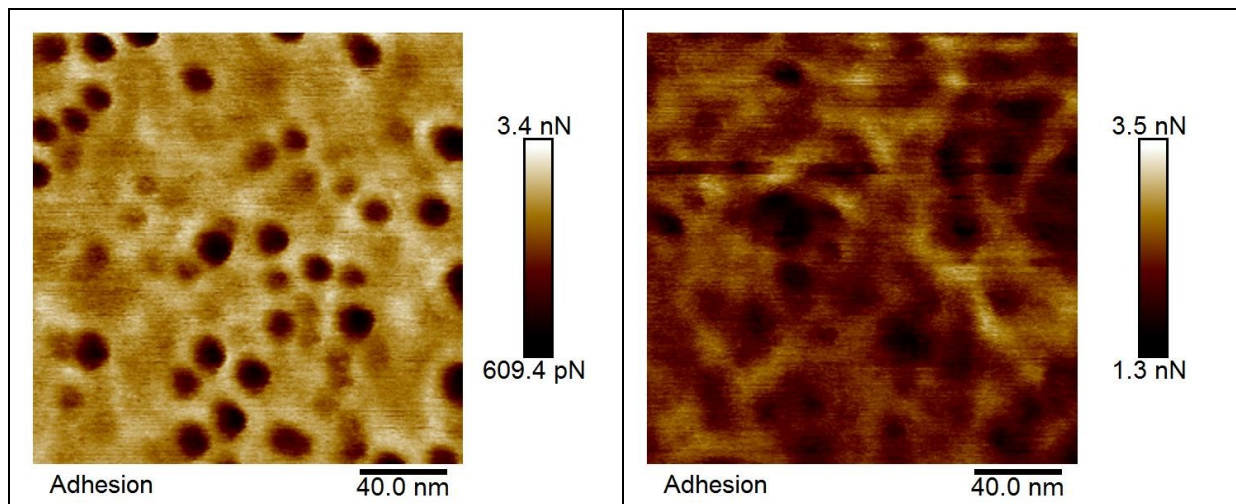


Tabelle 16: Vergleich Adhäsion MIP und NIP mit BSA modifizierter Spitze in Luft

Hier zeigt sich, dass der MIP eine generell höhere Adhäsion aufweist, wenn man eine modifizierte Spitze in Luft verwendet. Misst man dieselbe Oberfläche mit einer nicht modifizierten Spitze, ist die Adhäsion hingegen gleich. Ein weiterer Unterschied sind Adhäsionsinseln mit 3,5nN, die mit der Größe des Analyten korrespondieren. Diese sind wahrscheinlich die gesuchten Kavitäten, allerdings treten diese ebenfalls in einer der NIP Messungen auf. Dies bestätigt den Verdacht, dass sich entweder bei der Polymerisation Zufallskavitäten bilden können, beziehungsweise, dass diese durch den Waschschrift entstehen. Aus diesem Grund wurden auch die Versuche zur LRP durchgeführt, diese zeigten zwar erste gute Ergebnisse, die weitere Optimierung geht aber über das Ziel dieser Arbeit hinaus, jedoch wäre diese Methode eine weitere Möglichkeit, die Qualität des MIP und NIPs zu kontrollieren. Aus dem Höhenbild in Abb. [72] kann man außerdem erkennen, dass die höhere Adhäsion sich in tieferen Stellen des Polymers befindet.

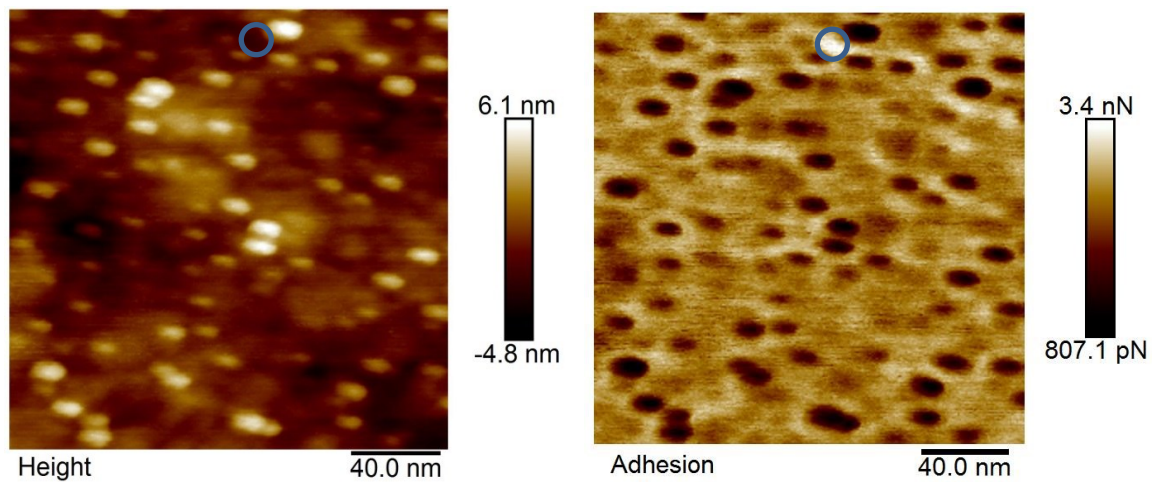


Abbildung 72: Vergleich Höhen (links) und Adhäsionsbild (rechts) des gewaschenen MIP

Diese Adhäsion kann aber auch durch eine ruckartige Änderung des Höhenprofils und durch somit eine starke Laserlichtauslenkung erklärt werden. Durch den Vergleich mit dem NIP kann diese Vermutung jedoch widerlegt werden, da MIP und NIP ungefähr die gleiche Rauheit besitzen und am NIP in dem tieferen Polymer keine höhere Adhäsion auftritt.

