

Immobilisierung von Proteinen in elektrogesponnenen polymeren Nanofasern

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Nils Füchtjohann
aus
Iserlohn

Marburg / Lahn 2006

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg am 16. Januar 2006
angenommen.

Erstgutachter:	Prof. Dr. J. H. Wendorff
Zweitgutachter:	Prof. Dr. A. Greiner
Prüfer:	Prof. Dr. L.-O. Essen
Prüfer:	Prof. Dr. B. Neumüller

Tag der mündlichen Prüfung am 26. Januar 2006

1.	Motivation	1
2.	Bioimmobilisierung - Stand der Forschung	6
2.1	Bioimmobilisierung auf einem Trägermaterial	8
	2.1.1 Organische Trägermaterialien	8
	2.1.2 Anorganische Trägermaterialien	9
2.2	Bioimmobilisierung in einem Trägermaterial	10
	2.2.1 Organische Trägermaterialien	10
	2.2.2 Anorganische Trägermaterialien	12
3.	Bioimmobilisierung - Neuartiges Konzept	13
3.1	Konzept zur Bioimmobilisierung in einer privilegierten Umgebung	13
3.2	Materialauswahl der Einzelkomponenten	14
	<u>3.2.1 Trägermaterial</u>	14
	A.I. Theoretische Einführung in die Permeation	15
	Sorption	16
	Diffusion	17
	A.II. Theoretische Einführung in die Osmose	19
	3.2.1.1 Permeationsversuche	21
	Einfluss des Molekulargewichts	22
	Einfluss der Membrandicke	24
	Einfluss des Lösungsmittels	26
	Diffusion kleiner organischer Moleküle	26
	B.I. Elektrosponnen	28
	Grundlagen	28
	Apparativer Aufbau und Theorie des Elektrosponnens	30
	Komplexere Nanofasersysteme	33
	Co-Elektrosponnen	33
	TUFT (Tubes by Fiber Templates)	34

Inhaltsverzeichnis

	Orientierung	36
	Parameter	38
	Anwendung	41
	Herausforderungen	44
	3.2.1.2. Darstellung von Nanofasern aus einem PEO-Blend	44
	<u>3.2.2 Membran</u>	46
C.I	Synthese, präparative Darstellung und Eigenschaften von PPX	46
	Synthese	46
	Präparative Darstellung	49
	Eigenschaften	50
	Photolyse	52
	Photooxidation	53
	3.2.2.1 Experimentelle Charakterisierungen der optischen Eigenschaften von PPX	54
	Absorptionsverhalten von PPX	54
	Fluoreszenzverhalten von PPX	56
	Diskussion der Ergebnisse	59
	<u>3.2.3 Biomolekül</u>	60
D.I.	Historie und wichtigste Entwicklungen von Grün Fluoreszierendem Protein	61
D.II.	Biophysikalische Eigenschaften von Grün Fluoreszierendem Protein	62
	3.2.3.1 Experimentelle Bestimmung der spektroskopischen Eigenschaften von GFP	65
	Bestimmung der Anregungswellenlänge	67
	Bestimmung des Zusammenhangs zwischen GFP-Konzentration und Fluoreszenzintensität	68
	Bestimmung der Fluoreszenzstabilität in Abhängigkeit von der Zeit	71

Fluoreszenzänderung durch einen Analyten	74
Bestimmung der Fluoreszenz nach dem Elektrosponnen	76
3.3 Umsetzung des Konzepts zur Bioimmobilisierung in einer privilegierten Umgebung	77
Nachweis der Immobilisierung	77
Sensorik	86
Lösungsansätze zur Verbesserung der Nanofaserqualität	88
Übertragung des Konzeptes	89
Übertragung des Konzeptes auf ein anderes Biomolekül	95
4. Eingesetzte Chemikalien und Biomoleküle	100
5. Instrumenteller Teil	102
5.1 Experimenteller Aufbau und Auswertung der Permeationsversuche	102
5.1.1 Experimenteller Aufbau	102
5.1.2 Auswertung der Daten	103
5.2 Optischer Aufbau	106
Funktionsweise und Bauelemente des optischen Aufbaus	107
5.3 Schichtdickenbestimmung	110
5.4 Verbrennungsanalyse	111
5.5 Mikroskope	111
5.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR)	111
5.7 Scanning Electron Microscope (SEM)	111
6. Zusammenfassung	112
7. Literatur	116
8. Anhang	125

Inhaltsverzeichnis

8.1	Eidesstattliche Erklärung	125
8.2	Lebenslauf	126
8.3	Danksagung	127

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BFP	Blau Fluoreszierendes Protein
c	Konzentration
c_0	reines Lösungsmittel
$c_{1/2}$	Konzentration am Anfang bzw. am Ende der Membran
$c_{1/2}^{\text{ext}}$	Konzentration vor bzw. hinter der Membran
c_{gT}	Konzentration der gelösten Teilchen
CFP	Cyan Fluoreszierendes Protein
CVD	Chemical Vapor Deposition
D	Diffusionskoeffizient
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
I	Peak Integral (NMR)
J	Teilchenstromdichte
λ	Wellenlänge
m	Masse
M	Molekulargewicht
M(ru)	Masse der Repetiereinheit
n	Stoffmenge der gelösten Substanz
NMR	nuclear magnetic resonance
N_p	Protonenanzahl
$N_p(\text{ru})$	Protonenanzahl pro Repetiereinheit
P	Permeationskoeffizient
Π	osmotischer Druck
PEO	Poly(ethylenoxid)
PPX	Poly(p-xylylen)
PPX-C	Poly(2-chloro-p-xylylen)
PVA	Poly(vinylalkohol)
R	Gaskonstante
S	Sorptionskoeffizient
SEM	Scanning Electron Microscope
st	interner Standard
t	Zeit

Abkürzungsverzeichnis

t´	Verzögerungszeit
T	Temperatur
TUFT	Tubes by Fiber Templates
UV/Vis	Ultraviolett/Visible
V	Volumen
VE Wasser	voll entionisiertes Wasser
wt%	Gewichtsprozent
x	Membrandicke

1. Motivation

„What I want to talk about is the problem of manipulating and controlling things on a small scale... What I have demonstrated is that there is room, that you can decrease the size of things in a practical way... I will not discuss how we are going to do it, but only what is possible in principle...“ [1].

Schon im Jahre 1959 erkannte der Nobelpreisträger Richard Feynman in seinem visionären Vortrag „There is plenty of room at the bottom“ die herausragenden Möglichkeiten, die sich durch die gezielte Manipulation einzelner Atome, Moleküle oder Cluster auf der Nanometerskala ergeben. Spätestens seit diesem Zeitpunkt versucht die Wissenschaft, die Übertragung bekannter Konzepte von der makroskopischen Ebene auf die Nanometerebene voranzutreiben. Dieser Trend lässt sich an neuesten wirtschaftswissenschaftlichen Untersuchungen aus dem Jahr 2003 verdeutlichen. Im Bereich der nanostrukturierten Materialien in Medizin und Biotechnologie wird ein Anstieg des Umsatzes auf 180 Milliarden US \$ im Jahr 2015 vorausgesagt [2]. Viele technische Verfahren in diesen Bereichen machen sich die besonderen Eigenschaften biologischer Materialien wie z.B. Proteine, Bakterien oder Mikroorganismen zu Nutzen. Anwendung finden diese Verfahren hauptsächlich in der optischen Speicherung, Katalyse, chemischen Synthese, Medikamentenfreisetzung oder der Sensorik [3-10]. Für die meisten technischen Anwendungen ist essentiell, dass das Biomaterial über einen ausreichend langen Zeitraum immobilisiert vorliegt.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Konzepte zur Immobilisierung biologischer Moleküle entwickelt und die Anwendungsmöglichkeit dieser Systeme als Biosensor demonstriert. Den Anstoß für diese Forschungsarbeit gab eine Firmenkooperation, durch welche die Entwicklung eines Blutzuckertests für medizinische Labore angestrebt wurde. Im Rahmen dieser Kooperation wurde ein Konzept zur Mikroinkapselung eines Sensormoleküls mit einer semipermeablen Membran zur selektiven Detektion der Glucose im menschlichen Blut mittels Fluoreszenzspektroskopie entwickelt und zur Patentierung eingereicht [11]. Die technische Ausführung dieses Konzeptes zu großflächigen Mikroarrays wurde durch die Mikrotechnik Ehrfeld AG vorangetrieben.

Die Übertragung dieses neuartigen Konzeptes auf den Nanometermaßstab war die entscheidende Herausforderung für die vorliegende Arbeit. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Immobilisierung von Biomaterialien in elektrogesponnenen Polymernanofasern, wodurch eine deutliche Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten und Verbesserung des Konzeptes angestrebt wurde. Der Einsatz von Biomolekülen in nahezu beliebig kleiner räumlicher Umgebung, z.B. in Mikrodurchflußzellen in der Synthese oder als Nanosensor in Mikroarrays, wird dadurch ermöglicht. Die Effizienz von Biomaterialien in technischen Anwendungen hängt entscheidend von deren Zugänglichkeit ab. Durch die Nanostrukturierung in Form einer Faser ist die zur Verfügung stehende Oberfläche um bis zu drei Größenordnungen größer gegenüber der Oberfläche eines Films [12]. Die dadurch generierten kurzen Wege zwischen Biomolekül und Reaktionspartner haben z.B. in der Sensorik eine deutlich schnellere Ansprechzeit zur Folge. Der Zugang zu Polymernanofasern ist über ein seit längerem etabliertes Verfahren, das Elektrospinnen, leicht möglich. Eine Polymerlösung wird bei diesem Prozeß durch eine Metallkanüle gepumpt, an die eine Hochspannung im Bereich von einigen Kilovolt angelegt wird. Im Abstand von einigen Zentimeter bis Dezimeter befindet sich eine Gegenelektrode, zu der die Polymerlösung hin beschleunigt wird. Auf dem Weg zu Gegenelektrode verdampft das Lösungsmittel und die Bildung von Polymernanofasern tritt ein.

In bisher bekannten Verfahren erfolgt die Bioimmobilisierung über physikalische Adsorption [13], die chemische Bindung [14] an anorganischen, organischen oder polymeren Oberflächen, die direkte Einschließung in semipermeable Membranen [15] oder die Einkapselung in Polymermikrokapseln [16] bzw. Hydrogelen [17]. Diese Methoden weisen in der Anwendung teilweise gravierende Nachteile auf. Dazu zählen die nicht erwünschte Desorption bzw. Auswaschen und eine sofortige oder zeitlich verzögerte Denaturierung der Biomoleküle. Darüber hinaus kann das Biomolekül durch Wechselwirkungen mit dem Trägermaterial bzw. durch die Ausbildung chemischer Bindungen daran gehindert werden, seine native Konformation einzunehmen [18, 19]. Die Eigenschaften von Biomolekülen hängen jedoch entscheidend von Ihrer Konformation ab, so dass eine starke Beeinflussung durch die räumliche Fixierung erfolgt.

Das in der Arbeit verfolgte Konzept sieht vor, die Biomoleküle in ihrer nativen fluiden Umgebung in Nanocontainern zu erhalten, sie aber dennoch durch

Immobilisierung von Nanocontainer in polymeren Nanostrukturen, räumlich zu fixieren. Dabei soll die Gesamtstruktur so gewählt werden, dass ein Austausch des kleinen Analyten, nicht aber des großen Sensormoleküls, möglich ist (Abbildung 1-1). Für diese besondere Wirt-Gast-Beziehung wurde der Begriff der „privilegierten Umgebung“ geprägt. Die Realisierung dieser Konfiguration erfolgt durch das Einschleusen des Biomaterials in ein polymeres Trägermaterial, die gezielte Nanostrukturierung des Trägermaterials durch z. B. Elektrospinnen, gefolgt von einer Beschichtung der Fasern mit einer semipermeablen Membran und dem kontrollierten Austausch eines Teils des Trägermaterials gegen ein vorgegebenes Solvens. Die Diffusion nur eines Teils des Trägermaterials durch die Membran wird erreicht, indem ein Polymerblend aus niedrigem und hohem Molekulargewicht verwendet wird, wobei ausschließlich der niedermolekulare Anteil in der Lage ist die semipermeable Membran zu durchdringen. Das Ergebnis ist, dass das Biomolekül umgeben von einer fluiden Matrix in Nanocontainern immobilisiert vorliegt.

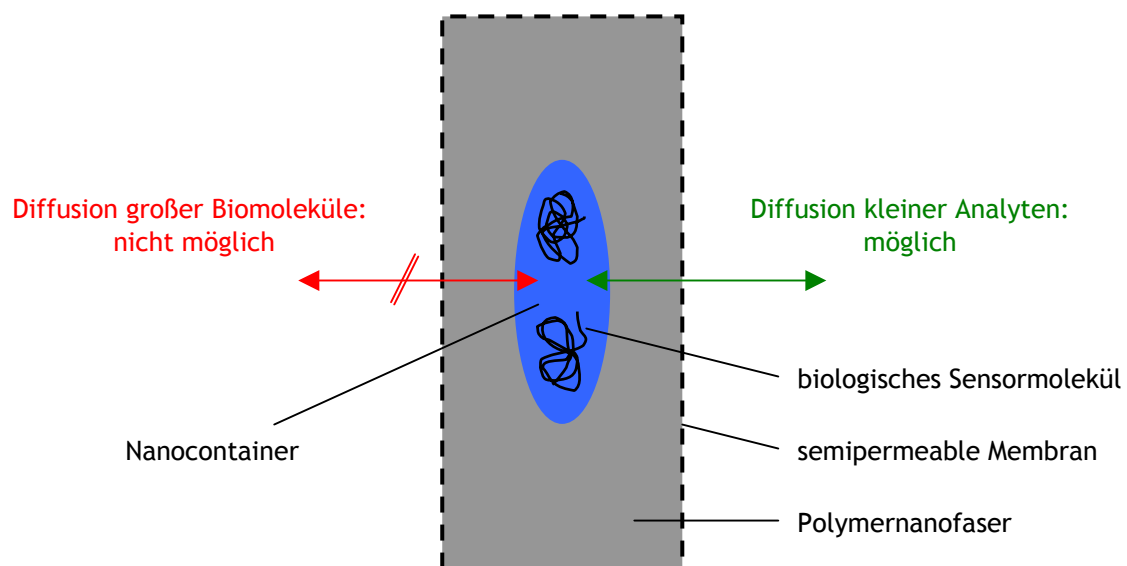


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung des Konzeptes zur Bioimmobilisierung.

Für die Umsetzung dieses Konzeptes sind drei verschiedene Hauptkomponenten notwendig: das polymere Trägermaterial, die semipermeable Membran und das Biomolekül. An die Komponenten werden sehr viele unterschiedliche Anforderungen gestellt. So muß z.B. ein Blend des polymeren Trägermaterials verspinbar sein, die Membran muß stabil und transparent gegenüber UV/Vis-Licht, mechanisch belastbar und gleichzeitig semipermeabel gegenüber dem polymeren Trägermaterial sein und das Biomolekül muß nach dem Einsatz als Zusatzstoff bei dem Elektrosponnen weiterhin intakt sein, um nur einige der notwendigen Charakteristika der einzelnen Komponenten zu nennen.

Zunächst werden die drei Hauptkomponenten bezüglich der unterschiedlichen Anforderungsprofile isoliert betrachtet. Im Anschluss daran setzt sich die Arbeit mit der Fragestellung auseinander, wie die einzelnen Parameter für den Übergang von den isolierten Einzelkomponenten zu der Umsetzung des Gesamtkonzeptes variiert werden müssen. Dann folgen Untersuchungen ob das hier verfolgte Konzept der Bioimmobilisierung zu einem funktionsfähigen System führt. Den Abschluss dieser Arbeit stellt die Übertragung des Konzeptes auf andere Methoden der Nanostrukturierung und die Verwendung anderer Biomoleküle dar.

Die Gliederung dieser Arbeit erfolgt durch Ziffern (1., 2., etc.). Von dieser Gliederung wird bei Unterkapiteln, die sich ausschließlich mit theoretischen Aspekten (wie z.B. Permeation, Elektrosponnen oder PPX) auseinandersetzen, abgewichen und eine Unterteilung durch Großbuchstaben und römische Ziffern (A.I., A.II., etc.) vorgenommen.

Zur besseren Orientierung soll das Flußdiagramm in Abbildung 1-2 dienen, welches schematisch den Ablauf der Arbeit darstellt.

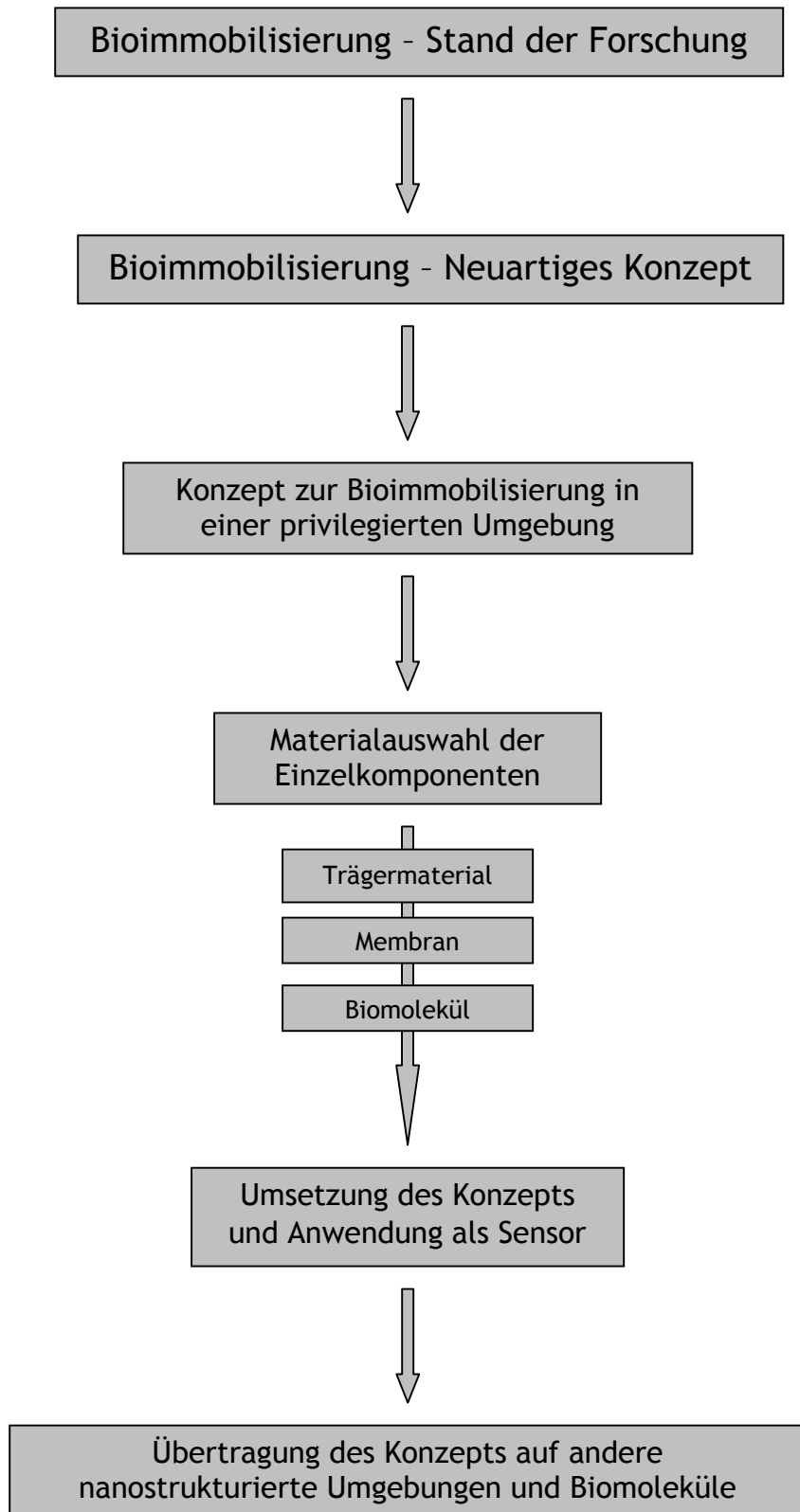


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Ablaufs der Arbeit.

2. Bioimmobilisierung - Stand der Forschung

Die Nanostrukturierung von organischen und anorganischen Materialien zu Fasern, Röhrchen, Stäbchen, Drähten oder Partikeln ist aufgrund deren besonderen elektronischen, optischen und katalytischen Eigenschaften sowohl in der Forschung, als auch in der industriellen Anwendung von großem Interesse. Die Tatsache, dass Proteine, Enzyme oder DNS in ähnlichen Dimensionen vorliegen, ermöglicht es hybride Systeme aus Biomolekül und Nanopartikel mit herausragenden synergetischen Eigenschaften und Funktionen zu schaffen, wie z.B. mit katalytischen oder inhibierenden Fähigkeiten oder der selektiven Erkennung anderer Biomoleküle [20]. Diese Synergieeffekte sind auf die deutliche Vergrößerung des Verhältnisses Oberfläche zu Volumen zurückzuführen. So kann z.B. für den Übergang von Mikro- zu Nanofasern eine Steigerung dieses Verhältnisses um drei Größenordnungen angegeben werden [21]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Empfindlichkeit in ähnlichem Umfang (zwei bis drei Größenordnungen) für ein auf Nanofasern immobilisiertes Sensormolekül erreicht werden kann [22]. Extrem kurze Wege zwischen Biomolekül und Reaktionspartner sind nicht nur in der Biosensorik von großem Nutzen [23-25], so dass Biomolekül-Nanopartikel-Konjugate sich in einer Vielzahl von Anwendungsgebieten wieder finden. Diese hybriden Systeme sind aus medizinischen Anwendungen [26-28] (Gewebezüchtung, Wundheilung, Medikamentenfreisetzung, Implantatbeschichtungen), chemischer Synthese [10] und der Herstellung bioelektronischer Funktionseinheiten nicht mehr wegzudenken [20].

Essentiell für die Anwendung von Biomolekülen in technischen Verfahren ist ihre räumliche Fixierung auf einem Trägermaterial über einen ausreichend großen Zeitraum. Eine effektive Kupplung zwischen Biomolekül und Trägermaterial verhindert ein Auswaschen, wodurch eine stabile Konzentration eingestellt werden kann und darüber hinaus bei manchen hybriden Systemen eine Wiederverwertung des Biomoleküls ermöglicht wird. Die Bioimmobilisierung ermöglicht somit eine enorme Kostenreduzierung.

Für die Bioimmobilisierung mittels eines Trägermediums wird zwischen Anbindung auf einem Trägermaterial oder der Einkapselung in einem solchen Material unterschieden. Die zweite Variante zeichnet sich dadurch aus, dass das

Trägermaterial als semipermeable Membran fungiert, wodurch nicht nur eine Fixierung des Biomoleküls erfolgt, sondern zusätzlich ein regulierender Einfluss auf den Reaktionspartner genommen werden kann. Die bei der Bioimmobilisierung auftretenden Wechselwirkungen sind vielfältig, zu nennen sind unter anderem die physikalische Adsorption, elektrostatische Bindung und kovalente Bindung [29-34]. Das Spektrum an eingesetzten Trägermaterialien ist sehr breit, angefangen bei Metallen, darunter Gold, Platin und Silber, über anorganische Verbindungen, wie z.B. Halbleiter (Bleisulfid, Cadmiumsulfid) und Zeolithe, bis hin zu polymeren Werkstoffen [29-33].

In den nachfolgenden Kapiteln werden Beispiele für aktuelle Methoden aus dem sich rasant entwickelnden Bereich funktionaler Hybridsysteme aus Biomolekülen und nanostrukturierten Trägermaterialien gegeben. Eine Strukturierung dieser Thematik kann auf sehr unterschiedlichen Wegen erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde sich der Herausforderung der Bioimmobilisierung von der materialwissenschaftlichen Seite genähert, so dass eine Unterteilung des theoretischen Hintergrunds in die Bioimmobilisierung auf bzw. in einem Trägermaterial am sinnvollsten erscheint und eine weitere Einordnung in Unterkapitel erfolgt, die zwischen organischen und anorganischen Trägermaterialien unterscheiden.

2.1 Bioimmobilisierung auf einem Trägermaterial

2.1.1 Organische Trägermaterialien

Die Immobilisierung von Biomolekülen über Adsorption auf Polymeren, Polylysin-beschichtetem Glas oder anderen Oberflächen findet seit vielen Jahrzehnten Anwendung (Abbildung 2-1 a)). Diese Kupplungsmethode ist aufgrund der Denaturierung eines Hauptteils der eingesetzten Biomoleküle jedoch sehr ineffizient [35, 36]. Eine Verbesserung dieses Konzeptes wurde durch die Etablierung kovalenter Bindungen zwischen Enzymen und chemisch aktivierten Oberflächen (z.B. Amingruppen [37-44]) erzielt (Abbildung 2-1 b)). Diese Art der Anbindung bringt den Vorteil einer festeren Bindung auf der Oberfläche mit sich. Da sie jedoch unspezifisch ist, birgt sie auch viele Nachteile [45]:

- direkte chemische Modifikationen der reaktiven Gruppen des Enzyms
- sterische Hinderungen durch die Oberfläche
- sterische Hinderungen durch benachbarte Enzyme
- Denaturierung durch mechanische Beanspruchung der Enzyme.

Viele Anstrengungen werden unternommen diese Nachteile zu beheben und so einer Herabsetzung der Aktivität entgegenzuwirken. Die Einführung einer intermediären Schicht bewirkt eine spezifische Orientierung, eine Orientierung der reaktiven Gruppe des Enzyms von der Oberfläche weg (Abbildung 2-1 c)). Diese Schicht besteht aus einem zweiten Protein, welches direkt auf dem Trägermaterial aufgebracht wird und mit dem folgenden Protein nur in der Art Bindungen eingehen kann, dass das eingesetzte Biomolekül mit den reaktiven Gruppen dem Trägermaterial abgewandt angeordnet ist [35, 36, 42, 43, 46, 47].

Trotz der Generierung eines höheren Anteils an aktiven Gruppen hat dieses Konzept entscheidende Nachteile [42, 43]:

- Deutlich höhere Produktionskosten durch ein aufwendigeres Verfahren und Verdopplung der benötigten Menge an Biomaterial.
- Die Dichte der immobilisierten Biomoleküle ist durch die Doppelschichtanordnung geringer.

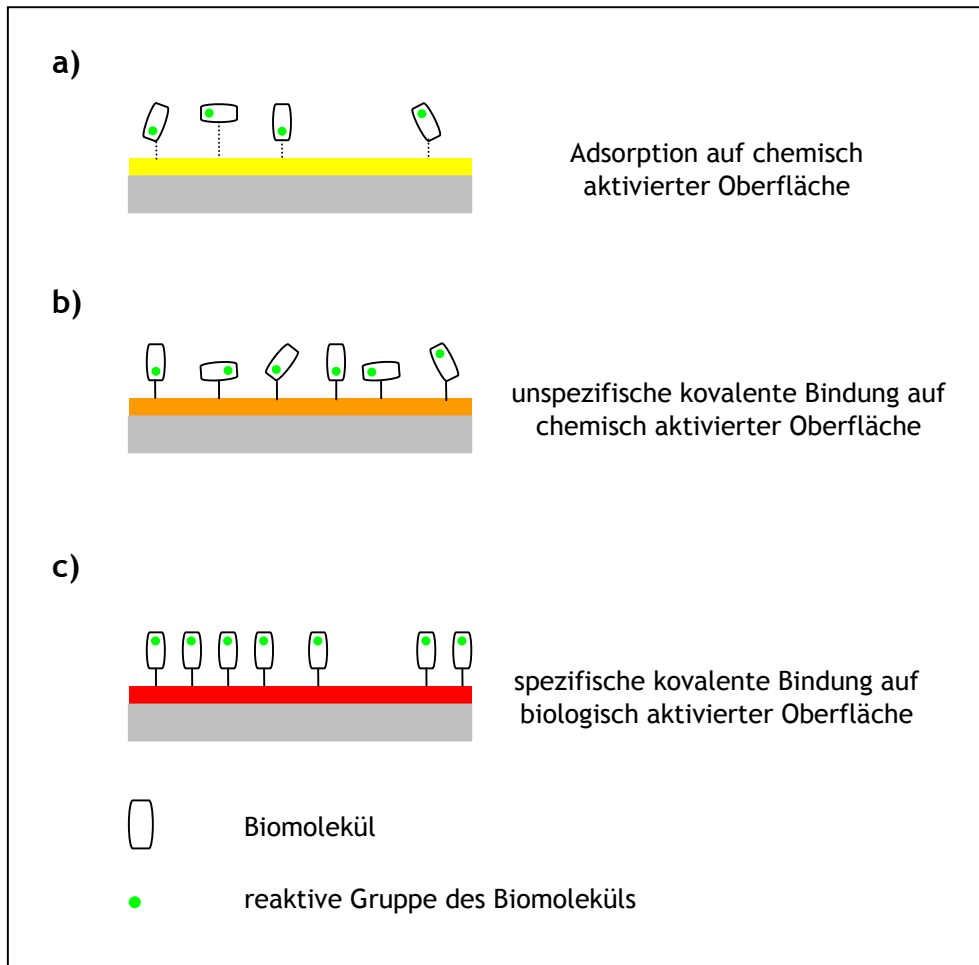


Abbildung 2-1: Bioimmobilisierungsmethoden auf organischen Trägermaterialien mittels a) Adsorption b) unspezifischer kovalenter Bindung und c) spezifischer kovalenter Bindung.

2.1.2 Anorganische Trägermaterialien

Die Möglichkeiten der Oberflächenfunktionalisierung von Metallnanopartikeln sind vielfältig [48-55], wodurch ein breiter Zugang zu der Herstellung von Nanopartikel-Biomolekül-Konjugaten gestattet wird. Die Immobilisierung kann über sehr unterschiedliche Bindungskräfte erfolgen, elektrostatische Wechselwirkungen stellen eine Möglichkeit dar. Umgesetzt wurde dieses Konzept z.B. durch die Funktionalisierung von Gold- bzw. Silbernanopartikeln mit anionischen Liganden (Citrat, Tartrat, Liponat). Die Anziehung zwischen den Carbonsäureanionen und der positiv geladenen Aminosäuregruppe eines zugesetzten Proteins führt zu einem Assoziat, wie es in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt ist [48]. Die Erweiterung

dieses Konzeptes auf eine Mehrschichtanordnung wird durch die Abscheidung von negativ geladenen Polyelektrolyten auf der Proteinschicht und einer erneuten Abscheidung von Biomolekülen ermöglicht [56-61].

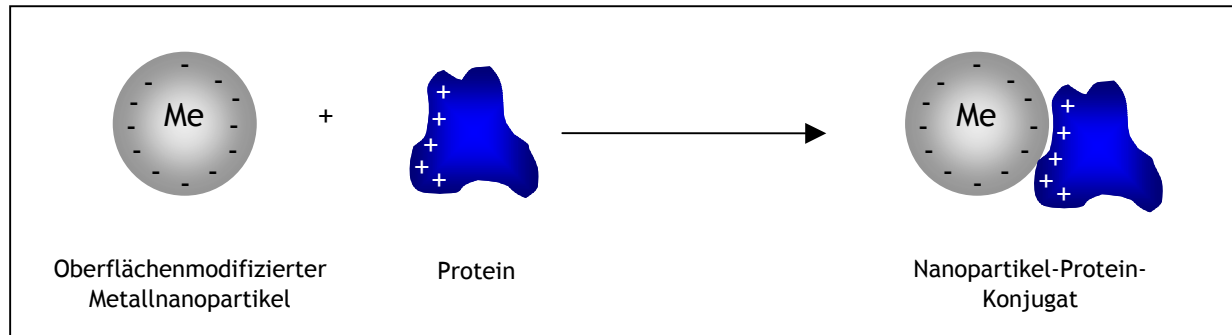


Abbildung 2-2: Bildung eines Nanopartikel-Protein-Konjugats durch elektrostatische Wechselwirkung.

Die Kopplung des Biomoleküls auf der Trägeroberfläche ist unspezifisch. Die Nachteile, die in den vorangegangenen Unterkapitel genannt wurden, treffen deshalb hier in analoger Weise zu.

2.2 Bioimmobilisierung in einem Trägermaterial

2.2.1 Organische Trägermaterialien

Hydrophile aber wasserunlösliche Polymere, die unter Wasseraufnahme sehr stark quellen, werden als Hydrogele bezeichnet. Ihre Biokompatibilität und die Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes ermöglicht die Fixierung von z.B. Proteinen oder Zellen durch chemische oder physikalische Anbindung in eine solche Matrix [62]. Beispiele für eingesetzte Hydrogele sind Poly(vinylalkohol) [63], Collagen [64] und Alginat [65]. Drei Methoden der Bioimmobilisierung sind für diese polymeren Trägermaterialien zu unterscheiden: Adhäsion, Matrixeinschluß und Mikro-einkapselung.

Die Anbindung mittels Adhäsion entspricht dem in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Verfahren. Die Fixierung eines Gastmoleküls in einer Matrix wird durch die Quervernetzung von Hydrogelen zu dreidimensionalen porösen Netzwerken

ermöglicht. Hydrogele schließen Gastmoleküle durch physikalische Wechselwirkungen ein, ermöglichen aber zur gleichen Zeit einen Zugang von essentiellen Nährlösungen und Sauerstoff [62]. In vielen Verfahren werden die Biomoleküle der Monomerlösung zugegeben, wodurch die Wirt-Gast-Komplexe in situ bei der Polymerisation entstehen [66].

Die verbreitetste Methode zur Mikroinkapselung von einzelnen oder mehreren Zellen sieht die Anwendung von Polyelektrolyten vor [67]. Alginat-Polylysin Mikro kapseln werden z.B. in einem ersten Schritt durch die Suspension von Zellen in einer Natrium-Alginat-Lösung erhalten. Ein nachfolgender Schritt ermöglicht die Bildung der erwünschten Partikelform, indem die Suspension in einen Luft- oder Flüssigkeitsstrom aufgenommen und durch eine Nadel gedrückt wird. An der Nadelspitze bilden sich Tropfen aus, welche in eine wässrige Calciumchloridlösung geleitet werden. Die zweiwertigen Calciumkationen rufen eine Gelbildung der negativ geladenen Alginatschicht hervor. Durch die nachfolgende Zugabe von positiv geladenem Polylysin werden stabile Hydrogel-Mikro kapseln ausgebildet [68]. Die mechanischen Kenngrößen, Biokompatibilität und Permeabilität der Mikro kapseln können durch Aufbringen weiterer Schichten stark variiert werden [69].

Eine Mehrschichtanordnung bei der Mikroinkapselung verbessert zwar die mechanischen Eigenschaften, aber insgesamt sind diese bei der Bioimmobilisierung über ein Hydrogel schlechter als bei anderen Fixierungsmethoden. Dies gilt allgemein für die Verwendung von Hydrogelen als Trägermaterial. Darüber hinaus sind Unreinheiten bei natürlichen Polymeren (z.B. Alginat), die die Biokompatibilität deutlich herabsetzen [70], und die niedrige Beständigkeit gegenüber Schwankungen im pH-Wert und der Ionenstärke als Nachteile zu nennen [67].

2.2.2 Anorganische Trägermaterialien

Die säure- oder basekatalysierte Hydrolyse und anschließende Kondensation von Tetraalkoxysilanen $\text{Si}(\text{OR})_4$ in Gegenwart von Enzymen ist ein Beispiel für die Einkapselung eines Biomoleküls in eine Sol-Gel-Matrix. Die Substitution einer Alkoxy- durch eine Alkylgruppe gemäß Abbildung 2-3 setzt die Hydrolysierbarkeit dieser Verbindung deutlich herab, wodurch eine hydrophobere Umgebung erzeugt wird, welche eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität zur Folge [71] hat.

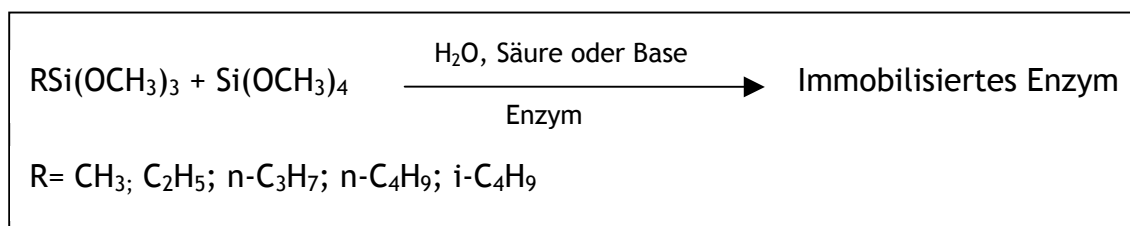


Abbildung 2-3: Reaktionsschema zur Enzymeinkapselung in einer Sol-Gel-Matrix.

Die katalytische Wirkung eines Enzyms hängt jedoch in entscheidendem Maße von seiner Konformation ab (s. 2.1.1), welche extrem von den Wechselwirkungen zwischen Enzym und Sol-Gel-Matrix beeinflusst wird. Abbildung 2-4 zeigt schematisch die Vielzahl der möglichen Wechselwirkungen auf. Zu nennen sind Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals Wechselwirkungen und ionische Interaktionen.

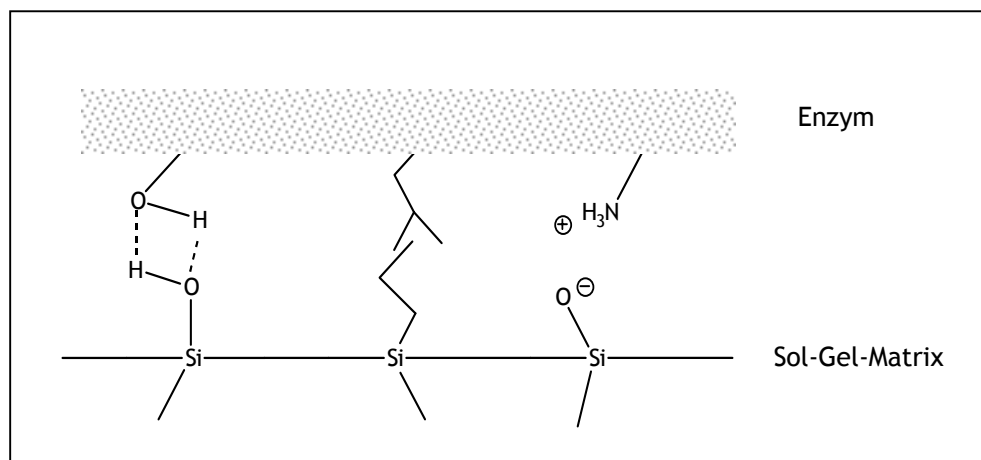


Abbildung 2-4: Wechselwirkungen zwischen Enzym und Sol-Gel-Matrix.