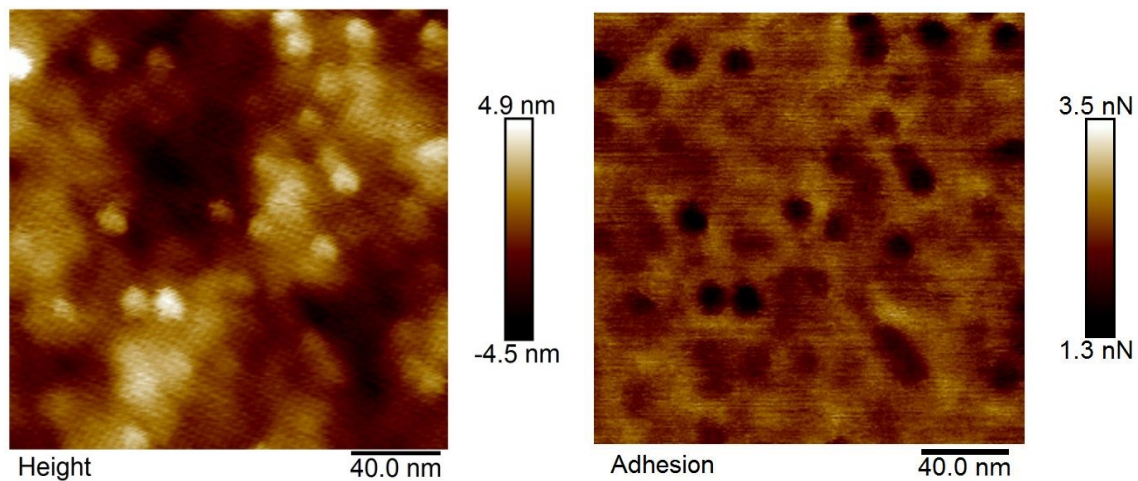
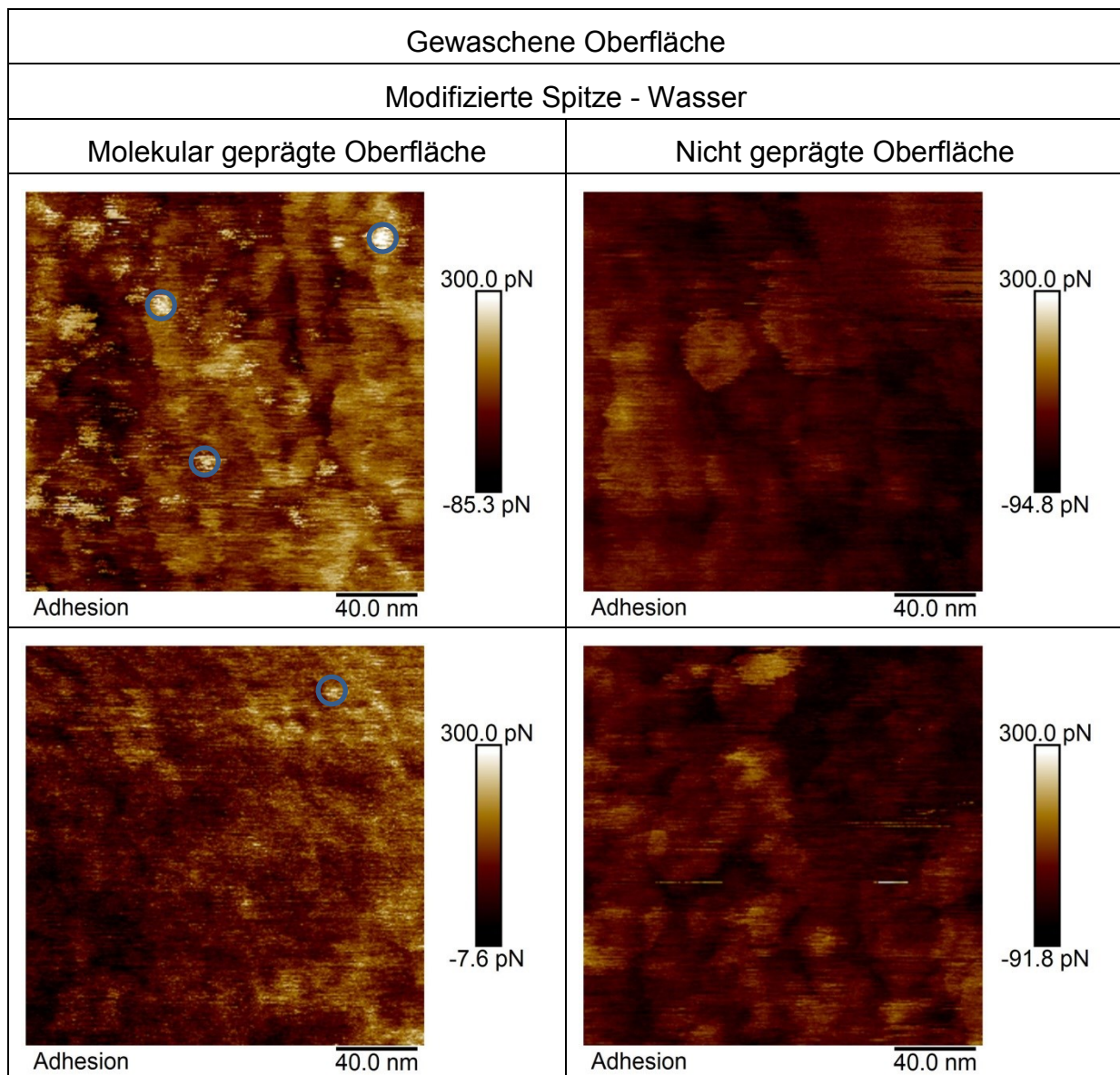


Abbildung 73: Vergleich Höhen (links) und Adhäsionsbild (rechts) des gewaschenen NIP

3.9.2.2. Modifizierte Spitze - Wasser

Bei dem vorherigen Versuch kann natürlich nicht garantiert werden, dass das BSA noch in der richtigen Form an der AFM-Spitze vorliegt. Eine einfache Methode hierfür ist die Messung in der flüssigen Phase. Hierzu wurde Wasser gewählt, da es sich um das Messmedium handelte. Zwar wird bei Verwendung eines Salzpuffersystems die elektronische Stabilität verbessert, jedoch zeigten Versuche am QCM, dass das Polymer sehr stark mit PBS Puffer wechselwirkt, die Wechselwirkung wäre dann nicht mehr zwischen Spitze und Oberfläche sondern zwischen PBS und Spitze.