3. Bioimmobilisierung - Neuartiges Konzept

3.1 Konzept zur Bioimmobilisierung in einer privilegierten Umgebung

Die Einsatzmöglichkeiten eines hybriden Systems sollten hauptsächlich durch die Eigenschaften des verwendeten Biomoleküls bestimmt werden und nicht zusätzlich durch das verwendete Bioimmobilisierungskonzept eingeschränkt werden. Kapitel 2.1 zeigt jedoch auf, dass sowohl etablierte Methoden als auch modifizierte Verfahren erhebliche Einschränkungen mit sich bringen. Dies gab Anlass dazu, ein neuartiges Konzept zu entwickeln, welches diese Einschränkungen aufhebt und darüber hinaus auf beliebige Biomoleküle umsetzbar ist. Die Anwendbarkeit des Konzeptes in einem sehr breiten Anwendungsspektrum soll dadurch ermöglicht werden.

Der Aufnahme des Biomaterials in einem Polymerblend folgt die Strukturierung über Elektrospinnen zu Fasern mit einigen Hundert Nanometern Durchmesser. Der Blend besteht aus Polymeren mit sehr niedrigem und sehr hohem Molekulargewicht, so dass nach einer Beschichtung der Nanofasern mit einer semipermeablen Membran nur das niedermolekulare Polymer durch die Membran diffundiert und durch ein Solvens substituiert wird. Das höher molekulare Polymer sowie das Biomolekül sind aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage die Membran zu durchdringen, was die räumliche Fixierung der Biomoleküle in Nanocontainern zur Folge hat. Die Nanocontainer sind durch diese Vorgehensweise mit Pufferlösung gefüllt und ermöglichen somit dem Biomolekül in seiner natürlichen Konformation vorzuliegen (Abbildung 3-1).

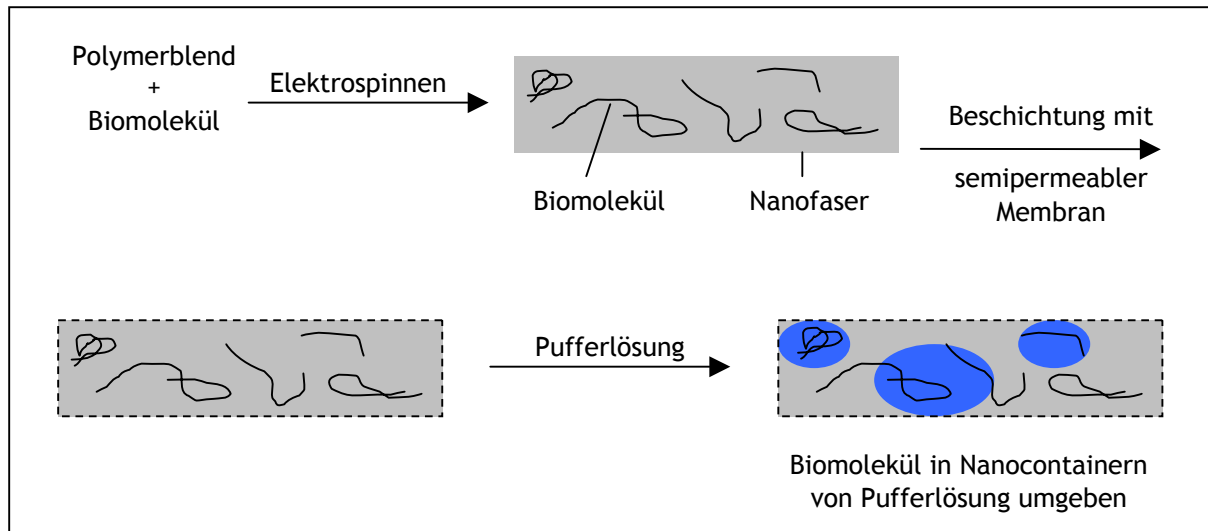


Abbildung 3-1: Konzept zur Immobilisierung eines Biomoleküls in einer privilegierten Umgebung.

3.2 Materialauswahl der Einzelkomponenten

Die Anforderungen an die eingesetzten Komponenten sind vielfältig. Die Auswahl eines geeigneten Träger- und Membranmaterials sowie eines Biomoleküls wird, basierend auf experimentellen Untersuchungen und Literaturdaten, in den nachstehenden Kapiteln vorgestellt.

3.2.1 Trägermaterial

Das eingesetzte Trägermaterial in dem das Biomaterial aufgenommen wird, muß unabhängig von der angestrebten Anwendung eine Vielzahl von Eigenschaften mit sich bringen. Neben der Biokompatibilität ist die Wasserlöslichkeit, sowohl des niedermolekularen als auch des höhermolekularen Polymers, zu nennen, da der Einsatz von organischen Lösungsmitteln wegen des Biomoleküls zu jeder Zeit zu vermeiden ist. Darüber hinaus muß die Polymerblendlösung verspinnbar sein und ein stark differenziertes Permeationsverhalten gegenüber der Membran aufweisen. Die niedermolekulare Komponente muß durch die Membran diffundieren können, was die Bildung von Nanocontainern nach sich zieht, wohingegen das

höhermolekulare Polymer nicht durch die Membran treten soll und dadurch eine mechanisch stabile Matrix ausgebildet wird.

Die aus der Literatur bekannte Wasserlöslichkeit und Biokompatibilität [72] von Poly(ethylenoxid) ($\text{H}-[\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2]_n-\text{OH}$) war Anlass dazu, das Permeationsverhalten und die Verspinnbarkeit des Polymers zu untersuchen. Diesen experimentellen Untersuchungen sind genauere Betrachtungen zu den jeweiligen Theorien bzw. zu dem für diese Arbeit relevanten Hintergrund der entsprechenden Thematik vorangestellt.

A.1. Theoretische Einführung in die Permeation

Der Materietransport durch eine Membran ist durch drei Schritte gekennzeichnet: die Adsorption der Materie auf der Membran, die Diffusion durch die Membran und die Desorption der Materie aus der Membran heraus. Der Gesamtvorgang wird unter dem Begriff der Permeation zusammengefasst, wobei im folgenden nicht zwischen Adsorption und Desorption unterschieden wird, da sie den gleichen Gesetzmäßigkeiten unterliegen und somit allgemein als Sorption beschrieben werden können. Festgehalten wird dieser Zusammenhang in der Gesetzmäßigkeit (3-1) [73-77].

$$(3-1) \quad P = D \cdot S$$

P: Permeationskoeffizient
D: Diffusionskoeffizient
S: Sorptionskoeffizient

Die genaue Beschreibung der Permeation von kleinen Molekülen durch eine porenfreie Membran muß sowohl unter kinetischen (Diffusion), als auch thermodynamischen (Sorption) Aspekten diskutiert werden, was zur Folge hat, dass sich Parameterveränderungen in den Koeffizienten D und S sehr unterschiedlich niederschlagen [76]. So zieht z.B. eine Erhöhung der Permeandengröße genau gegenläufige Effekte nach sich. Einer Zunahme des Sorptionskoeffizienten steht eine Erniedrigung des Diffusionskoeffizienten gegenüber. Da insbesondere der Diffusionskoeffizient starken Einfluss auf das Permeationsverhalten nimmt, ist insgesamt ein Abfall in der Permeabilität zu verzeichnen [76]. Die zweite Einflussgröße auf das Permeationsverhalten eines gelösten Polymers durch eine Polymermatrix ist das verwendete Lösungsmittel. Der wichtigste Aspekt hierbei ist

in dem Quellverhalten der Membran zu sehen. Ein gut quellendes Lösungsmittel erhöht die Beweglichkeit in der Membran, aber auch gleichzeitig die Membrandicke, so dass der zurückzulegende Weg erhöht wird. Der erste Parameter hat einen deutlich größeren Einfluss, so dass insgesamt eine Erhöhung des Permeationskoeffizienten eintritt [76].

Eine Temperaturabhängigkeit liegt für beide Teilschritte der Permeation vor. Die Dichte kann als Anhaltspunkt für das vorhandene freie Volumen in der polymeren Matrix dienen, welches entscheidend die Diffusionsfähigkeit beeinflusst. Dieser Zusammenhang macht deutlich, dass der Abstand der Temperatur, bei der die Untersuchungen durchgeführt werden, zur Glas temperatur der Matrix von entscheidender Bedeutung ist [76]. Darüber hinaus wird das Sorptionsverhalten dahingehend beeinflusst, dass die Löslichkeit eines Permeanden in der polymeren Matrix zwar im allgemeinen mit der Temperatur ansteigt, bei Zunahme der Wechselwirkungen zwischen Permeand und Matrix der Gesamtvorgang der Permeation hingegen wieder herabgesetzt wird [76].

Die sehr starken Veränderungen in dem Sorptions- bzw. Diffusionsverhalten durch die aufgeführten Parameter (Permeandengröße, Temperatur, etc.) machen es für die nachfolgende Diskussion der Teilschritte notwendig, diese Parameter als konstant anzusehen.

Sorption

Unter die Sorption von Materie fallen die Adsorption auf der Membranoberfläche, die Einbindung in Lücken in der Membran und die Cluster-Bildung der Materie unter einander. Daraus ergibt sich, dass sowohl eine Betrachtung der Wechselwirkungen zwischen Permeand und Matrix als auch unter den Permeanden selbst notwendig ist [76].

Geringe Wechselwirkungen unter den Permeanden selbst und mit dem Barrierematerial werden als Henry-Sorption bezeichnet. Eine geringe Löslichkeit des Permeanden in der Matrix ist hier festzustellen [76]. Sehr starke Wechselwirkungen zwischen Permeand und polymerer Membran führen zu einer intensiven Anbindung der Polymere auf der Membranoberfläche. Nur ein sehr

geringer Teil der sorbierten Teilchen ist in der Lage in die Membran weiter einzudringen bzw. zu desorbieren (Langmuir Sorption) [76]. Eine Flory-Huggins Sorption tritt auf, wenn die Permeand/Permeand Wechselwirkungen stark im Vergleich zu den Permeand/Matrix Wechselwirkungen sind. Die Aggregation von Permeanden in der Matrix erleichtert die Sorption weiterer Moleküle [76]. Eine Kombination aus Langmuir und Flory-Huggins Sorption ist in der Brunauer-Emmett-Teller (BET) Sorption beschrieben. Starke Wechselwirkungen sowohl unter den Permeanden selbst als auch zwischen Permeand und Matrix schlagen sich in einer steigenden Löslichkeit der Permeanden in der Membran nieder. Dies ist auf die starke Anbindung an die Membranoberfläche und die gleichzeitige Clusterbildung der Permeanden untereinander zurückzuführen. Eine Verbesserung des Sorptionsverhaltens wird durch eine Konzentrationserhöhung erzielt [76]. Der am häufigsten beobachtete Fall, die Dual-mode Sorption, setzt sich aus den beiden Sorptionsmechanismen Henry und Langmuir zusammen. Die Langmuir Sorption wird dahingehend verändert, dass die immobilisierten Moleküle weniger stark an die Membranoberfläche gebunden sind und dadurch eine größere Beweglichkeit erzielt wird [76].

Diffusion

Der Sorption auf der Membranoberfläche schließt sich die Bewegung der Moleküle durch die Membran, die Diffusion, an. Die Diffusion durch eine polymere Membran ist in entscheidendem Maße von den Wechselwirkungen zwischen dem Permeanden und der Matrix abhängig. Dabei sind zwei Extremfälle zu unterscheiden: die nahezu wechselwirkungsfreie Beziehung zwischen Permeand und Matrix und die intensive Anziehung zwischen beiden. Für beide Grenzfälle wird ein theoretisches Modell zur Beschreibung der Diffusion vorgestellt. Das Diffusionsverhalten einer Polymerlösung durch eine Membran entspricht in der Realität jedoch nicht einem der beiden Idealfälle, sondern es liegt ein fließender Übergang zwischen beiden vor.

Liegt eine nahezu wechselwirkungsfreie Beziehung zwischen kleinen Molekülen wie z.B. Gase oder Flüssigkeiten und einer polymeren Matrix geringer Dichte vor, ist die Sorption vernachlässigbar klein und die Diffusion als geschwindigkeitsbestimmender

Faktor anzusehen [76]. Zur Beschreibung dieses Prozesses kann die „Freie-Volumen“ Theorie [73-77] herangezogen werden. Dabei wird der Raum zwischen Polymerketten in den die Permeanden eindringen können als Freies Volumen aufgefasst. Ein niedriger Kristallinitäts- und Vernetzungsgrad trägt somit zur Erleichterung der Diffusion bei. Der Materietransport innerhalb der Membran wird durch die Bewegung von Polymerkettensegmenten ermöglicht, die eine Verbindung zwischen zwei Kavitäten herstellt und so den Sprung eines Permeanden von einer Kavität zur anderen gestattet (Abbildung 3-2). Basierend auf diesem Modell sind die wichtigsten Faktoren bei der Diffusion kleiner Moleküle, die geringe Wechselwirkungen mit der polymeren Matrix aufweisen, die Größe des Permeanden, die Beweglichkeit der polymeren Matrix, sowie die Anzahl und die Größe der Kavitäten [73-76].

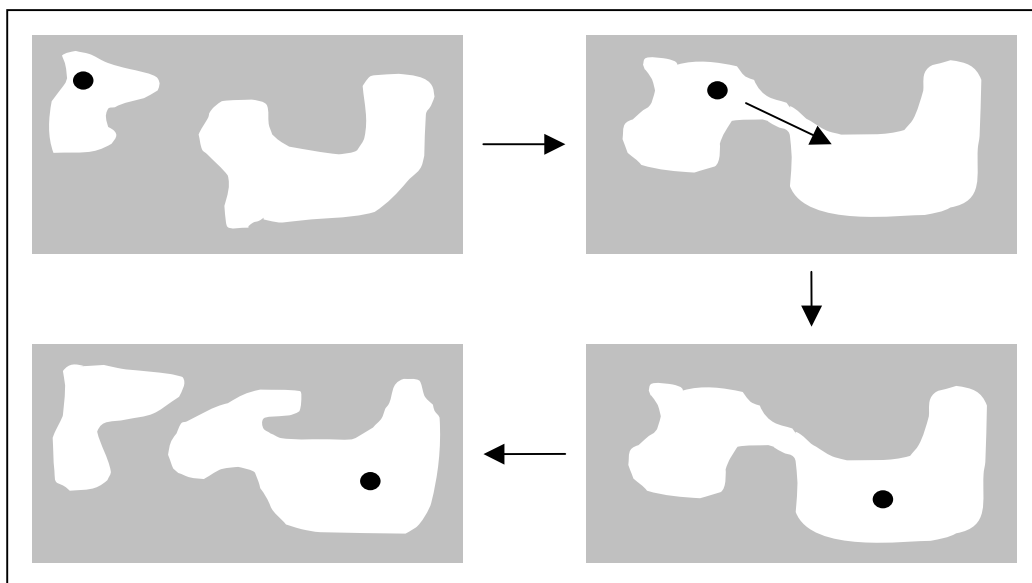


Abbildung 3-2: Materietransport durch eine Polymermatrix basierend auf dem Sprungmodell durch Freies Volumen.

Das Sprungmodell besitzt nur Gültigkeit für kleine Moleküle (z.B. Gase oder Flüssigkeiten) die eine geringe Wechselwirkung mit der polymeren Matrix zeigen. Bei einem Wechsel zu dem anderen Extrem, der Bewegung langkettiger Moleküle durch eine polymere Matrix muß folgerichtig eine andere Theorie herangezogen werden. Diese trägt den starken Wechselwirkungen zwischen Permeand und polymerer Matrix Rechnung, sowie dem Auftreten von Quervernetzungen und kristallinen Bereichen. Diese Bereiche stellen für die Diffusion langer Molekülketten

nicht penetrierbare Hindernisse dar und sind der Grund dafür, dass das Sprungmodell für diese Konstellation nicht anwendbar ist. Für die Beschreibung der Permeation hat sich in diesem Fall das Reptationsmodell (lat.: reptare = kriechen) [78-91] durchgesetzt. Dieses Modell adaptiert das Verhalten einer Schlange auf diese Problematik, indem es den Materietransport als eine kurvenlineare Bewegung entlang der Kontur der Kette um die Hindernisse herum beschreibt, ganz so wie sich eine Schlange um Hindernisse herum bewegt. Das Modell verdeutlicht, dass neben der Form und Größe des Permeanden die Beweglichkeit der Matrix von entscheidender Bedeutung ist. Letzteres korreliert mit der Kettenlänge der Matrixmoleküle, dem Kristallinitätsgrad, dem Quervernetzungsgrad und der Temperatur [79]. Mit dem Wechsel von dem Sprungmodell zu dem Reptationsmodell nimmt der Einfluss der Sorption enorm an Bedeutung zu, eine Verlangsamung der Diffusion ist die Folge.

A.II. Theoretische Einführung in die Osmose

Die experimentellen Untersuchungen des Permeationsverhaltens von Polymeren werden nicht nur durch den reinen Vorgang der Permeation sondern auch durch die auftretende Osmose beeinflusst, so dass eine Einführung in die Theorie der Osmose unerlässlich ist. In wie weit die experimentellen Untersuchungen durch die Osmose beeinflusst werden, wird am Ende dieses Kapitels diskutiert.

Das Phänomen der Osmose (griech.: osmos = schieben, stoßen) beschreibt die Diffusion von reinem Lösungsmittel c_0 durch eine semipermeable Membran in eine höher konzentrierte Lösung c_1 . Das Verdünnungsbestreben der höher konzentrierten Lösung resultiert, für den Fall eines abgeschlossenen Systems, in einem Anstieg des hydrostatischen Drucks, welcher der Osmose entgegenwirkt. Dieser als osmotische bezeichnete Druck ist somit eingestellt, wenn die Anzahl der Lösungsmittelmoleküle die von Lösung c_0 nach c_1 diffundieren, im Gleichgewicht mit der Molekülanzahl stehen, die durch den osmotischen Druck in die entgegengesetzte Richtung transportiert werden (Abbildung 3-3).

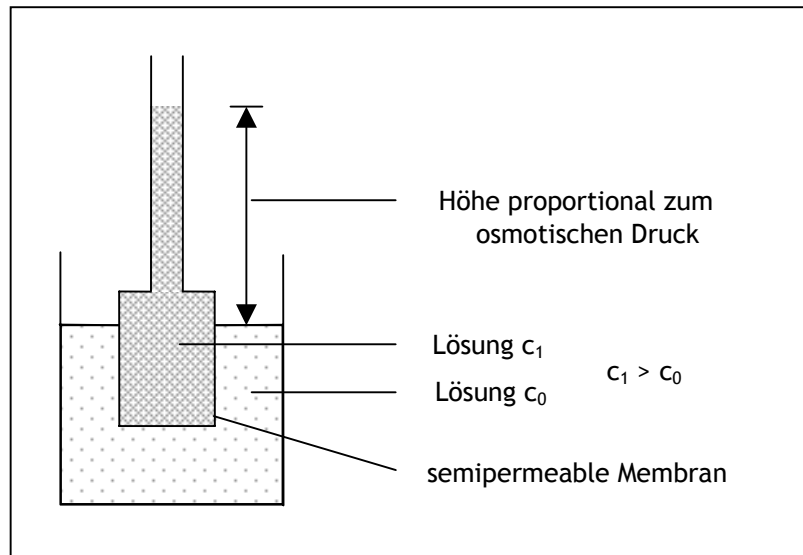


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung zur Beschreibung des osmotischen Drucks.

Van't Hoff stellte 1887 eine, der Zustandsgleichung für ideale Gase analoge, Gleichung auf, nach der für hinreichend verdünnte Lösungen folgender Zusammenhang besteht:

$$(3-2) \quad \Pi V = n R T \quad .$$

Π : osmotischer Druck
 V : Volumen
 n : Stoffmenge der gelösten Substanz
 R : Gaskonstante
 T : Temperatur

Umformungen basierend auf den Verhältnissen der Masse m zu dem Molekulargewicht M ($n = m/M$) und der Masse m zu dem Volumen V ($c_{gT} = m/V$) ergibt:

$$(3-3) \quad \Pi = \frac{c_{gT} R T}{M} \quad .$$

c_{gT} : Konzentration der gelösten Teilchen

Gleichung 3-3 ist zu entnehmen, dass sich der osmotische Druck direkt proportional zur Temperatur und reziprok zum Molekulargewicht der gelösten Substanz verhält. Für die Konzentration besteht ebenfalls ein proportionaler Zusammenhang, dabei ist jedoch zu beachten, dass es sich bei dem osmotischen Druck um eine kolligative Eigenschaft handelt und somit der Druck durch die Anzahl der gelösten Teilchen beeinflusst wird. So hat z.B. eine ein molare Kaliumchloridlösung aufgrund der

Dissoziation in ein Ionenpaar einen ungefähr doppelt so hohen osmotischen Druck wie eine ein molare Glucose-Lösung.

Den theoretischen Ausführungen ist zu entnehmen, dass die Osmose einen direkten Einfluss auf die Permeation hat. Zum einen werden durch das Verdünnungsbestreben der höher konzentrierten Lösung die Polymerkonzentrationen verändert und zum anderen wird durch den osmotischen Druck die Membran mechanisch belastet, wodurch die Membran reißen kann.

3.2.1.1 Permeationsversuche

Die Permeationsversuche wurden gemeinsam mit Herrn Dr. Phillip Hanefeld (Arbeitsgruppe Prof. Andreas Greiner, Universität Marburg) durchgeführt. Teile der gemeinsam erzielten Ergebnisse sind in der Dissertation von Herrn Dr. Phillip Hanefeld enthalten [147].

Analysiert wurde die Permeation in einer Zweikammeranordnung mit einer Membran dazwischen. Der genaue experimentelle Aufbau in dem die Permeationsversuche durchgeführt wurden und Erläuterungen zu der Auswertung der gewonnenen Daten sind in Kapitel 5.1 wiedergegeben.

Die Dauer des gesamten Permeationsversuchs eines Polymeren durch eine polymere porenfreie Membran mit Schichtdicken von einigen Mikrometern liegt typischerweise im Bereich von Tagen, bis hin zu einigen Wochen. Diese extrem lange Versuchsdauer hat einen direkten Einfluss auf die praktischen Untersuchungen. Bei den durchgeführten Experimenten konnten verschiedene Probleme auftreten, die es verhinderten den Versuch bis zum vollständigen Konzentrationsausgleich durchzuführen.

Die eingesetzten Membrandicken waren mit einigen Mikrometern sehr gering, so dass ein Reißen aufgrund von Materialermüdung eintreten konnte. Diese Problematik wurde durch den Anstieg des osmotischen Drucks im Verlaufe eines Versuches stark erhöht. Ein anderer Grund für den Abbruch des Experimentes

konnte darin liegen, dass die Probennahme nicht mehr durchgeführt werden konnte, da keine Lösung mehr vorhanden war, welches durch die Vielzahl der zuvor genommenen Proben bedingt war. Diese Umstände ließen eine möglichst geringe Versuchsdauer notwendig erscheinen, was durch die Wahl des Lösungsmittels reguliert werden konnte. Das Quellverhalten des eingesetzten Membranmaterials (PPX) gegenüber organischen Lösungsmitteln wie z.B. Chloroform ist aufgrund seines hydrophoben Charakters deutlich ausgeprägter, als es bei Wasser der Fall ist. Der theoretischen Einführung in die Permeation (Kapitel A.I.) ist zu entnehmen, dass dies einen deutlichen Anstieg der Diffusionsgeschwindigkeit zur Folge hat und darüber hinaus die Permeation von deutlich größeren Molekülen im zeitlichen Rahmen der Versuche zulässt. Eine genaue Beschreibung der Abhängigkeiten des Permeationsprozesses von dem eingesetzten Molekulargewicht des PEO und der verwendeten PPX-Schichtdicke erfolgte deshalb unter Verwendung von Chloroform-d¹ als Lösungsmittel.

Für das in dieser Arbeit entwickelte Konzept ist die Verwendung eines organischen Lösungsmittels auf Grund des Einsatzes eines Biomoleküls jedoch ausgeschlossen. Deshalb wurden im Anschluss verschiedene Messreihen mit Wasser durchgeführt, die es ermöglichen die zuvor gewonnenen Erkenntnisse auf wässrige Systeme zu übertragen.

Einfluss des Molekulargewichts

Eine sehr starke Abhängigkeit der Diffusionsgeschwindigkeit von der Größe des Permeanden konnte durch den Einsatz von unterschiedlichen PEO Molekulargewichten nachgewiesen werden. Dafür wurde eine Versuchsreihe mit Molekulargewichten von 200 bis 3000 g/mol durchgeführt. Die Schichtdicke der eingesetzten PPX-Membran betrug in jedem Experiment circa 3 µm.

Gemäß Abbildung 3-4 zeigt PEO 1000 einen typischen Verlauf eines Permeationsversuchs mit einer kurzen Induktionsphase, die in einen steilen linearen Anstieg übergeht und in einer Sättigung endet. Die Verdopplung des Molekulargewichts hat die Vergrößerung der Induktionsphase um circa eine Größenordnung und einen deutlich flacheren Anstieg im zweiten Schritt des

Permeationsprozesses zur Folge. Der Übergang in die Sättigung konnte aus experimentellen Gründen nicht deutlicher nachgewiesen werden.

Abbildung 3-4 und speziell 3-5 ist zu entnehmen, dass eine weitere Steigerung des Molekulargewichts auf 3000 g/mol die Permeation durch die 3 µm dicke Membranschicht so stark verringert, dass sie in dem durch die Versuchsanordnung gesetzten Zeitrahmen nicht mehr feststellbar ist.

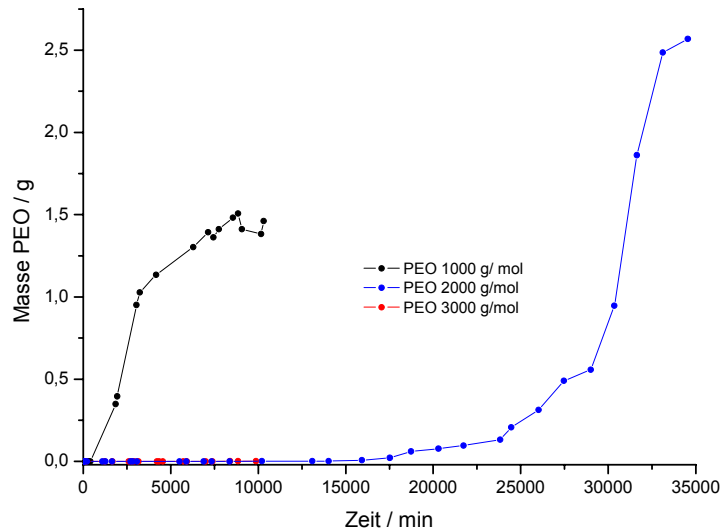


Abbildung 3-4: Permeation von PEO unterschiedlichen Molekulargewichts durch eine 3 µm PPX-Membran unter Verwendung von CDCl_3 als Lösungsmittel.

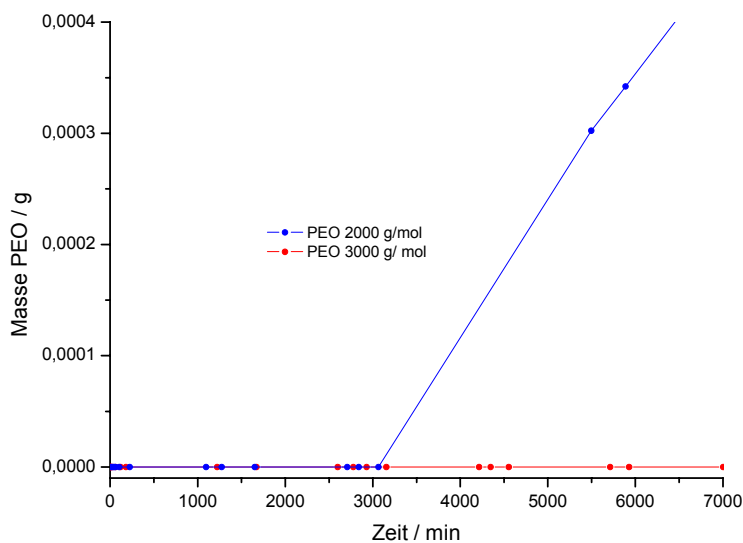


Abbildung 3-5: Permeation von PEO 2000 und 3000 durch eine 3 µm PPX-Membran unter Verwendung von CDCl_3 als Lösungsmittel.

Dem graphischen Nachweis der Reduktion der Diffusionsgeschwindigkeit durch den Anstieg des Molekulargewichts der permeierenden Substanz mit Hilfe der beiden vorausgehenden Abbildungen, folgt mit den Daten in Tabelle 3-1 der quantitative Nachweis dieses Zusammenhangs. Bei den aufgeführten Daten handelt es sich um Mittelwerte aus verschiedenen Messreihen, da die Messergebnisse starken Schwankungen unterlagen. Neben den schon beschriebenen Problemen bei der Durchführung der Messungen (dem Reißen der Membran, der Osmose, etc.) sind mögliche Abweichungen in der Membrandicke als Grund für diese Schwankungen anzuführen. Wie die Ergebnisse aber zeigen, stimmen die gewonnenen qualitativen Erkenntnisse sehr gut mit der Theorie überein und die quantitativen Ergebnisse sind mit Literaturdaten in Übereinstimmung zu bringen [92, 93].

Mit diesem Hintergrund kann festgestellt werden, dass eine Steigerung des Molekulargewichts um circa eine Größenordnung eine Reduktion des Diffusionskoeffizienten um ungefähr drei Größenordnungen nach sich zieht.

PEO / g mol ⁻¹	Diffusionskoeffizient D / 10 ⁻¹⁹ m ² s ⁻¹
200	110.000
1000	500
3000	7

Tabelle 3-1: Diffusionskoeffizienten D für PEO unterschiedlichen Molekulargewichts unter Verwendung von Chloroform-d¹ als Lösungsmittel.

Einfluss der Membrandicke

Andere Versuchsreihen, mit einer konstant gehaltenen Permeandengröße bei Variation der Schichtdicke, sollten weiteren Aufschluss über das Permeationsverhalten von PEO durch PPX geben. Abbildung 3-6 ist zu entnehmen, dass die Gesamtdauer des Permeationsprozesses von PEO 3000 durch eine PPX-Membran bei Anwachsen der Dicke von ungefähr ein auf drei µm sehr stark ansteigt. Diese Beobachtung stimmt sehr gut mit der Theorie überein, der eine Abhängigkeit der Permeationsdauer vom Quadrat der Membrandicke zu entnehmen ist (Gleichung 5-10, Seite 106).

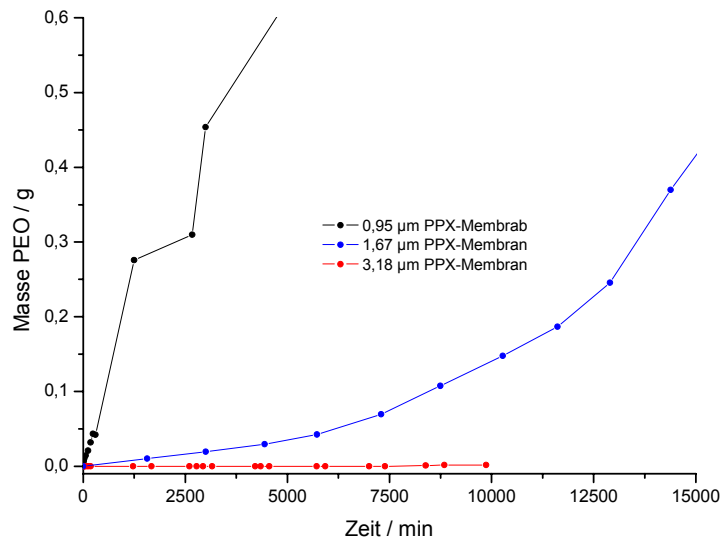


Abbildung 3-6: Permeation von PEO 3000 durch PPX-Membranen verschiedener Schichtdicke unter Verwendung von CDCl_3 als Lösungsmittel.

Betrachtet man die Permeation des sehr viel kleineren PEO 200 durch Membranen verschiedener Dicke, so wird gemäß der Theorie deutlich, dass der Permeationskoeffizient in erster Näherung von der Schichtdicke unabhängig ist. Dies wird durch die Diffusionskoeffizienten in Tabelle 3-2 belegt, welche um den Wert $13 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ schwanken. Die Schwankungen sind wiederum auf die zuvor beschriebenen experimentellen Probleme zurückzuführen.

PPX-Membrandicke / μm	Diffusionskoeffizient $D / 10^{-15} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$
1,0	4,4
1,2	16
2,0	12
2,4	24
2,6	3,8
3,6	17

Tabelle 3-2: Diffusionskoeffizienten für PEO 200 durch eine PPX-Membran verschiedener Schichtdicke unter Verwendung von CDCl_3 als Lösungsmittel.

Einfluss des Lösungsmittels

Der Wechsel von dem organischen Lösungsmittel Chloroform-d¹ zu dem Lösungsmittel D₂O hat, wie oben bereits erläutert, einen dramatischen Einfluss auf das Permeationsverhalten von PEO durch eine PPX-Membran. Ein Absinken der Diffusionsgeschwindigkeit um ungefähr einen Faktor drei, konnte für diesen Wechsel anhand von Untersuchungen mit PEO 200 nachgewiesen werden (Tabelle 3-3).

PEO 200	Diffusionskoeffizient D / 10 ⁻¹⁹ m ² s ⁻¹
CDCl ₃	110.000
D ₂ O	40.000

Tabelle 3-3: Diffusionskoeffizienten D für PEO 200 in Abhängigkeit von dem verwendeten Lösungsmittel.

Die Steigerung des PEO Molekulargewichts von 200 auf 1000 g/mol spiegelt die sehr geringe Beweglichkeit einzelner Polymerkettensegmente der Membran bei dem Einsatz von D₂O wider. Die Permeation des PEO 1000 wird vollständig verhindert.

Diffusion kleiner organischer Moleküle

Die reine Immobilisierung von Biomolekülen an Hand dieses neuartigen Konzeptes stellt noch keinen entscheidenden Fortschritt dar. Erst der Nachweis, dass das fixierte Molekül weiterhin zu Reaktionen mit anderen Verbindungen in der Lage ist, macht dieses Konzept für Anwendungen z.B. in der Synthese oder Sensorik interessant. Voraussetzung dafür ist, dass neben kleinen Polymeren auch andere Verbindungen durch die PPX-Membran diffundieren können und so in die räumliche Nähe des Biomoleküls gelangen können.

Für den Nachweis, dass neben kleinen Polymeren auch andere kleine Moleküle in der Lage sind eine PPX-Schicht zu durchdringen, wurden Diffusionsversuche mit einer 1,7 molaren wässrigen Harnstofflösung (H₂N-CO-NH₂) und einer 1,3 µm dicken

PPX-Membran durchgeführt. Dieser Versuch stimmt mit den in Kapitel 5.1.1 beschriebenen Permeationsversuchen in nahezu allen Punkten überein. Abweichend von den Polymerversuchsreihen ist nur die Analytik der Proben. Die Bestimmung der diffundierten Harnstoffmenge erfolgte mittels Verbrennungsanalyse (näheres siehe Kapitel 5.4). Dafür wurde die Menge an gebundenem Stickstoff nach Oxidation zu Stickstoffoxiden bestimmt, wodurch die Gesamtmenge an diffundiertem Harnstoff in Abhängigkeit von der Zeit berechnet werden konnte. Die Stickstoffbestimmung mittels Verbrennungsanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Lars Füchtjohann im HuK Umweltlabor GmbH/Wenden-Hünsborn durchgeführt.

Die Auftragung der experimentellen Daten (Abbildung 3-7) zeigt, dass die Diffusion von Harnstoff durch PPX möglich ist und das Diffusionsverhalten analog zu der Diffusion von kleinen Polymeren ist. Der Diffusionskoeffizient liegt mit $D = 1,6 \cdot 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ in der Größenordnung von PEO 200 in Wasser (Tabelle 3-3).

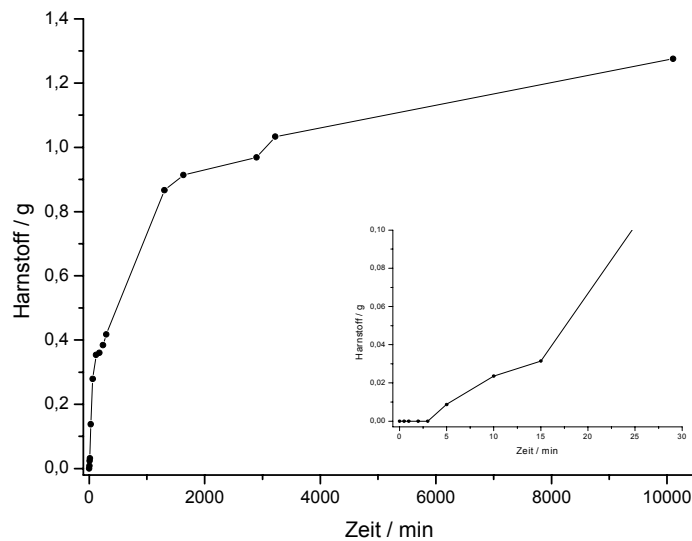


Abbildung 3-7: Diffusionsverhalten einer 1,7 molaren wässrigen Harnstofflösung durch eine 1,3 μm dicke PPX-Membran.

B.1. Elektrosponnen

Viele Eigenschaften des PEO wie z.B. die Biokompatibilität und Wasserlöslichkeit sind seit langem in der Literatur bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten weitere Charakteristika des PEO bestimmt werden. Ein stark differenziertes Permeationsverhalten von PEO durch eine PPX-Membran in Abhängigkeit von dem PEO Molekulargewicht und der PPX-Membrandicke konnte herausgearbeitet werden. Zur Umsetzung des angestrebten Bioimmobilisierungskonzeptes (Kapitel 3.1) sind weitere Voruntersuchungen notwendig. Nachfolgender Abschnitt stellt Versuchsreihen bezüglich der Verspinnbarkeit verschiedener PEO-Blends vor. Den experimentellen Daten ist eine theoretische Einführung in die Nanostrukturierung über Elektrosponnen vorangestellt.