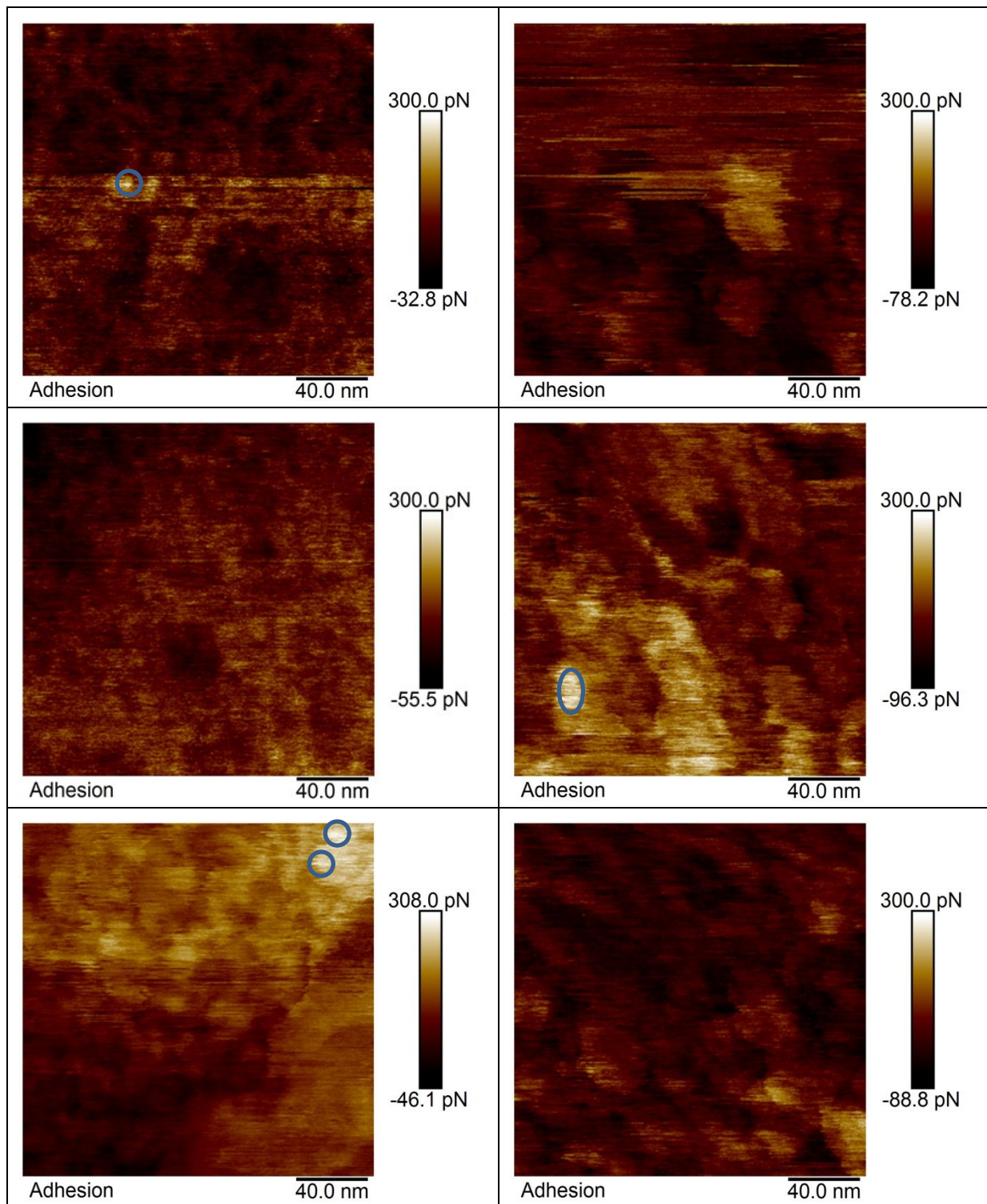


Tabelle 17: Vergleich Adhäsion MIP und NIP mit BSA modifizierter Spitze in Wasser

Die Messung in Flüssigkeit ist weitaus komplizierter als an Luft, so muss darauf geachtet werden, dass sich das Polymer und die Spitze während der gesamten Messzeit im Wassertropfen befinden. Auch sollte 20 Minuten gewartet werden, da das Polymer in dieser Zeit stark anschwillt und daher die Spitze zerstören kann. Die

Messungen in Wasser zeigte sich ein ähnliches Verhalten zur modifizierten Spitze in Luft. Die Adhäsion am MIP ist generell etwas höher als am NIP auch wenn der Unterschied zu den Luftmessungen deutlich geringer ist. Es konnten am NIP wieder Regionen mit höherer Adhäsion gefunden werden, die der Größe des Analyten entsprechen. Diese treten am MIP auch sehr häufig auf wie auf den Beispielbildern gezeigt werden kann. Jedoch konnte auch am NIP an einem Bild (5% der Messdaten) eine höhere Adhäsion gefunden. Dies zeigt, dass durch die radikalische Polymerisation sich Bindungsstellen fürs BSA auch am NIP bilden können. Da die ersten LRP Polymere zwar ein besseres Signalverhalten zeigten, aber schon in QCM Messungen gezeigt werden konnte, dass die Stabilität stark eingeschränkt ist, wurde nicht versucht deren Oberflächen zu untersuchen. Diese Messungen der Oberflächen der RP zeigen aber deutlich, dass die Methode eine gute Möglichkeit ist um die Qualität eines Polymers zu bestimmen und Optimierungsmöglichkeiten aufzuzeigen.

4.Ausblick

Die entwickelte So-VP bietet eine hervorragende Alternative zu bereits etablierten Prägemethoden um Protein MIPs darzustellen. Diese MIPs sind selektiv und sensitiv, die molekulare Prägung sowie Ein- und Auslagerung des Analyten konnte mittels Peak-Force-QNM gezeigt werden. Peak-Force-QNM Messungen deuten aber auch darauf hin, dass die Polymeroberfläche nicht so homogen ist wie bisher angenommen. Erste Versuche zeigten bereits eine deutliche Verbesserung des Sensorsignals bei LRP verglichen mit der radikalischen Prägemethode. Doch die Signalstabilität wurde deutlich verschlechtert, daher muss die Zusammensetzung des Polymers sowie die Polymerisationszeit genauer mittels QCM charakterisiert werden. Durch anschließende Darstellung mittels Peak-Force-QNM kann dann die Qualität solcher LRP MIPs getestet werden. Auch für andere Analyte wie z.B. Zellen kann die Visualisierung der Kavitäten mittels Peak-Force-QNM zu neuen Erkenntnissen über Homogenität und Bindungseigenschaften führen.

Abkürzungsverzeichnis

AFM.....	Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy)
APTES.....	Aminopropyltriethoxysilan
BSA	Bovines Serum Albumin
DHEBA	N,N'-(1,2-Dihydroxyethylene)bisacrylamide
ATR-FTIR	Totalreflexion Fourier transformiertes Infrarot
LRP	Lebend radikalische Polymerisation
MAA.....	Methacrylsäure
MIP	Molekular geprägtes Polymer
N-3-DPMA	N-3-Dimethylamino-propylmethacrylamid
NIP	Nicht geprägtes Polymer
PBS	Phosphatpuffer
Peak-Force-QNM	Peak Force quantonanomechanical mapping
QCM	Quarzmikrowaage
RAFT	Polymerisation mittels reversibler Kettenaddition
RP	Radikalische Polymerisation
SAM.....	Selbstorganisierte Monolage
SAW	Sensor basierend auf akustischen Oberflächenwellen
SDS	Natriumdodecylsulfat
So-VP	Selbstorganisierte Volumenprägung
VP.....	Volumenprägung (bulk imprinting)

Zusammenfassung

Die Herstellung von günstigen Sensoren ist ein wichtiges Forschungsgebiet, um möglichst rasch und einfach Gefahrenstoffe beziehungsweise Krankheiten zu erkennen. Molekular geprägte Polymere sind vielversprechende Kandidaten für solche Anwendungen, insbesondere in der Herstellung von Protein MIPs gibt es aber noch einige Problematiken, wie die Denaturierung des Proteins während der Synthese, zu beseitigen. In dieser Arbeit wurde eine neue Prägemethode für sensitive Proteine entwickelt und mit bereits etablierten Methoden verglichen. Als Modellprotein wurde hierzu BSA verwendet. Dabei ergab sich, dass die So-VP Methode ein vierfach höheres Signal zeigte als die bereits etablierte Sedimentationsmethode. Es konnte ein So-VP BSA sensitiver Sensor mit einem Detektionslimit von 5mg/L entwickelt werden. Der Sensor ist auch selektiv, so zeigt er ein vierfach höheres Signal auf BSA als auf Melamin, aufgrund der Aminogruppen des Melamins wäre ein sehr großes Signal zu erwarten. Die So-VP Methode kann auch zur Darstellung von MIP-Nanopartikeln mittels Fällungsmethode verwendet werden, diese zeigten jedoch kein sensitiveres Signal. Da die Visualisierung mittels klassischem AFM nicht möglich war, wurden die Einlagerung und der Waschschrift des Analyten erfolgreich mittels Peak-Force-QNM AFM visualisiert. Dies zeigte auch einige Nachteile der radikalischen Polymerisation, aus diesem Grund wurden Versuche zu RAFT und LRP durchgeführt. Während das RAFT Reagenz keine Verbesserung des Sensorsignals zeigte, konnte mittels Cu(I)S LRP zwar nicht das MIP Signal erhöht, jedoch das NIP Signal deutlich reduziert werden, was im Endeffekt auch einer Vergrößerung des Analytsignals entspricht. Diese Methode zeigte zwar keine gute Signalstabilität und auch der Analyt konnte nicht entfernt werden. Jedoch könnte diese Methode ein interessanter Forschungspunkt werden. Um die Wechselwirkung zwischen Analyt und den RP So-VP MIPs weiter zu charakterisieren, wurde BSA auf eine AFM Spitze immobilisiert und mittels Peak-Force-QNM in Luft und Wasser visualisiert. Die einzelnen Immobilisationsschritte wurden mittels ATR-FTIR, QCM und AFM überprüft. Es konnte mittels Peak-Force-QNM gezeigt werden, dass die Wechselwirkung am MIP größer ist als am NIP.

Summary

Developing fast and cheap detection of diseases and dangerous biological and chemical substances is very important. Molecularly Imprinted Polymers are promising artificial materials, where one doesn't have to face the drawbacks of natural sensing materials. Generating MIP for Protein can be complicated, due to challenges during synthesis, such as denaturation of protein. In this work a new straightforward method to create a protein sensor was developed. BSA was used as model protein and it could be shown that the new So-VP method showed four times more signal than the sedimentation method. A So-VP BSA Sensor with a detection limit of 5 mg/L was developed, selectivity towards different analytes were tested. It could be shown that the BSA signal was four times higher than melamine signal, which is quite unexpected due to three amino groups on the melamine. The newly developed method can also be used to generate MIP-nanoparticles via precipitation method, which unfortunately was less sensitive than the thin layer. The analyte could not be visualized via tapping mode AFM, however the integration and washing of the analyte could be visualized by Peak-Force-QNM AFM. These experiments revealed some disadvantages of radical polymerization; hence LRP and RAFT processes were tested. The RAFT polymerization showed no higher response than the RP. The LRP showed no difference in the MIP frequency shift, the NIP frequency shift could be reduced, resulting in a higher sensor signal. The signal stability is reduced compared to RP and the analyte could not be removed from the surface, however this method could be an interesting research topic for the future. To characterize the interaction between analyte and So-VP MIP prepared by RP BSA was immobilized onto an AFM TIP. The immobilization steps were checked via ATR-FTIR, QCM and AFM. It could be shown via Peak-Force-QNM that the adhesion on MIP and NIP are different when using a modified tip.