Grundlagen

Eindimensionale Nanostrukturen sind aufgrund ihrer außerordentlichen Eigenschaften in einer Vielzahl wissenschaftlicher Gebiete von bedeutendem Interesse [94, 95]. Die Anwendung z. B. von Nanofasern und Nanoröhrchen in der Biologie und Medizin zum Transport und der gezielten Freisetzung von Medikamenten, der Wundheilung und der Knochenzüchtung ist derzeit genauso Gegenstand der Forschung wie der Einsatz in der Mikroelektronik (Nanoschaltkreise, Nanokabel, Nanokondensatoren) und der Sensorik [96, 97]. Der große Erfolg bei dem Einsatz von Nanoröhrchen und Nanofasern in so unterschiedlichen Gebieten beruht unter anderem auf dem sehr stark vergrößerten Oberfläche zu Masse bzw. Volumen Verhältnis. Der Übergang von makroskopischen Objekten zu Materialien auf der Nanometerskala führt zu einer Steigerung dieses Verhältnisses um bis zu drei Größenordnungen, so dass Nanofasern und Nanoröhrchen Oberflächen von bis zu mehreren $100 \text{ m}^2/\text{g}$ ausbilden können [12, 96]. Einen einfachen Zugang zu sowohl massiven Nanofasern als auch Nanoröhrchen stellt die Methode des Elektrosponnens dar [98]. Neben der außergewöhnlichen Länge (einige Kilometer) und der engen Verteilung der Faserdurchmesser [99] verschafft das Einschleusen

von so unterschiedlichen Stoffen wie z.B. sehr kleinen Polymeren, Metallsalzen, keramischen und biologischen Materialien dem Elektrospinnen einen exponierten Stand in der Vielzahl von Nanostrukturierungsmethoden [12, 100, 101]. Der Zugang zu oberflächenstrukturierten Polymernanofasern ist somit genauso möglich wie der zu Nanoröhrchen aus Metallen [98].

Alle diese Arbeiten beruhen auf einer Technik, die vor mehr als 70 Jahren entwickelt wurde. 1934 meldete Formhals et al. eine Apparatur zum Patent an, mit der die Darstellung von Polymerfasern erfolgte, indem repulsive elektrostatische Kräfte zwischen Oberflächenladungen ausgenutzt wurden [102]. Dies brachte der Technik den Namen *Elektrostatisches Spinnen* ein. Einige wenige Publikationen und nachfolgende Patente [103-106] konnten nicht verhindern, dass diese neuartige Technologie für viele Jahrzehnte in Vergessenheit geriet. Die Einfachheit, die Vielseitigkeit und das daraus resultierende enorme Potential dieses Verfahrens sorgten Anfang der früher 1990iger zu einer neuen Beachtung dieser Technik. Seit diesem Zeitpunkt ist ein enormer Anstieg an experimentellen und theoretischen Untersuchungen bezüglich dieses Verfahrens festzustellen, was sich an der exponentiellen Steigerung der Publikationen widerspiegelt. Im Rahmen dieser Renaissance wurde ein neuer Begriff geprägt, welcher sich in der Literatur durchsetzte, der Begriff des Elektrospinnens [12, 100, 101, 107]. Abbildung 3-8 basiert auf einer Literaturrecherche mittels der wissenschaftlichen Suchmaschine <http://scholar.google.com> unter Verwendung des Suchbegriffes *Electrospinning*. Zusätzlich zu den Veröffentlichungen in Zeitschriften und Tagungsbeiträgen enthält das Ergebnis dieser online Suche Dissertationen und Publikationen auf wissenschaftlichen Internetseiten, die sich mit dieser Thematik auseinandersetzen.

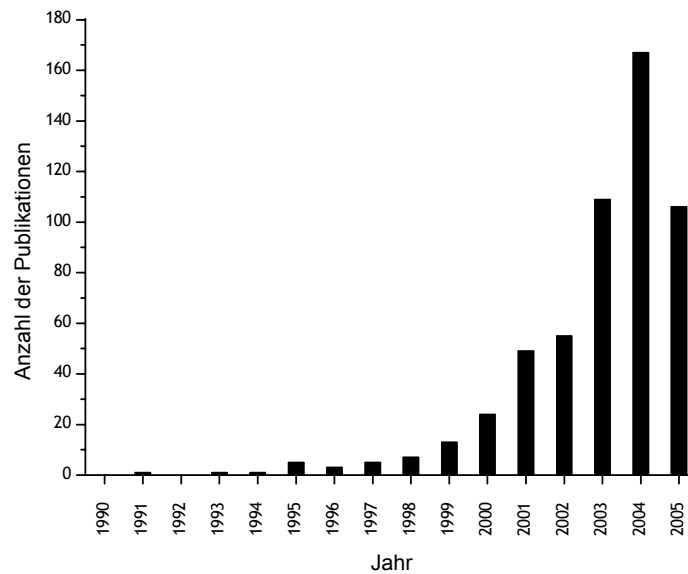


Abbildung 3-8: Anzahl der jährlich erschienen Publikationen zum Thema *Electrospinning*. Die Literaturrecherche wurde mittels der wissenschaftlichen Suchmaschine <http://scholar.google.com/> durchgeführt. Für das Jahr 2005 sind die Publikationen bis zum 20. September aufgeführt.

Apparativer Aufbau und Theorie des Elektrospinnens

Abbildung 3-9 stellt den apparativen Grundaufbau des Elektrospinnens dar. Die drei Hauptbestandteile dieser Technik haben sich seit der erstmaligen Verwirklichung durch Formhals im Jahre 1934 nicht verändert. Es handelt sich dabei um eine Hochspannungsquelle, eine Metallkanüle und eine Gegenelektrode. Die Hochspannungsquelle wird für gewöhnlich im Gleichstrom Modus betrieben, die Verwendung von Wechselspannung ist jedoch grundsätzlich auch möglich [100, 101, 108]. Die Metallkanüle ist mit einer Spritze verbunden, in der die Polymerlösung oder Polymerschmelze vorgelegt wird. Eine mechanische Vorrichtung, wie z.B. eine Pumpe oder elektrischer Motor, ermöglicht es die Lösung kontrolliert mit einer konstanten Geschwindigkeit durch die Kanüle zu drücken. Durch das Anlegen einer Hochspannung an die Kanüle (normalerweise im Bereich von 1-30 kV bei einem Elektrodenabstand von einigen Zentimeter bis Dezimeter) wird der aus der Kanüle austretende Tropfen elektrisch aufgeladen. Die induzierten Ladungen verteilen sich auf der Tropfenoberfläche, so dass der Tropfen durch zwei unterschiedliche elektrostatische Felder beeinflusst wird. Den abstoßenden Kräften zwischen den

Oberflächenladungen auf dem Tropfen stehen Coulomb Wechselwirkungen, welche durch das externe Hochspannungsfeld zwischen Kanüle und Gegenelektrode hervorgerufen werden, gegenüber. Diese unterschiedlichen elektrostatischen Felder bewirken eine Verformung der Polymerlösung von einer Tropfenform zu einer Kegelform. Bezug nehmend auf die Arbeiten von Taylor zu diesem Phänomen ist dieser Kegel unter dem Begriff *Taylor Kegel* in die Literatur eingegangen [12, 100, 101, 109, 110]. Dieser Verformung wirkt die Oberflächenspannung der Polymerlösung entgegen, so dass die Bildung des Taylor Kegels erst eintritt, wenn die elektrostatischen Wechselwirkungen größer sind als die Kräfte der Oberflächenspannung. Dies wird durch eine entsprechende Steigerung des externen Feldes erreicht [99]. Die Polymerlösung wird zur Gegenelektrode beschleunigt und dabei weiteren Verformungen unterworfen, die zur Bildung der langen und extrem dünnen Polymerfaser führen. Dieser uniaxiale Streckvorgang stellt einen sehr komplexen Vorgang dar. Eine ungefähre Beschreibung dieses Prozesses kann durch einen Vergleich mit einem Peitschenschlag erfolgen. Es treten Streck- und Biegeschwingungen auf, die von dem Verdampfen des Lösungsmittels bzw. dem Abkühlen der Polymerschmelze begleitet werden und somit zum Erstarren des Polymers in Form von Nanofasern führen [99]. Die geladenen Fasern werden auf einem Substrat (z.B. Glasplatte oder Aluminiumfolie), das sich über der Gegenelektrode befindet, als ungeordnete Fasermatte abgeschieden. Mit dieser einfachen und relativ kostengünstigen Methode wurden bisher mehr als 50 verschiedene Polymere zu Fasern, mit Durchmessern von einigen Nanometern bis hin zu einigen Mikrometern, verarbeitet [12, 100, 101].

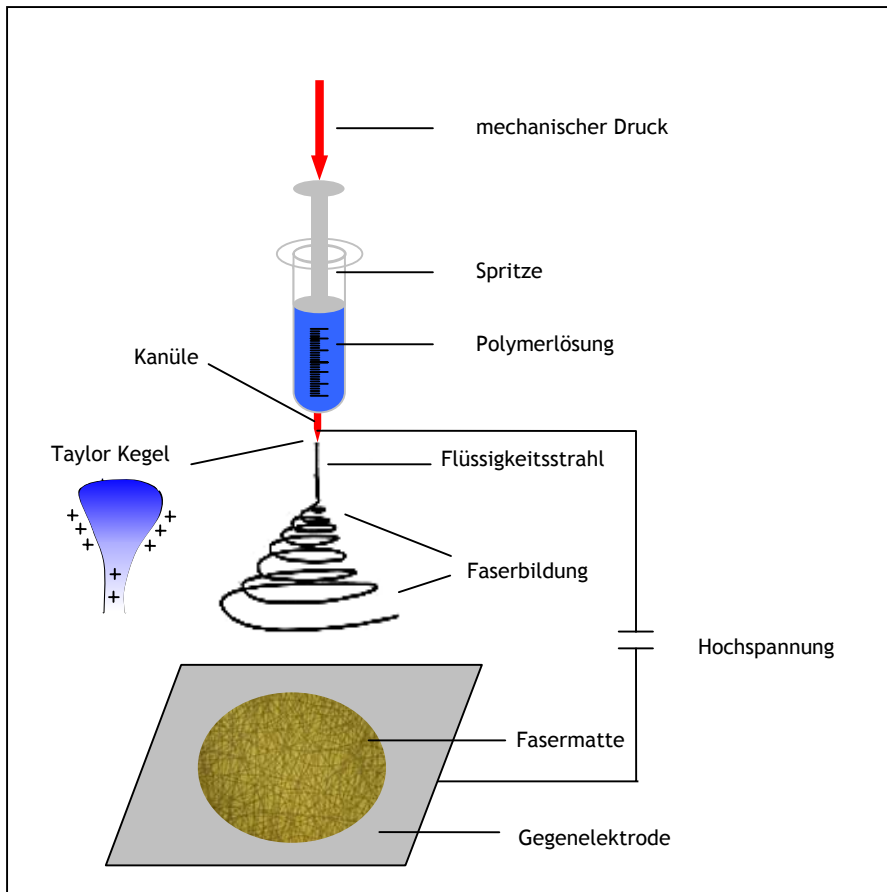


Abbildung 3-9: Schematische Darstellung des apparativen Aufbaus des Elektrosplinnens und des Taylor Kegels. Das Bild der Fasermatte zeigt eine mikroskopische Aufnahme von Poly(ethylenoxid) Nanofasern.



Abbildung 3-10: Foto der verwendeten Elektrosplinnapparatur.

Komplexere Nanofasersysteme

Für die Darstellung komplexerer Systeme, wie z.B. Kern-Mantel Fasern oder Metallhohlfasern sind Veränderungen an dem Elektrosponnaufbau bzw. eine Nachbehandlung der Fasern notwendig.

Co-Elektrosponnen

Einen direkten Zugang zu Kern-Mantel Fasern ermöglicht das Co-Elektrosponnen. Die Veränderung gegenüber dem oben beschriebenen Verfahren besteht in der Verwendung von zwei konzentrisch zueinander angeordneten Kanülen. Zwei verschiedene Polymerlösungen werden unabhängig voneinander durch Kapillaren gepumpt und kommen erstmalig an der Spitze der beiden ineinander gesteckten Kanülen in Kontakt und werden so dem Elektrosponnprozeß gleichzeitig unterworfen (Abbildung 3-11 a). Der Prozeß des Elektrosponnens läuft innerhalb von Millisekunden ab [111]. Dieser extrem kurze Zeitraum verhindert eine Durchmischung der beiden Polymerlösungen [99], was zur Ausbildung von zwei getrennten Bereichen, dem Mantel und dem Kern, führt (Abbildung 3-11 b).

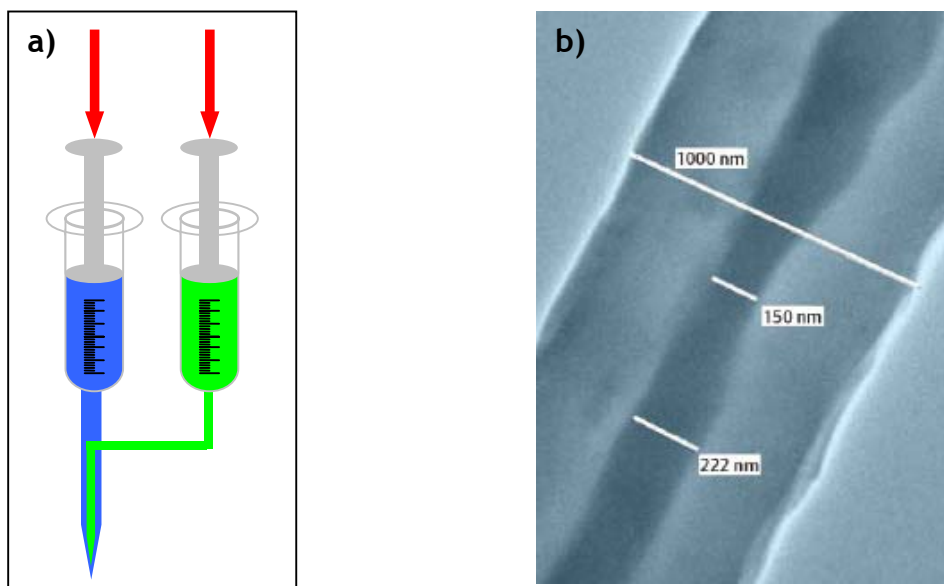


Abbildung 3-11: a) Schematische Darstellung der Kanülenanordnung für das Co-Elektrosponnen. b) Kern-Mantel Fasern hergestellt durch Co-Elektrosponnen (Kern: Polydodecylthiophen, Mantel: Poly(ethylenoxid)) [96].

TUFT (Tubes by Fiber Templates)

Die Darstellung von Polymer, Metall und Hybrid Nanoröhrchen wird durch eine geschickte Nachbehandlung von abbaubaren oder selektiv löslichen Polymernanofasern ermöglicht. Dafür werden in einem ersten Schritt Polymernanofasern über Elektrospinnen hergestellt, die als Templat der Röhrchen dienen und so die Form, den Durchmesser und die Oberflächenstruktur der späteren Röhrcheninnenseite vorgeben. Ein zweiter Schritt sieht die Beschichtung der Fasern mit einem Mantelmaterial vor. Abhängig von dem eingesetzten Werkstoff bieten sich verschiedene Techniken an, das Mantelmaterial auf den Fasern aufzubringen. Tauch-, Aufschleuder- und Sprühmethoden stellen Möglichkeiten dar. Vorteilhafter sind zumeist jedoch Abscheidungen aus der Gasphase, da sie zu einer sehr engen Filmdickenverteilung führen, die Oberflächentopologie der Templatfasern sehr genau reproduzieren, und Verunreinigungen wie z.B. Lösungsmittel vermieden werden. Die Abscheidung des Polymers Poly(p-xylylen) mittels CVD (chemical vapor deposition) stellt einen sehr guten Zugang zu Polymernanoröhrchen dar. Der Pyrolyse von [2,2]-Paracyclophan schließt sich der Transport des gebildeten flüchtigen Monomeren über die Gasphase und dessen Abscheidung auf den Templatfasern bei Raumtemperatur an. Die spontane Polymerisation des Monomeren zu PPX stellt den abschließenden Schritt dar, der zu einer Kern-Mantel Konfiguration führt (Abbildung 3-12). Eine ausführlichere Beschreibung der Beschichtung mit PPX ist in Kapitel C.I zu finden.

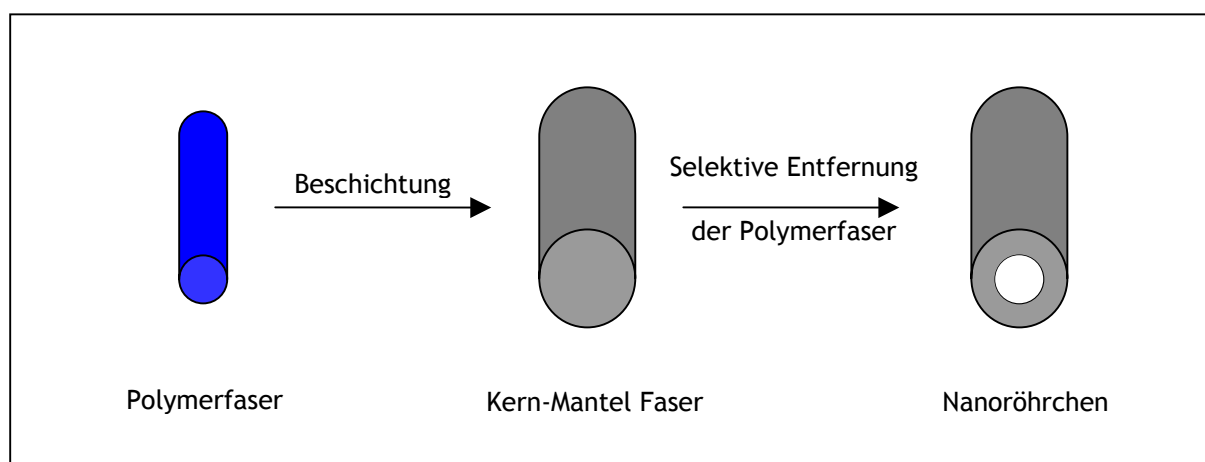


Abbildung 3-12: Schematische Darstellung des Templatverfahrens zur Herstellung von Nanoröhrchen (TUFT, Tubes by Fiber Templates).

Die Verwendung von z.B. Polylaktidfasern ermöglicht den selektiven Abbau des Kerns durch Tempern des Systems bei 250 °C, was zu einer Zersetzung der Faser zu leicht flüchtigen Produkten führt und in PPX-Nanoröhrchen resultiert [96] (Abbildung 3-13 a).

Das TUFT Verfahren lässt viele Veränderungen zu, sowohl in der Wahl des Templats als auch des Mantelmaterials. Bietet sich kein thermischer Abbau der Faser an, so kann auch eine Extraktion durch ein Lösungsmittel oder ein biologischer Abbau des Kerns angestrebt werden [96]. Die Bandbreite des Röhrchenmaterials lässt sich stark erweitern, so konnten z.B. bereits Röhrchen aus Aluminium, Palladium, Platin, Titandioxid, Chrom, Gold und sogar Glas hergestellt werden [96, 98]. Abbildung 3-13 b) zeigt eine SEM-Aufnahme von Aluminiumnanoröhrchen, die über eine Gasphasenabscheidung des Metalls auf Polylaktid Fasern realisiert wurden [98]. Die sukzessive Beschichtung mit verschiedenen Wandmaterialien erweitert das Spektrum auf Multischichtnanoröhrchen und somit eine Ausdehnung der erreichbaren Funktionalitäten, auf z.B. innen und außen isolierte Metallnanoröhrchen über eine Beschichtungssequenz Polymer-Metall-Polymer.

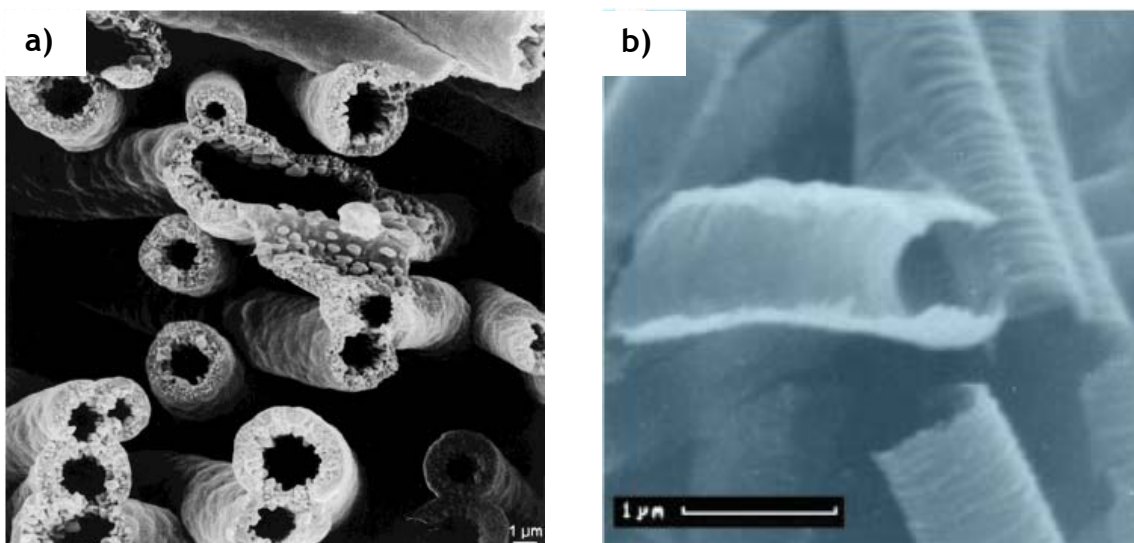


Abbildung 3-13: Nanoröhrchen hergestellt nach dem TUFT Verfahren: a) PPX-Nanoröhrchen [98] und b) Chrom Nanoröhrchen [96].

Orientierung

Für viele Anwendungen ist die makroskopische Orientierung der Nanofasern von essentieller Bedeutung. Die Produktion von Bauelementen in der Elektronik und der Halbleitertechnik so wie der Einsatz als mechanische Verstärkung von Werkstoffen kann nur erfolgreich sein, wenn die Nanofasern hoch geordnet bezüglich einer Achse im Raum sind [99, 112-116]. Unterschiedlichste Anstrengungen wurden unternommen diesen Anforderungen gerecht zu werden. Alle Entwicklungen zielen dabei auf eine Veränderung des elektrischen Feldes durch eine Umgestaltung der Gegenelektrode, wodurch eine Beeinflussung der Faserbewegung erzielt wird, was zu einer kontrollierten Orientierung der Fasern führt. Die Umsetzungen sind vielfältig. Die Veränderung der Elektrodengeometrie [117] oder eine Erhöhung der Elektrodenanzahl [99, 118] stellen Möglichkeiten dar. Orientierungen konnten herbeigeführt werden durch Gegenelektroden in Form von Dreiecken, abgerundeten Vierecken, zwei parallel angeordnete Rechtecken mit einer dazwischen liegenden Lücke, so wie unterschiedlichste Anordnungen von vier bzw. sechs rechteckigen Streifen (Abbildung 3-14).

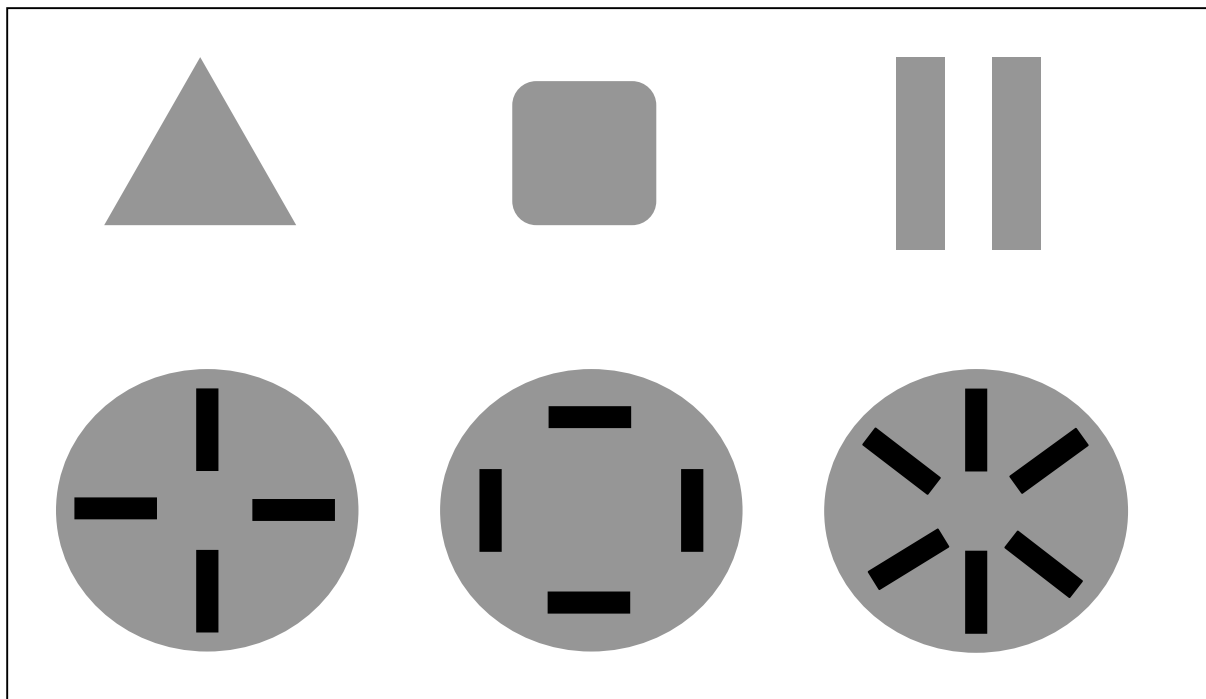


Abbildung 3-14: Unterschiedliche Geometrien und Anordnungen von Gegenelektroden zur Faserorientierung.

Neben einer Variation der Elektrodengeometrie ist auch das Spektrum der erfolgreich verwendeten Elektrodenmaterialien vielfältig. Gegenelektroden aus Stahl, Gold, Quarz sowie Holz wurden realisiert [12, 99]. Die bisher beschriebenen Abwandlungen der Elektroden erfolgten innerhalb einer Dimension. Darüber hinaus ist der Literatur zu entnehmen, dass der Einsatz von Metall- [119] und Holzrahmen [12] als Gegenelektrode erfolgreich durchgeführt wurde, wie es Abbildung 3-15 für einen Aluminiumrahmen zu entnehmen ist.

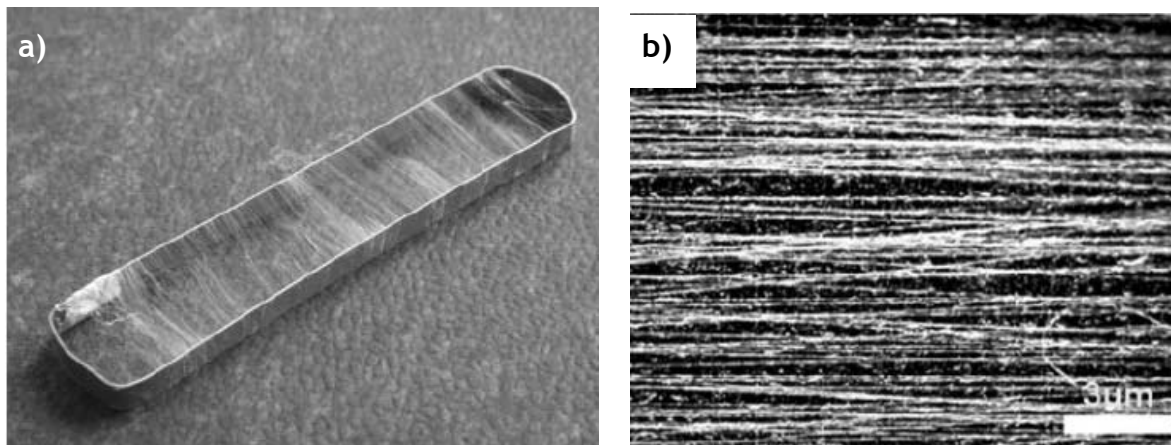


Abbildung 3-15: a) Metallrahmen als Gegenelektrode zur Darstellung von b) hochorientierten Fasern [119].

Neben verschiedensten Rahmen und Gitteranordnungen [12] stellt die Verwendung einer rotierenden Trommel eine Erweiterung der möglichen Konzepte zur Orientierung von Fasern dar. Die zylinderförmige Metallelektrode rotiert dabei mit bis zu mehreren 1000 Umdrehungen pro Minute und wickelt dabei die entstehenden Fasern hochorientiert auf der Rolle auf [12]. Abbildung 3-16 stellt schematisch die Versuchsanordnung dar.

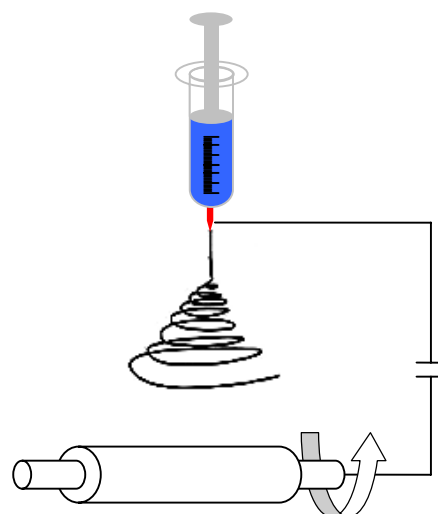


Abbildung 3-16: Schematischer Versuchsaufbau mit rotierender Trommel als Gegenelektrode zur Darstellung hochorientierter Fasern.

Parameter

Die Morphologie von Polymernanofasern ist sehr vielfältig. Glatte sowie oberflächenstrukturierte Fasern werden genau so gebildet wie Fasern, denen kleine Kügelchen (engl.: beads) anhaften (Abbildung 3-17).

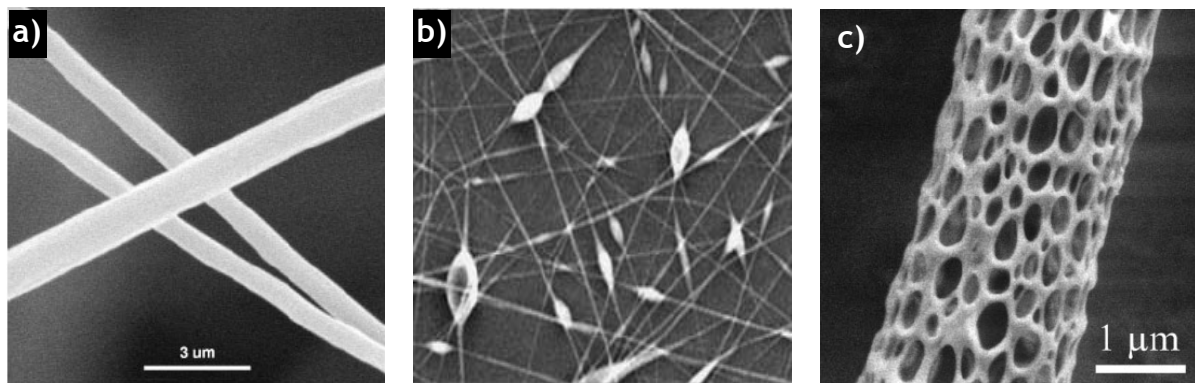


Abbildung 3-17: Typische Nanofasermorphologien. a) glatte Fasern [120], b) Fasern mit beads [99] und c) poröse Fasern [120].

Die Gestalt und der Durchmesser der gebildeten Fasern hängen von unterschiedlichsten Parametern ab, dabei kann eine grobe Unterteilung in intrinsische Eigenschaften und externe Bedingungen erfolgen. Tabelle 3-4 gibt eine Zusammenstellung der verschiedenen Einflussgrößen wider [107, 99].

intrinsische Eigenschaften	externe Parameter
verwendetes Polymer	angelegte Spannung
Polymerkettenkonformation	Elektrodenabstand
Viskosität der Lösung	Lösungsdurchsatz
Elastizität der Lösung	Temperatur
Oberflächenladung	Temperatur der Lösung
Polarität des Solvens	Luftfeuchtigkeit
Oberflächenspannung des Solvens	Luftbewegung in der Elektrospinnkammer

Tabelle 3-4: Intrinsische Eigenschaften und externe Parameter die Einfluss auf die Fasermorphologie ausüben [107, 99].

Der stärkste Einfluss auf die Faser ist dem verwendeten Polymer zuzuschreiben. Die Vielzahl der weiteren Einflussgrößen auf den Elektrospinprozess lässt es nicht zu, die genaue Morphologie und den Durchmesser einer Faser im Vorhinein zu planen. Jedes System muß einzeln untersucht werden. Für eine Reihe der in Tabelle 3-4 aufgeführten Parameter können jedoch empirisch gefundene Trends aufgeführt werden. Diese stellen aber allenfalls eine grobe Orientierung dar!

Die folgenden Ausführungen zeigen auf, dass sich Schlussfolgerungen nicht „um mehrere Ecken“ ziehen lassen. So wird z.B. in der Literatur berichtet, dass die Anzahl der beads durch eine Viskositätszunahme erniedrigt werden kann und einer anderen Publikation ist zu entnehmen, dass eine Viskositätszunahme zu einer Erhöhung des Faserdurchmessers führt. In diesem Fall sind die dicken Fasern frei von beads. Untersuchungen bezüglich der Spannung zeigten die Abnahme des Durchmessers bei sinkender Spannung auf. Eine andere Veröffentlichung berichtet von der Abnahme der beads bei sinkender Spannung. In diesem Fall sind die dünnen Fasern frei von beads. Teilweise wird sogar für die Veränderung nur eines Parameters ein gegenläufiger Trend aufgezeigt. Sowohl eine Ab- als auch eine Zunahme des Faserdurchmessers für eine steigende Spannung konnte nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen sind jedoch bei völlig anderen Systemen (Polymer und Lösungsmittel) und externen Parametern (Spannung, Elektrodenabstand, etc.) durchgeführt worden.

➤ Viskosität

- Eine zu hohe Viskosität verhindert den Elektrospinprozess vollständig [121]. Die Lösung lässt sich nicht durch die Kanüle drücken bzw. die Festigkeit der Lösung hemmt die Ausbildung des Materiestroms zur Gegenelektrode. Ein mittlerer Viskositätsbereich ermöglicht die Faserproduktion. Innerhalb dieses Gebiets führt eine Absenkung der Viskosität zu einer Verringerung des Faserdurchmessers [122]. Dabei ist der Faserdurchmesser ungefähr proportional zu dem Quadrat der Polymerkonzentration [123]. Wird der Polymergehalt zu stark erniedrigt, ist ein Heraustropfen der Lösung ohne jegliche Faserbildung die Folge [121].

- Die Anzahl der beads kann durch eine Viskositätszunahme erniedrigt werden [124].

- Spannung
 - Eine höhere Spannung vergrößert die Lösungsmenge die aus der Kanüle beschleunigt wird [123, 121].
 - Für die Entwicklung des Faserdurchmessers bei ansteigender Spannung sind die Ergebnisse der Untersuchungen genau gegensätzlich. Es wird sowohl von einer Abnahme [28, 122] als auch einer Zunahme [123] des Faserdurchmessers berichtet.
 - Die Anzahl der beads nimmt mit sinkender Spannung ab [125].

- Temperatur der Lösung
 - In den meisten Fällen ist es nicht möglich Fasern mit identischen Durchmessern zu produzieren. Es konnte festgestellt werden, dass eine Temperaturerhöhung eine deutlich engere Durchmesser-Verteilung zur Folge hat [123].
 - Eine Temperaturerhöhung bedingt eine sehr starke Abnahme der Viskosität, wodurch deutlich höher konzentrierte Lösungen versponnen werden können [123].

- Oberflächenladung
 - Durch Zugabe von Salz zu der Polymerlösung wird die Oberflächenladung erhöht, wodurch stärkere Wechselwirkungen mit dem externen Feld auftreten. Eine größere Beschleunigungskraft auf den Materiestrom ist die Folge. Die Darstellung von dünneren und beadfreien Fasern wird ermöglicht [126].

➤ Elektrodenabstand

Es besteht eine direkte Korrelation zwischen dem Elektrodenabstand und der Abscheidungszeit, Verdampfungsrate und den Streck- und Biegeschwingungen. Entscheidende Veränderungen der Faserausmaße und Fasermorphologien sind die Folge bei Variation des Elektrodenabstands.

- Untersuchungen zeigten auf, dass eine Verkleinerung des Elektrodenabstands Veränderungen der Faserform von einer runden zu einer flachen Struktur bedingen. Des Weiteren wird von einer Zunahme an beads berichtet [28, 122].
- Eine Abstandsverringerung verkürzt die zur Verfügung stehende Zeit für die Verdampfung des Lösungsmittels. Die gebildeten Fasern enthalten daraufhin einen höheren Lösungsmittelanteil. Ein Wechsel von einem leicht flüchtigen organischen Lösungsmittel zu Wasser vergrößert diesen Anteil entsprechend [28].

Anwendung

Die bisherigen Anwendungen zeigen auf, welch enormes Potential für Nanofasern besteht, in unterschiedlichste Forschungsgebiete und industrielle Anwendungen vorzustoßen. Abbildung 3-18 gibt eine Übersicht über die US Patente, die elektrogesponnene Nanofasern beinhalten. Der weitaus größte Teil wird von medizinischen Anwendungen eingenommen, wobei die Forschung auf dem Gebiet der Gewebezüchtung einen besonders exponierten Platz einnimmt [12].

Die vorausgesagte Umsatzentwicklung für Filtertechnik auf bis zu 700 Milliarden US \$ im Jahr 2020 [127] erklärt die gewaltigen Anstrengungen auf diesem Forschungsgebiet. Die herausragenden Eigenschaften von Nanofasern sind für den seit über zwanzig Jahren dauernden Einsatz in der Filtration verantwortlich, womit sich diese Industriesparte zu einen der ersten Anwender von elektrogesponnenen Nanofasern zählen kann [128, 129].