Literaturverzeichnis

1. Rifai, N.; Gillette, M.A.; Carr, S.A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*, 971-983.
2. Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. Chemical Sensors Definitions and Classification. *Pure Appl Chem* **1991**, *63*, 1247-1250.
3. Gründler P. *Chemische Sensoren: Eine Einführung Für Naturwissenschaftler und Ingenieure*; 2004
4. <http://www.ama-sensorik.de/site/de/289/wirtschaftliche-bedeutung.html>
Available online: (01/2014),
5. Todd, C. S. *Design, Installation, Commissioning and Maintenance of Fire Detection and Fire Alarm Systems: A Guide to BS 5839-1*; 2008
6. Kratz, L. *Die Glaselektrode und ihre Anwendungen*; D. Steinkopff: Frankfurt / Main,, 1950
7. Logothetis, E.M. Metal-Oxide Oxygen Sensors for Automotive Applications. *J Solid State Chem* **1975**, *12*, 331-331.
8. Janata, J. Principles of Chemical Sensors, Second Edition. *Principles of Chemical Sensors, Second Edition* **2009**, 1-373.
9. Pohl, A. A review of wireless SAW sensors. *IEEE T Ultrason Ferr* **2000**, *47*, 317-332.
10. Thompson, M.; Kipling, A.L.; Duncanhewitt, W.C.; Rajakovic, L.V.; Cavicvlasak, B.A. Thickness-Shear-Mode Acoustic-Wave Sensors in the Liquid-Phase - a Review. *The Analyst* **1991**, *116*, 881-890.
11. Wang, J. Electrochemical glucose biosensors. *Chem Rev* **2008**, *108*, 814-825.
12. Curie, J.; Curie, P. Développement par compression de l'électricité polaire dans les cristaux hémiedres à faces inclinées. *Bulletin de la Société minérologique de France* **1880**, *3*, 3.
13. Lipmann, G. Principe de la conservation de l'électricité. *Annales de chimie et de physique* **1881**, *24*.
14. Curie, J.; Curie, P. Contractions et dilatations produites par des tensions dans les cristaux hémiedres à faces inclinées. *Comptes rendus hebdomadaires des sèances de l'Académie des sciences* **1881**, *93*, 3.

15. Voigt, W. *Lehrbuch der Kristallphysik (mit ausschluss der kristalloptik)*; B.G. Teubner: Leipzig, Berlin, 1910
16. Kepley, L.J.; Crooks, R.M.; Ricco, A.J. Selective Surface Acoustic Wave-Based Organophosphonate Chemical Sensor Employing a Self-Assembled Composite Monolayer - a New Paradigm for Sensor Design. *Anal Chem* **1992**, *64*, 3191-3193.
17. Kholkin, A.; Amdursky, N.; Bdikin, I.; Gazit, E.; Rosenman, G. Strong Piezoelectricity in Bioinspired Peptide Nanotubes. *Acs Nano* **2010**, *4*, 610-614.
18. Marrison, W.A. The Evolution of the Quartz Crystal Clock. *At&T Tech J* **1948**, *27*, 510-588.
19. McWhan, D. *Sand and Silicon: Science that Changed the World*; 2012
20. Feigelson, R.S. 50 years of progress in crystal growth - Preface. *J Cryst Growth* **2004**
21. Packard, H., HP Applcation Note 200-2 Fundamentals of Quartz Oscillators. In www.leapsecond.com/pdf/an200-2.pdf Available online: (08/2014)
22. Neubig, B.; W., B. *Das große Quarzkochbuch*; Franzis Verlag GmbH: 2000
23. J., A. Quarzmikrobalancesensoren für die Gas- und Flüssigkeitsanalytik. Otto-von-Guericke-Universität: Deutschland, 1995
24. Briese, W. *Schwingquarze, ein unverzichtbares Bauelement in der Elektronik*; Vistas Verlag: Berlin, 1985
25. Ward, M.D.; Buttry, D.A. Insitu Interfacial Mass Detection with Piezoelectric Transducers. *Science* **1990**, *249*, 1000-1007.
26. Koshets, I.A.; Kazantseva, Z.I.; Shirshov, Y.M.; Cherenok, S.A.; Kalchenko, V.I. Calixarene films as sensitive coatings for QCM-based gas sensors. *Sensor Actuators B-Chem* **2005**, *106*, 177-181.
27. Lagona, J.; Mukhopadhyay, P.; Chakrabarti, S.; Isaacs, L. The cucurbit[n]uril family. *Angew Chem Int Ed* **2005**, *44*, 4844-4870.
28. Ju, R.F.; Syu, M.J.; Teng, H.S.; Chou, S.K.; Chang, Y.S. Preparation and identification of beta-cyclodextrin polymer thin film for quartz crystal microbalance sensing of benzene, toluene, and p-xylene. *Sensor Actuators B-Chem* **2008**, *132*, 319-326.

29. Kim, N.; Kim, D.K.; Cho, Y.J. Gold nanoparticle-based signal augmentation of quartz crystal microbalance immunosensor measuring C-reactive protein. *Curr Appl Phys* **2010**, *10*, 1227-1230.
30. Chen, J.C.; Sadhasivam, S.; Lin, F.H. Label free gravimetric detection of epidermal growth factor receptor by antibody immobilization on quartz crystal microbalance. *Process Biochem* **2011**, *46*, 543-550.
31. Sauerbrey, G. Verwendung Von Schwingquarzen Zur wägung dünner Schichten Und Zur Mikrowägung. *Z Phys* **1959**, *155*, 206-222.
32. Kanazawa, K.K.; Gordon, J.G. The Oscillation Frequency of a Quartz Resonator in Contact with a Liquid. *Anal Chim Acta* **1985**, *175*, 99-105.
33. Polyakov, M.V. Adsorption properties and structure of silica gel. *Zh Fiz Khim* **1931**, *2*. In: *Molecular Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their applications in analytical chemistry*; Sellergreen, B. **2001**
34. Dickey, F.H. The Preparation of Specific Adsorbents. *P Natl Acad Sci USA* **1949**, *35*, 227-229.
35. Hans, E. *Filtermaterial auf Basis Kieselgel zur Adsorbierung von Nikotin aus Tabakrauch*. Patent **1965**; DE1965M0064131
36. Curti, R.; Colombo, U. Chromatography of Stereoisomers with Tailor Made Compounds. *J Am Chem Soc* **1952**, *74*, 3961-3961.
37. Sellergren, B. *Molecularly imprinted polymers : man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*; 1st ed.; Elsevier: Amsterdam ; New York, 2001;
38. Pauling, L.; Campbell, D.H. The manufacture of antibodies in vitro. *J Exp Med* **1942**, *76*, 211-220.
39. Wulff, G.; Sarhan, A. Use of Polymers with Enzyme-Analogous Structures for Resolution of Racemates. *Angew Chem Int Edit* **1972**, *11*, 341
40. Wulff, G.; Sarhan, A.; Zabrocki, K. Enzyme-Analog Built Polymers and Their Use for Resolution of Racemates. *Tetrahedron Lett* **1973**, 4329-4332.
41. Avila, M.; Zougagh, M.; Escarpa, A.; Rios, A. Molecularly imprinted polymers for selective piezoelectric sensing of small molecules. *Trac-Trend Anal Chem* **2008**, *27*, 54-65.

42. Lieberzeit, P.A.; Rehman, A.; Najafi, B.; Dickert, F.L. Real-life application of a QCM-based e-nose: quantitative characterization different plant-degradation processes. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2008**, *391*, 2897-2903.
43. Latif, U.; Mujahid, A.; Afzal, A.; Sikorski, R.; Lieberzeit, P.A.; Dickert, F.L. Dual and tetraelectrode QCMs using imprinted polymers as receptors for ions and neutral analytes. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2011**, *400*, 2507-2515.
44. Nopper, D.; Lammershop, O.; Wulff, G.; Gauglitz, G. Amidine-based molecularly imprinted polymers - new sensitive elements for chiral chemosensors. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2003**, *377*, 608-613.
45. Alenus, J.; Ethirajan, A.; Horemans, F.; Weustenraed, A.; Csipai, P.; Gruber, J.; Peeters, M.; Cleij, T.J.; Wagner, P. Molecularly imprinted polymers as synthetic receptors for the QCM-D-based detection of L-nicotine in diluted saliva and urine samples. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, *405*, 6479-6487.
46. Jenik, M.; Schirhagl, R.; Schirk, C.; Hayden, O.; Lieberzeit, P.; Blaas, D.; Paul, G.; Dickert, F.L. Sensing Picornaviruses Using Molecular Imprinting Techniques on a Quartz Crystal Microbalance. *Anal Chem* **2009**, *81*, 5320-5326.
47. Seidler, K.; Lieberzeit, P.A.; Dickert, F.L. Application of yeast imprinting in biotechnology and process control. *The Analyst* **2009**, *134*, 361-366.
48. Schirhagl, R.; Latif, U.; Podlipna, D.; Blumenstock, H.; Dickert, F.L. Natural and Biomimetic Materials for the Detection of Insulin. *Anal Chem* **2012**, *84*, 3908-3913.
49. Peeters, M.; Csipai, P.; Geerets, B.; Weustenraed, A.; van Grinsven, B.; Thoelen, R.; Gruber, J.; De Ceuninck, W.; Cleij, T.J.; Troost, F.J.; Wagner, P. Heat-transfer-based detection of L-nicotine, histamine, and serotonin using molecularly imprinted polymers as biomimetic receptors. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, *405*, 6453-6460.
50. Samardzic, R. Polymerbasierte, künstliche Rezeptorschichten für die Sensorik von Bakterienspezies unter realen Bedingungen. Universität Wien: Austria, **2013**.

51. Mallik, S.; Plunkett, S.D.; Dhal, P.K.; Johnson, R.D.; Pack, D.; Shnek, D.; Arnold, F.H. Towards Materials for the Specific Recognition and Separation of Proteins. *New J Chem* **1994**, *18*, 299-304.
52. Ramstrom, O.; Ansell, R.J. Molecular imprinting technology: Challenges and prospects for the future. *Chirality* **1998**, *10*, 195-209.
53. Wulff, G. Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates - a Way Towards Artificial Antibodies. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1995**, *34*, 1812-1832.
54. Vaidya, A.A.; Lele, B.S.; Kulkarni, M.G.; Mashelkar, R.A. Creating a macromolecular receptor by affinity imprinting. *J Appl Polym Sci* **2001**, *81*, 1075-1083.
55. Pang, X.S.; Cheng, G.X.; Lu, S.L.; Tang, E.J. Synthesis of polyacrylamide gel beads with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of bovine serum albumin. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2006**, *384*, 225-230.
56. Bassil, M.; Davenas, J.; EL Tahchi, M. Electrochemical properties and actuation mechanisms of polyacrylamide hydrogel for artificial muscle application. *Sensor Actuators B-Chem* **2008**, *134*, 496-501.
57. Karmalkar, R.N.; Kulkarni, M.G.; Mashelkar, R.A. Molecularly imprinted hydrogels exhibit chymotrypsin-like activity. *Macromolecules* **1996**, *29*, 1366-1368.
58. Gill, I.; Ballesteros, A. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends Biotechnol* **2000**, *18*, 282-296.
59. Venton, D.L.; Gudipati, E. Entrapment of Enzymes Using Organo-Functionalized Polysiloxane Copolymers. *Bba-Protein Struct M* **1995**, *1250*, 117-125.
60. Alemdaroglu, F.E.; Herrmann, A. DNA meets synthetic polymers-highly versatile hybrid materials. *Org Biomol Chem* **2007**, *5*, 1311-1320.
61. Rachkov, A.; Minoura, N. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach. *Bba-Protein Struct M* **2001**, *1544*, 255-266.

62. Shi, H.Q.; Tsai, W.B.; Garrison, M.D.; Ferrari, S.; Ratner, B.D. Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature* **1999**, *398*, 593-597.
63. Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1894**, *27*, 2985-2993.
64. Yoshimatsu, K.; Reimhult, K.; Krozer, A.; Mosbach, K.; Sode, K.; Ye, L. Uniform molecularly imprinted microspheres and nanoparticles prepared by precipitation polymerization: The control of particle size suitable for different analytical applications. *Anal Chim Acta* **2007**, *584*, 112-121
65. Poma, A.; Turner, A.P.F.; Piletsky, S.A. Advances in the manufacture of MIP nanoparticles. *Trends Biotechnol* **2010**, *28*, 629-637.
66. Dickert, F.L.; Hayden, O. Bioimprinting of polymers and sol-gel phases. Selective detection of yeasts with imprinted polymers. *Anal Chem* **2002**, *74*, 1302-1306.
67. Samardzic, R. Sussitz, H. F., Jongkon, N., Lieberzeit, P. A.: *QCM In-line sensing of Escherichia Coli in a Bioreactor using Molecularly Imprinted Polymers*, Sensor Letters 2014, accepted
68. Rothschild, M.A.; Oratz, M.; Schreiber, S.S. Serum-Albumin. *Hepatology* **1988**, *8*, 385-401.
69. Moldave, K. Eukaryotic Protein-Synthesis. *Annu Rev Biochem* **1985**, *54*, 1109-1149.
70. Sabatini, D.D.; Kreibich, G.; Morimoto, T.; Adesnik, M. Mechanisms for the Incorporation of Proteins in Membranes and Organelles. *J Cell Biol* **1982**, *92*, 1-22.
71. Fries, E.; Gustafsson, L.; Peterson, P.A. 4 Secretory Proteins Synthesized by Hepatocytes Are Transported from Endoplasmic-Reticulum to Golgi-Complex at Different Rates. *Embo J* **1984**, *3*, 147-152.
72. Wright, A.K.; Thompson, M.R. Hydrodynamic Structure of Bovine Serum-Albumin Determined by Transient Electric Birefringence. *Biophys J* **1975**, *15*, 137-141.
73. Spector, A.A.; Fletcher, J.E.; Ashbrook, J.D. Analysis of Long-Chain Free Fatty Acid Binding to Bovine Serum Albumin by Determination of Stepwise Equilibrium Constants. *Biochemistry-U.S* **1971**, *10*, 3229-&.