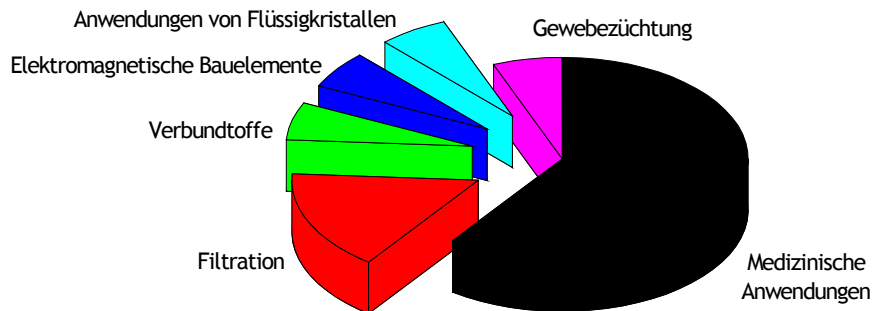


Abbildung 3-18: US Patente mit elektrogesponnenen Nanofasern, aufgeschlüsselt nach Anwendungsgebieten [12].

Eine Ausdehnung innerhalb bestehender Gebiete und die Erschließung völlig neuer Industriesparten werden derzeit in Forschergruppen rund um die Welt intensiv vorangetrieben. Die Kombination einer sehr einfachen Zugänglichkeit, ein extrem breites Spektrum an verarbeitbaren Materialien und herausragende Eigenschaften der resultierenden nanostrukturierten Fasern erklärt die Vielfalt der möglichen Anwendungsgebiete (Abbildung 3-19). In vielen der aufgeführten potentiellen Anwendungen ist die Entwicklung bisher jedoch noch nicht über den Labormaßstab herausgekommen. Die Übertragung der unterschiedlichsten Konzepte auf industrielle Verfahren wird in den nächsten Jahren eine der wichtigsten Aufgaben darstellen. Um dieser Herausforderung gerecht zu werden, müssen unterschiedlichste Probleme überwunden werden.

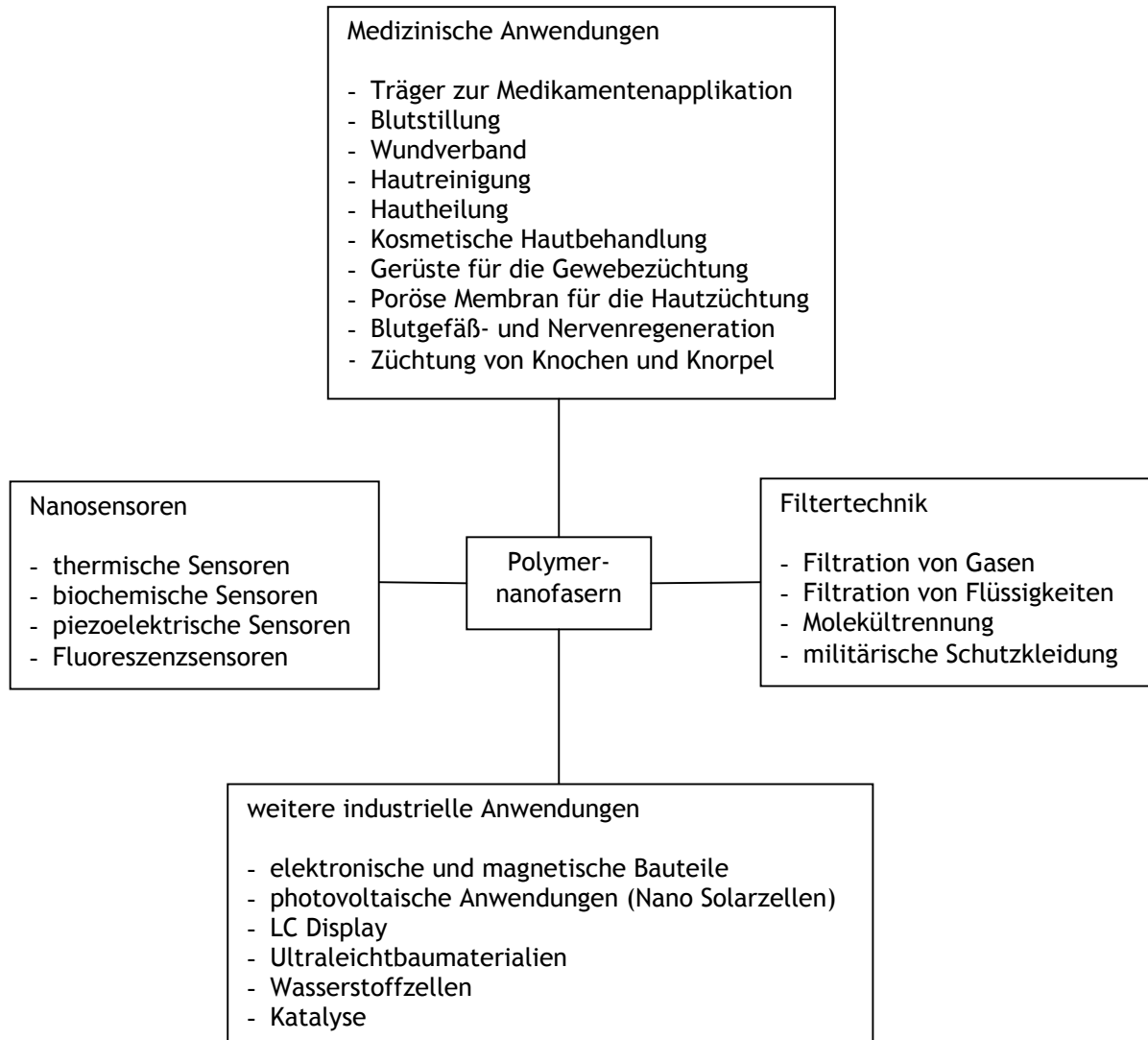


Abbildung 3-19: Potentielle Anwendungen von elektrogenannten polymeren Nanofasern [12, 99, 121].

Herausforderungen

Die wichtigsten Herausforderungen in der Forschung und industriellen Anwendung von Nanofasern sind prinzipieller Natur und somit unabhängig vom verwendeten System [12, 99, 121].

- Höherer Durchsatz der Polymerlösung pro Stunde.
- Kontrollierte Einstellung der Fasermorphologie und des Faserdurchmessers.
- Einheitliche Fasermorphologie und enge Verteilung im Faserdurchmesser für ein bestimmtes System.
- Weiterverarbeitung der Fasern, z.B. Schneiden der Fasern auf eine einheitliche Länge im Mikrometer Maßstab oder Isolierung einzelner Fasern.

3.2.1.2. Darstellung von Nanofasern aus einem PEO-Blend

Die Anforderungen an das polymere Trägermaterial sind durch das Konzept aus Kapitel 3.1 vorgegeben. Das differenzierte Permeationsverhalten von PEO durch eine Membran in Abhängigkeit des Molekulargewichts konnte in Kapitel 3.2.1.1 nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist die Verspinnbarkeit eines PEO-Blends, bestehend aus einer hoch- und einer niedermolekularen Komponente eine weitere Voraussetzung für die Anwendung des Konzeptes. Erste Untersuchungen umfassten zwei Blends aus 900.000 und 2.000 bzw. 900.000 und 4.000 PEO unterschiedlicher prozentualer Zusammensetzung. In Tabelle 3-5 sind die PEO-Blends aufgeführt, die mit einer Spannung von 15 kV und einem Elektrodenabstand von 20 cm versponnen wurden. Die Gesamtkonzentration an Polymer betrug in der wässrigen Lösung 6 wt%.

PEO / g mol ⁻¹	Zusammensetzung / %		
	900.000	90	80
2.000	10	20	30
900.000	90	80	70
4.000	10	20	30

Tabelle 3-5: Verwendete PEO-Blends zur Darstellung elektrogessponnener Fasern.

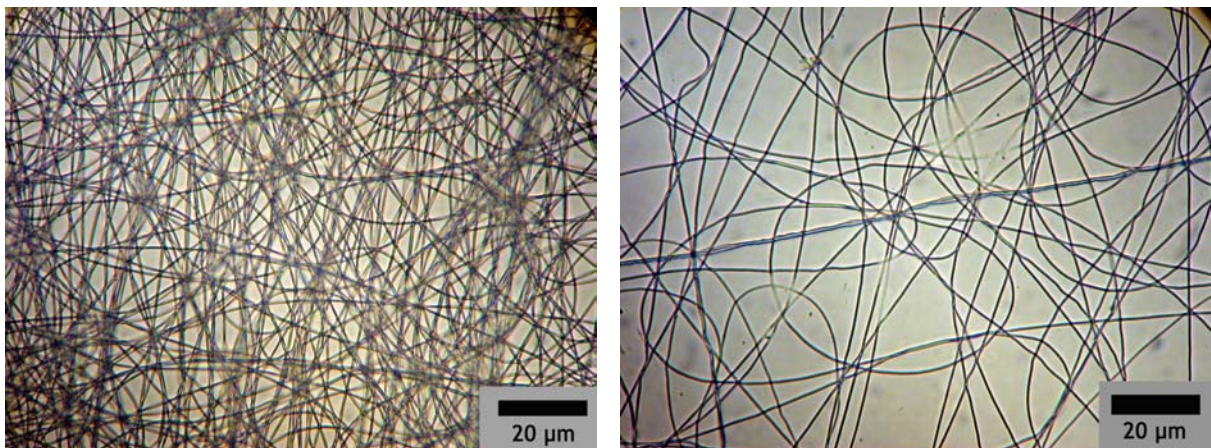


Abbildung 3-20: Elektrogessponnene Fasern aus PEO 900.000 und 2.000 im Verhältnis 70:30 bei 1000facher Vergrößerung.

Die Blends waren unter diesen Bedingungen problemlos zu verspinnen und die Fasern zeigten unabhängig von der Zusammensetzung alle die gleiche Morphologie: glatte Oberfläche und frei von beads (Abbildung 3-20). Der Faserdurchmesser lag im Durchschnitt knapp unter 1 µm.

3.2.2 Membran

Die Auswahl des Membranmaterials orientiert sich an der Anforderung an das Bioimmobilisierungskonzept in einem möglichst breiten Anwendungsspektrum einsetzbar zu sein. Wasserunlöslichkeit, Biokompatibilität, Semipermeabilität gegenüber unterschiedlichste Verbindungen und eine hohe Transparenz und Stabilität gegenüber Strahlung im UV/Vis-Bereich sind die wichtigsten Eigenschaften die das Membranmaterial zu erfüllen hat. Die einzigartigen Eigenschaften von Poly(p-xylylen) PPX und die positiven Erfahrungen bei dessen Einsatz in unterschiedlichsten Forschungs- und Industriebereichen war Anlass dazu, PPX bezüglich des vorhandenen Anforderungsprofils zu untersuchen. Eine Einführung in den theoretischen Hintergrund wird dem Bericht zu den Untersuchungen vorangestellt.

C.I Synthese, präparative Darstellung und Eigenschaften von PPX

Synthese

Die Synthese von PPX gelang erstmals im Jahr 1947 durch Arbeiten von Szwarc. Er konnte PPX als eines der Produkte nachweisen, welches bei der thermischen Zersetzung im Vakuum (Pyrolyse) von p-Xylol entsteht. Szwarc postulierte eine Dehydrierung des Xylols zu p-Chinodimethan, welches im Gleichgewicht mit einem Xylylenderadikal liegt (Abbildung 3-21) [130-133]. Das Gleichgewicht bei diesen intermediären Verbindungen liegt deutlich auf Seiten des p-Chinodimethans, so dass im Folgenden auf die diradikalische Form des Gleichgewichtes verzichtet wird.

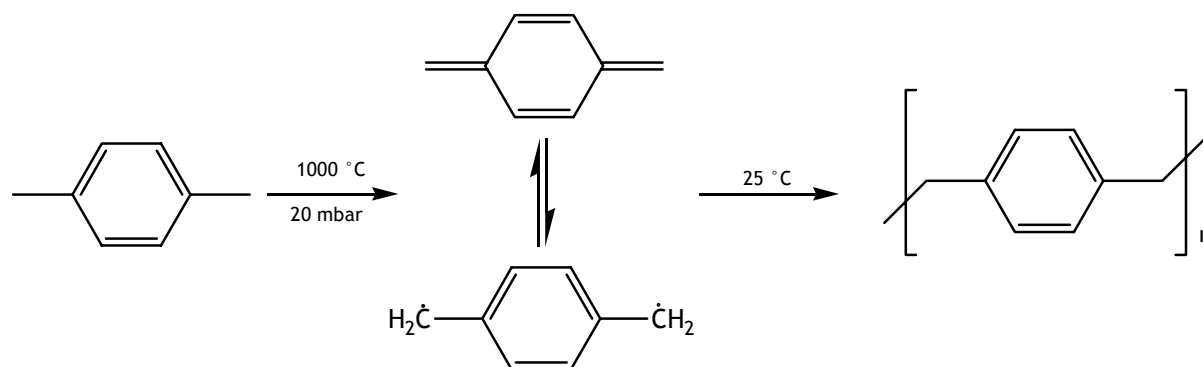


Abbildung 3-21: Darstellung von Poly(p-xylylen) nach Szwarc.

Den Nachweis für diese Behauptung erbrachte er durch eine Vermischung der reaktiven Gasphase mit Ioddampf. Als Reaktionsprodukt konnte ausschließlich para-Xylylen Diiodid nachgewiesen werden (Abbildung 3-22) [131, 133].

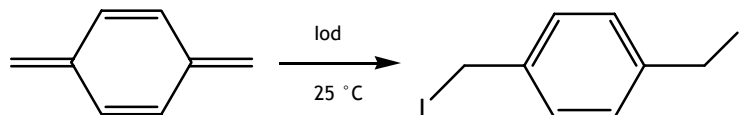


Abbildung 3-22: Nachweis von p-Chinodimethans durch Iod Zugabe.

Abgeschlossen wird die PPX-Synthese durch die Adsorption der gasförmigen Verbindungen auf beliebigen Oberflächen, hervorgerufen durch eine deutliche Absenkung der Temperatur, gefolgt von einer radikalischen Polymerisation der kondensierten Monomere (Abbildung 3-23) [130-133].

Die herausragenden Eigenschaften von PPX sind eng mit dem Syntheseweg verbunden. Filme die gemäß der Syntheseroute nach Szwarc dargestellt werden, sind lösungsmittel- und katalysatorfrei, aber stark verunreinigt. Diese Verunreinigungen sind auf die hohen Temperaturen zurückzuführen, die viele Nebenreaktionen ermöglichen. In den nachfolgenden Jahrzehnten wurden Veränderungen an der Syntheseroute vorgenommen, die die positiven Aspekte der Gasphasenreaktion erhielten und gleichzeitig die unerwünschten Nebenreaktionen verminderten.

Ein erster Ansatz zur Verminderung der Nebenprodukte bestand in der Senkung der Pyrolysetemperatur durch den Einsatz von Xylol Derivaten. Mono- oder dihalogenierte Xylole reagieren unter Halogenwasserstoffabspaltung schon bei niedrigeren Temperaturen zu p-Chinodimethan (Abbildung 3-23) [134]. Die Halogenwasserstoffe (X= Cl, Br, I) werden jedoch teilweise in das Polymer eingeschlossen und führen so zu farbigen Verunreinigungen. Diese Art der Aktivierung des Monomeren führt somit zu keiner Verbesserung der PPX-Eigenschaften.

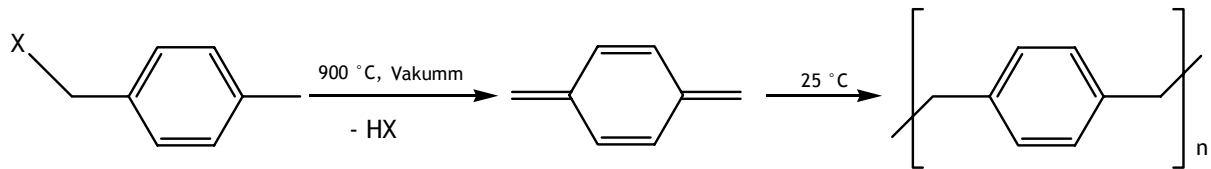


Abbildung 3-23: Darstellung von Poly(p-xylylen) durch Pyrolyse von aktivierten Xylol Derivaten.

Gorham schaffte 1966 eine entscheidende Weiterentwicklung durch die Verwendung von Paracyclophanen. Die hohe Ringspannung dieser Verbindungen ermöglicht die Pyrolyse bei 600-700 °C (Abbildung 3-24), wodurch eine Verminderung der Nebenreaktionen erzielt wird. Darüber hinaus haben Paracyclophane den Vorteil, dass ihre Spaltung ausschließlich zur Bildung von p-Chinodimethan führt und so unerwünschte Abbauprodukte, wie z.B. die Halogenwasserstoffe vermieden werden [135-142].

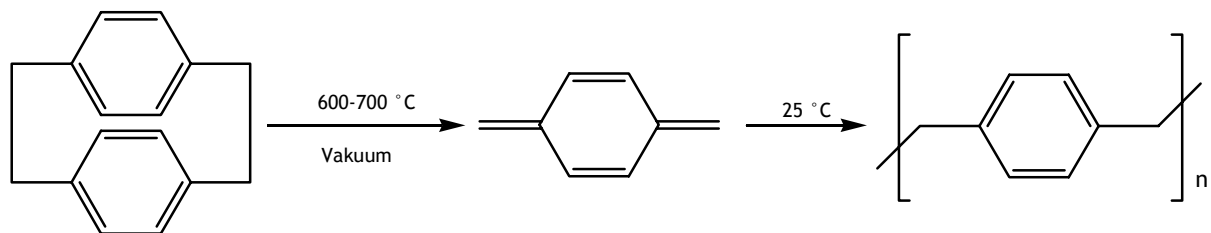


Abbildung 3-24: Darstellung von Poly(p-xylylen) nach Gorham.

Gemäß Abbildung 3-24 erfolgt die Synthese von PPX nach der Gorham Methode unter Spaltung beider Brückenbindungen des Dimeren. Eine unvollständige Spaltung des Paracyclophan, gefolgt von einer Polymerisation des offenkettigen Dimeren würde zu dem identischen Produkt führen. Durch die Pyrolyse unsymmetrisch substituierter Paracyclophane konnte dies jedoch eindeutig ausgeschlossen werden [143-145]. Bei diesem Nachweis macht man sich die unterschiedlichen Kondensationstemperaturen der Pyrolyseprodukte zu Nutze (Abbildung 3-25). Die Spaltung beider Brückenbindungen ist durch die Bildung der unterschiedlichen Homopolymere nachgewiesen.