74. Peters, T.; Anfinsen, C.B. Net Production of Serum Albumin by Liver Slices. *J Biol Chem* **1950**, *186*, 805-813.
75. Berson, S.A.; Yalow, R.S.; Schreiber, S.S.; Post, J. Tracer Experiments with I-131 Labeled Human Serum Albumin - Distribution and Degradation Studies. *J Clin Invest* **1953**, *32*, 746-768.
76. Vallner, J.J. Binding of Drugs by Albumin and Plasma-Protein. *J Pharm Sci* **1977**, *66*, 447-465.
77. Kragh-Hansen, U.; Chuang, V.T.G.; Otagiri, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull* **2002**, *25*, 695-704.
78. Edman, P. Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chem Scand* **1950**, *4*, 283-293.
79. Anderson, N.L.; Anderson, N.G. The human plasma proteome - History, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* **2002**, *1*, 845-867.
80. Domon, B.; Aebersold, R. Review - Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **2006**, *312*, 212-217.
81. Zhang, Z.Q.; Smith, D.L. Determination of Amide Hydrogen-Exchange by Mass-Spectrometry - a New Tool for Protein-Structure Elucidation. *Protein Sci* **1993**, *2*, 522-531.
82. Puchner, E.M.; Gaub, H.E. Force and function: probing proteins with AFM-based force spectroscopy. *Curr Opin Struc Biol* **2009**, *19*, 605-614.
83. Gahlin, R.; Jacobson, S. A novel method to map and quantify wear on a micro-scale. *Wear* **1998**, *222*, 93-102.
84. Binnig, G.; Quate, C.F.; Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* **1986**, *56*, 930-933.
85. Jalili, N.; Laxminarayana, K. A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences. *Mechatronics* **2004**, *14*, 907-945.
86. Gross, L.; Mohn, F.; Moll, N.; Liljeroth, P.; Meyer, G. The Chemical Structure of a Molecule Resolved by Atomic Force Microscopy. *Science* **2009**, *325*, 1110-1114.
87. Rotsch, C.; Radmacher, M. Mapping local electrostatic forces with the atomic force microscope. *Langmuir* **1997**, *13*, 2825-2832.

88. Claesson, P.M.; Ederth, T.; Bergeron, V.; Rutland, M.W. Techniques for measuring surface forces. *Advances in Colloid and Interface Science* **1996**, *67*, 119-183.
89. Israelachvili, J.N. Intermolecular and Surface Forces, 3rd Edition. *Intermolecular and Surface Forces, 3rd Edition* **2011**, 1-674.
90. Meyer, E.; Heinzelmann, H.; Grütter, P.; Jung, T.; Weisskopf, T.; Hidber, H.R.; Lapka, R.; Rudin, H.; Güntherodt, H.J. Comparative study of lithium fluoride and graphite by atomic force microscopy (AFM). *Journal of Microscopy* **1988**, *152*, 269-280.
91. Cappella, B.; Dietler, G. Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surf Sci Rep* **1999**, *34*, 1-+.
92. Bede Pittenger, N.E., Chanmin Su, Quantitative Mechanical Property Mapping at the Nanoscale with PeakForce QNM. In Veeco: <http://www.veeco.com/pdfs/appnotes/Quantitative-Mechanical-Property-Mapping-at-the-Nanoscale-with-PeakForce-QNM-AN128-LoRes.pdf>. Available online: (08/2014)
93. Derjaguin, B.V.; Muller, V.M.; Toporov, Y.P. Effect of Contact Deformations on Adhesion of Particles. *J Colloid Interf Sci* **1975**, *53*, 314-326.
94. <http://www.ffmpeg2.de/spekwin/> Available online: (08/2014)
95. Dickert, F.L.; Forth, P.; Tortschanoff, M.; Bulst, W.E.; Fischerauer, G.; Knauer, U. SAW and QMB for chemical sensing. *Proceedings of the 1997 IEEE International Frequency Control Symposium* **1997**, 120-123.
96. Dickert, F.L.; Forth, P.; Bulst, W.E.; Fischerauer, G.; Knauer, U. SAW devices-sensitivity enhancement in going from 80 MHz to 1 GHz. *Sensor Actuators B-Chem* **1998**, *46*, 120-125.
97. Dickert, F.L.; Halikias, K.; Hayden, O.; Piu, L.; Sikorski, R. Sensors based on fingerprints of neutral and ionic analytes in polymeric materials. *Sensor Actuators B-Chem* **2001**, *76*, 295-298.
98. Haupt, K.; Mosbach, K. Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem Rev* **2000**, *100*, 2495-2504.
99. Zeilinger, M. Molekular geprägte Materialien für die Sensorik mittels oberflächenverstärkter Raman-Spektroskopie sowie photonischen Kristallen. Universität Wien, 2013.

100. Huang, J.T.; Zhang, J.; Zhang, J.Q.; Zheng, S.H. Template imprinting amphoteric polymer for the recognition of proteins. *J Appl Polym Sci* **2005**, *95*, 358-361.
101. Lieberzeit, P.A.; Rehman, A.; Yaqub, S.; Dickert, F.L. Nanostructured Particles and Layers for Sensing Contaminants in Air and Water. *Nano* **2008**, *3*, 205-208.
102. Wackerlig, J. *Molecularly imprinted polymers for mass-producible ibuprofen sensors*. Universität Wien: Wien, 2013
103. Hofer, E. Massensensitive Sensorik biologischer Pathogenmodelle mittels polymerer Rezeptoren. Universität Wien: Wien, 2010.
104. Ebner, A.; Wildling, L.; Kamruzzahan, A.S.M.; Rankl, C.; Wruss, J.; Hahn, C.D.; Holzl, M.; Zhu, R.; Kienberger, F.; Blaas, D.; Hinterdorfer, P.; Gruber, H.J. A new, simple method for linking of antibodies to atomic force microscopy tips. *Bioconjugate Chem* **2007**, *18*, 1176-1184.
105. Ivanov, Y.; Marinov, I.; Gabrovska, K.; Dimcheva, N.; Godjevargova, T. Amperometric biosensor based on a site-specific immobilization of acetylcholinesterase via affinity bonds on a nanostructured polymer membrane with integrated multiwall carbon nanotubes. *J Mol Catal B-Enzym* **2010**, *63*, 141-148.
106. Tlili, A.; Abdelghani, A.; Hleli, S.; Maaref, M.A. Electrical characterization of a thiol SAM on gold as a first step for the fabrication of immunosensors based on a quartz crystal microbalance. *Sensors-Basel* **2004**, *4*, 105-114.
107. Ebner, A.; Hinterdorfer, P.; Gruber, H.J. Comparison of different aminofunctionalization strategies for attachment of single antibodies to AFM cantilevers. *Ultramicroscopy* **2007**, *107*, 922-927.
108. Phan, N.V.H. Novel Surface Imprinting Strategies for Selective and Highly Sensitive Protein Recognition: A case study based in QCM sensing of Bovine Serum Albumin, Universität Wien, Wien, 2014.
109. Muratsugu, M.; Ohta, F.; Miya, Y.; Hosokawa, T.; Kurosawa, S.; Kamo, N.; Ikeda, H. Quartz-Crystal Microbalance for the Detection of Microgram Quantities of Human Serum-Albumin - Relationship between the Frequency Change and the Mass of Protein Adsorbed. *Anal Chem* **1993**, *65*, 2933-2937.

110. Lligadas, G.; Percec, V. Ultrafast SET-LRP of methyl acrylate at 25 degrees C in alcohols. *J Polym Sci Pol Chem* **2008**, *46*, 2745-2754.
111. Chaduc, I.; Lansalot, M.; D'Agosto, F.; Charleux, B. RAFT Polymerization of Methacrylic Acid in Water. *Macromolecules* **2012**, *45*, 1241-1247.
112. Zhang, F.X.; Srinivasan, M.P. Self-assembled molecular films of aminosilanes and their immobilization capacities. *Langmuir* **2004**, *20*, 2309-2314.
113. Sepaniak, M.; Datskos, P.; Lavrik, N.; Tipple, C. Microcantilever transducers: A new approach to sensor technology. *Anal Chem* **2002**, *74*, 568a-575a.
114. Lapshin, R.V. Analytical Model for the Approximation of Hysteresis Loop and Its Application to the Scanning Tunneling Microscope. *Rev Sci Instrum* **1995**, *66*, 4718-4730.
115. <http://www.wikipedia.org>; Available online: (01/2014),
116. Ben, O., Practical Advice on the Determination of Cantilever Spring Constants. In Bruker 2010: <http://nanoscaleworld.bruker-axs.com/nanoscaleworld/media/p/143.aspx>. Available online: (08/2014)
117. Bruker, Quantitative Nanomechanical Mapping. In: http://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/SurfaceAnalysis/AFM/Brochures/PeakForce_Quantitative_Nanomechanical_Property_Mapping_b.pdf Available online: (08/2014)
118. Uegaki, H.; Kotani, Y.; Kamigaito, M.; Sawamoto, M. NiBr₂(Pn-Bu-3)(2)-mediated living radical polymerization of methacrylates and acrylates and their block or random copolymerizations. *Macromolecules* **1998**, *31*, 6756-6761.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Sussitz; Hermann Franz

Geburtsdatum: 10.10.1985; Wien

Staatsangehörigkeit: Österreich

Ausbildung

1992-1996: Volksschule der Schulbrüder Strebersdorf

1996-2004: Realgymnasium mit Schwerpunkt Biologie
GRG 21 Ödenburgerstraße

2004-2005: Zivildienst Arbeiter Samariter Bund Österreich
Zweigstelle Floridsdorf Donaustadt

2005-2011: Diplomstudium Chemie, Universität Wien
Diplomarbeit: *Mechanistische Studien zur
Bakterienadsorption an strukturierten Polymeroberflächen
mit AFM und QMB Sensoren*

2011-2014: Doktorat Studium Chemie, Universität Wien

Publikationsliste

2013

Dickert, F. L., Can, S., Samardzic, R., Sussitz, H. F., Latif, U.: *Monitoring Cells and Spores by Biomimetic Sensors - Applications in Biotechnology and Biological Threat*; 16th International Conference on Sensors and Measurement Technology. S. 531-534

Sussitz, H. F. Lieberzeit, P. A.: *BSA as an example for systematic studies of protein-MIP Interactions*; Vortrag Junganalytikerforum 2013

Phan Van Ho, N., Sussitz, H. F., Lieberzeit, P. A.: *Increasing sensitivity of BSA-molecularly imprinted polymer by nanoparticles strategy*; Poster ENFI 2013

Sussitz, H. F., Phan Van Ho, N., Lieberzeit, P.: *Novel one-step templating Strategy for Protein Molecularly Imprinted Polymer*; Poster ENFI 2013

2014

Samardzic, R., Sussitz, H. F., Jongkon, N., Lieberzeit, P. A.: *QCM In-line sensing of Escherichia Coli in a Bioreactor using Molecularly Imprinted Polymers*, Sensor Letters 2014, 12, 1152-1155

Phan Van Ho, N., Sussitz, H. F., Lieberzeit, P. A.: *Polymerization Parameters Influencing the QCM Response Characteristics of BSA MIP*; Biosensors 2014, 4(2), 161-171

Sussitz, H. F., Phan Van Ho, N., Lieberzeit, P.A.: *Protein Molecularly Imprinted Polymers New Imprinting and Characterization Strategies*; Poster Faculty of Chemistry 2014

Sussitz, H. F., Phan Van Ho, N., Ladenhauf, E. Pum, D. Lieberzeit, P.A.: *Pre Organization as a powerful Tool in Protein MIP*; Vortrag International Congress on Molecular Imprinting 2014