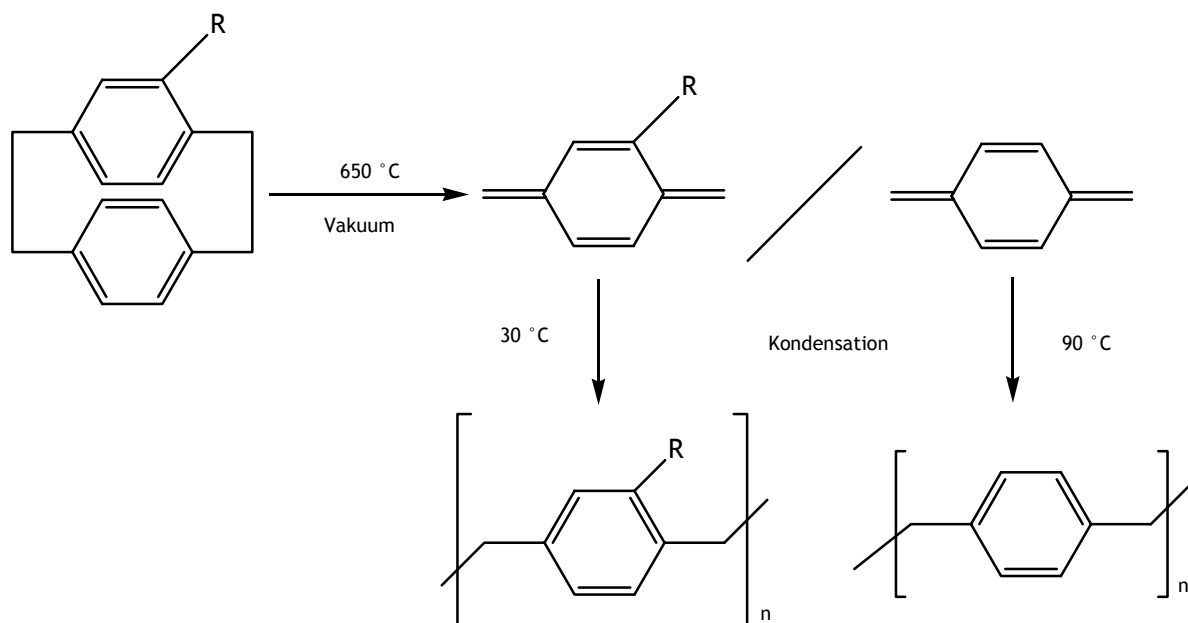


Abbildung 3-25: Pyrolyse unsymmetrisch substituierter Paracyclophane nach Gorham.

Präparative Darstellung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die präparative Darstellung der PPX-Filme in der kommerziellen Beschichtungsanlage Model Labcoter 1, PDS 2010 der Firma SCS. Der zum Einsatz gekommene Syntheseprozess nach Gorham kann in drei Abschnitte unterteilt werden, in die Sublimation, die Pyrolyse und die Abscheidung. Wie der schematischen Darstellung in Abbildung 3-26 zu entnehmen ist, geht das vorgelegte Paracyclophan bei 175 °C in die Gasphase über und wird in der Pyrolysekammer bei 650 °C quantitativ in reaktive Monomere gespalten. In der Beschichtungskammer physisorbieren die reaktiven Monomere bei Raumtemperatur auf jeder vorhandenen Oberfläche, d.h. sowohl auf den Substraten als auch auf dem gesamten Kammermaterial. Eine Polymerisation zu PPX schließt sich der Abscheidung auf den Oberflächen an. Damit die Polymerisation ausschließlich in der Beschichtungskammer erfolgt, wird das gesamte Rohrleitungssystem bei 140 °C getempert und bei einem Druck von 55 mbar gehalten. Zu der Herstellung von freitragenden PPX-Membranen wurden Objektträger als Substrate eingesetzt, die zuvor mit Ethanol und Aceton gereinigt wurden. Von der Objektträgeroberfläche konnten die Filme abgelöst werden, nachdem sie mit einem Skalpell angeritzt

wurden und anschließend für vier Stunden in voll entionisiertes (VE) Wasser gelegt wurden. Von entscheidender Bedeutung bei der Herstellung von Membranen ist Ihre Schichtdicke, welche durch die Einwaage des Edukts eingestellt werden kann.

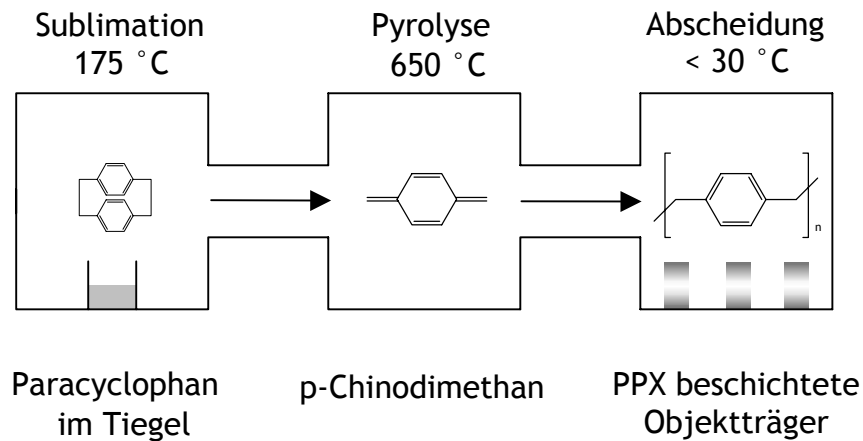


Abbildung 3-26: Schematische Darstellung der PPX-Synthese nach Gorham.

Eigenschaften

PPX-Filme, die nach der Syntheseroute von Gorham präpariert wurden, sind von extrem hoher Reinheit, da Nebenreaktionen, die zu unerwünschten Nebenprodukten führen, durch die relativ niedrige Pyrolysetemperatur verhindert werden. Darüber hinaus gewährleisten die vollständige Umsetzung des Eduktes und die lösungsmittel- und katalysatorenfreie Pyrolyse des Dimeren die hohe Reinheit der Membranen [135-138].

Untersuchungen des Adsorptionsverhaltens der reaktiven Monomere zeigten, dass der Physisorption auf der Substratoberfläche nicht zwangsläufig die Polymerisation der Monomere folgt. Eine Bewegung der Monomere auf der Oberfläche ist genauso möglich wie dessen Desorption [138, 141, 146]. Dieses Adsorption-Desorption-Gleichgewicht und die Bewegung auf der Oberfläche ermöglichen dem PPX in kleinste Hohlräume und Ritzen vorzudringen und so die Topologie des Substrats extrem genau mit einem Film zu beschichten [139-141]. Sehr anschaulich wird dies in Abbildung 3-27 verdeutlicht. Es zeigt die SEM-Aufnahme eines Schmetterlingsflügels vor und nach einer Beschichtung mit PPX. Neben der Strukturtreue bis in den Nanometerbereich hinein zählt die hohe Flexibilität unter

Erhaltung der mechanischen Stabilität des PPX [137] zu einer der herausragenden Eigenschaften dieser Verbindung. Ein geschlossener, also porenfreier Film wird neuesten Untersuchungen zu Folge ab Schichtdicken von 700 nm gebildet [147].

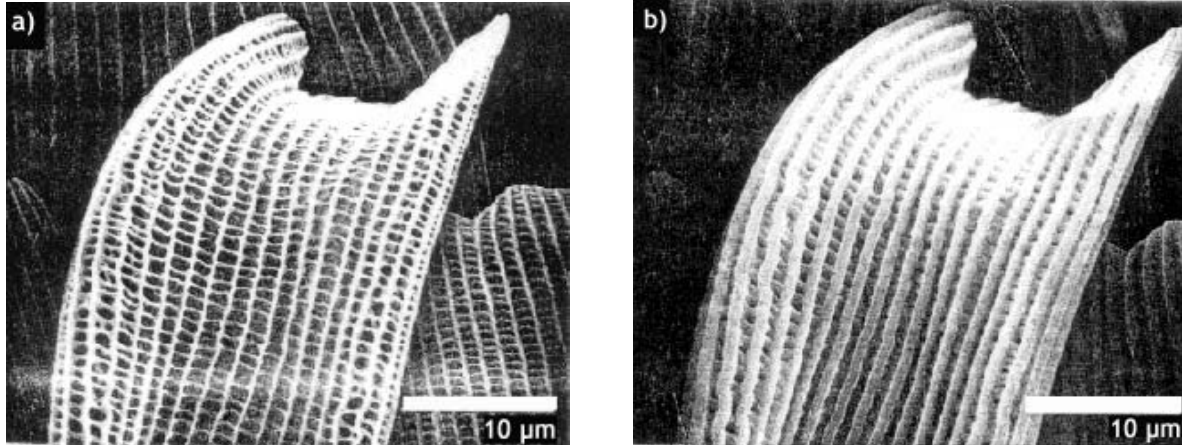


Abbildung 3-27: a) unbeschichteter und b) PPX-beschichteter Schmetterlingsflügel [185].

Das hohe Molekulargewicht von 200.000-400.000 g/mol [138] begründet die Unlöslichkeit des PPX in gängigen organischen und anorganischen Lösungsmitteln [135-138]. Ferner ist die Verbindung biokompatibel [148, 149] und kann nicht von Organismen abgebaut werden.

Die thermische Stabilität von PPX wurde eingehend untersucht [150-158]. In einer Sauerstoff enthaltenden Atmosphäre setzt der Abbau von PPX durch Bindungsbrüche der C-C Bindungen bei Temperaturen von über 125 °C ein. Für das hier untersuchte Konzept der Bioimmobilisierung ist die Photostabilität des PPX von Bedeutung. Arbeiten, die das Verhalten von PPX gegenüber Strahlung beschreiben, sind in der Literatur hingegen nicht in einer solchen Anzahl zu finden. Erste Untersuchungen stammen aus dem Jahr 2000 von Gardette et al. [159]. Die Belichtungsexperimente wurden im UV/Vis-Bereich ab Wellenlängen von $\lambda > 300$ nm und einer konstanten Temperatur von 60 °C durchgeführt. Experimente im Vakuum (Photolyse) und in einer Sauerstoff enthaltenden Atmosphäre (Photooxidation) zeigten stark unterschiedliche Reaktionswege auf.

Photolyse

Abbildung 3-28 zeigt Absorptionsspektren im UV/Vis-Bereich von PPX als Funktion der Belichtungszeit mit UV/Vis-Licht. Deutliche Veränderungen zwischen 250 und 450 nm sind ein eindeutiges Indiz für photochemisch induzierte Reaktionen des PPX. Der Nachweis verschiedener niedermolekularer Verbindungen in dem Extrakt (Lösungsmittel Methanol) eines belichteten PPX-Filmes bestätigten den Abbau von PPX unter Einfluss von Strahlung.

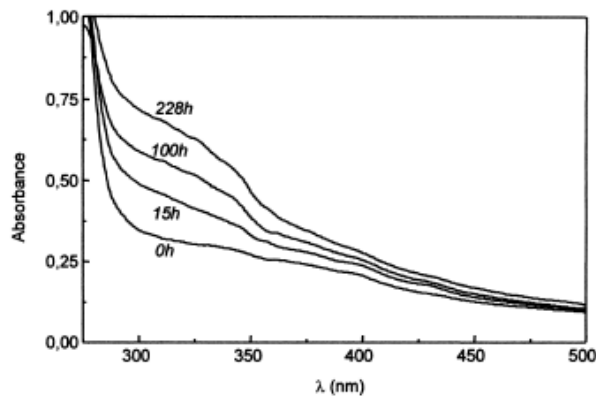


Abbildung 3-28: Absorptionsspektrum von PPX im UV/Vis-Bereich als Funktion der Belichtungszeit mit UV/Vis-Licht ($\lambda > 300$ nm, Vakuum, 60 °C) [159].

Diese Veränderungen im PPX wurden auf zwei unterschiedliche Reaktionen zurückgeführt. Beiden gemeinsam ist in einem ersten Schritt die Bildung von Makroradikalen, welche zum einen unter Rekombinierung zu einem quervernetzten resonanzstabilisierten Polyphenylsystem [160] reagieren können und zum anderen durch Abstraktion des Wasserstoffatoms von der Methylengruppe die Bildung der oben genannten niedermolekularen Spezies verursachen [159].

Photooxidation

Die Veränderungen im Absorptionsspektrum von PPX unter Einfluss von UV/Vis-Strahlung treten bei Gegenwart von Sauerstoff sehr viel früher und in größerem Ausmaß auf (Abbildung 3-29) [159].

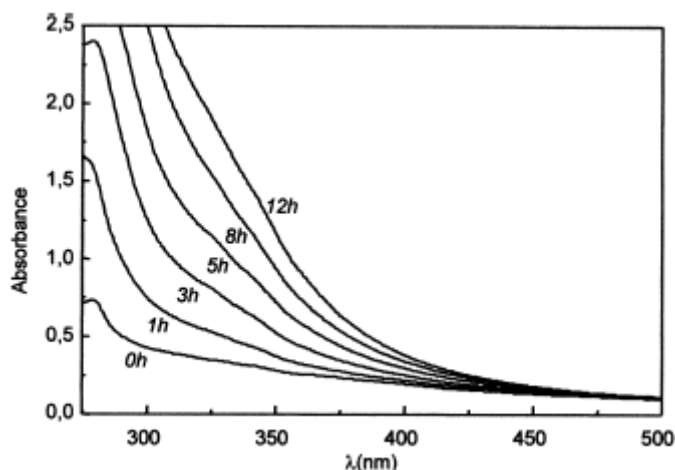


Abbildung 3-29: Absorptionsspektrum im UV/Vis-Bereich von PPX als Funktion der Belichtungszeit mit UV/Vis-Licht ($\lambda > 300$ nm, Gegenwart von Sauerstoff, 60 °C) [159].

Wie bei der Photolyse entstehen Makroradikale, die zu einem konjugierten π -Elektronensystem, durch Bildung eines quervernetzten Polyphenylsystems, reagieren können. Das Spektrum niedermolekularer Verbindungen wird durch die Reaktion mit Sauerstoff stark erweitert. Neben den durch die Photolyse entstehenden Verbindungen konnten Oxidationsprodukte sowohl des Phenylrings als auch der Methylengruppe nachgewiesen werden. IR spektroskopisch wurde die Bildung von Alkoholen, Carbonsäuren, Carbonyl-Gruppen am Ring und mono-substituierten Benzolringen nachgewiesen [159].

Die photochemischen Reaktionen von PPX sind beträchtlich, so dass die Verwendbarkeit von PPX als semipermeable Membran bei der Anwendung des Immobilisierungskonzeptes auf Biosensoren experimentell untersucht werden musste. Umfangreiche Versuchsreihen wurden durchgeführt, die im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

3.2.2.1 Experimentelle Charakterisierungen der optischen Eigenschaften von PPX

In dieser Arbeit wurde erstmals systematisch das Absorptions- und Fluoreszenzverhalten von PPX untersucht, um so aufzuzeigen welche Einschränkungen für die Auswahl des Biosensormoleküls bestehen.

Die Messungen wurden an PPX-Filmen durchgeführt, die nach der Gorham Methode (Kapitel C.I.) auf optisch transparenten Quarzträgern abgeschieden wurden. Die spektroskopischen Daten wurden mit Hilfe eines optischen Aufbaus erfasst, dessen Beschreibung in Kapitel 5.2 zu finden ist. Die Belichtungsversuche wurden mit der Xenonbogenlampe dieses optischen Aufbaus durchgeführt.

Absorptionsverhalten von PPX

Der Wellenlängenbereich zwischen 300 und 700 nm zeichnet sich durch eine optische Transparenz aus. Der Bereich unter 300 nm weist hingegen bei 227 nm bzw. 260 nm zwei Absorptionsmaxima auf (Abbildung 3-30). Belichtungsversuche mit Wellenlängen zwischen 200 und 490 nm zeigten, dass sich das Absorptionsverhalten von PPX unter Einfluss von UV/Vis-Licht stark ändert. Neben einer Intensivierung der vorhandenen Banden tritt eine sehr breite Schulter zwischen 300 und 400 nm auf. Exemplarisch sind in Abbildung 3-31 Absorptionsspektren von PPX nach Belichtung mit 260 nm aufgeführt. Die deutlichen Veränderungen im Spektrenhaut sind auf die in Kapitel C.I. beschriebenen photooxidativen Reaktionen des PPX zurückzuführen. Die Verminderung des optisch transparenten Bereiches tritt erst nach Belichtungszeiten von mehreren Minuten bzw. Stunden auf (Abbildung 3-31) und hat deshalb keine praktische Auswirkung auf die Durchführung von Sensorversuchen, die im Allgemeinen im zeitlichen Rahmen von wenigen Sekunden liegen.

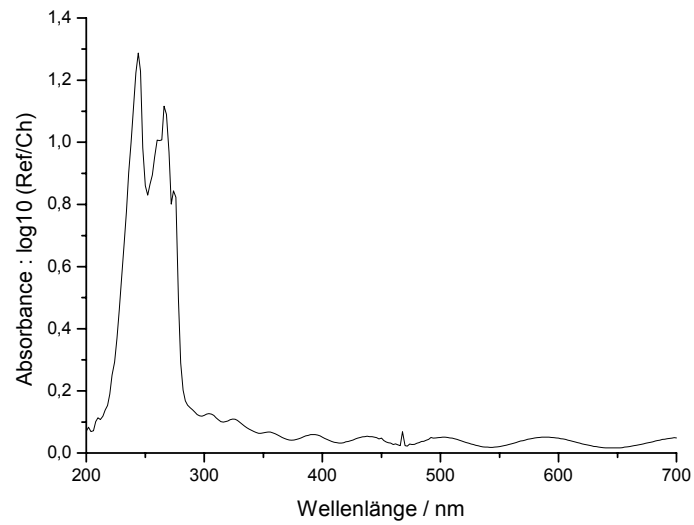


Abbildung 3-30: Absorptionsspektrum von PPX.

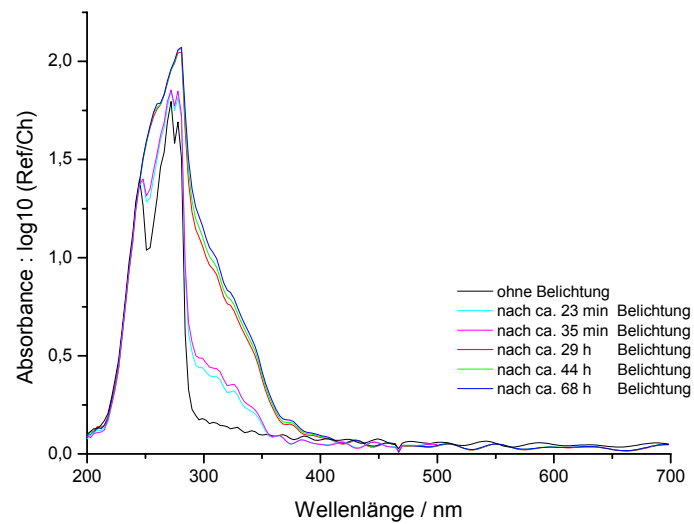


Abbildung 3-31: Absorptionsspektren von PPX nach Belichtung mit $\lambda = 260$ nm.

Fluoreszenzverhalten von PPX

Einer der wichtigsten Ansprüche die an das Immobilisierungskonzept gestellt wird, ist die Verwendbarkeit beliebiger Sensormoleküle. Diese Forderung bringt mit sich, dass das Biomolekül bei verschiedenen Wellenlängen anregbar sein muß und somit auch, dass PPX verschiedenen Wellenlängen ausgesetzt werden kann. Versuchsreihen, die das Fluoreszenzverhalten von PPX bei unterschiedlichsten Wellenlängen aufzeigen, sollten Aufschluß über den Wellenlängenbereich geben, der durch die Photolumineszenz des PPX eingenommen wird. Abbildung 3-32 ist zu entnehmen, dass durch die Anregung von PPX bei beliebig gewählten Wellenlängen zwischen 227 und 490 nm das Polymer Strahlung unterschiedlicher Intensität zwischen 300 und 450 nm und ab 550 nm emittiert.

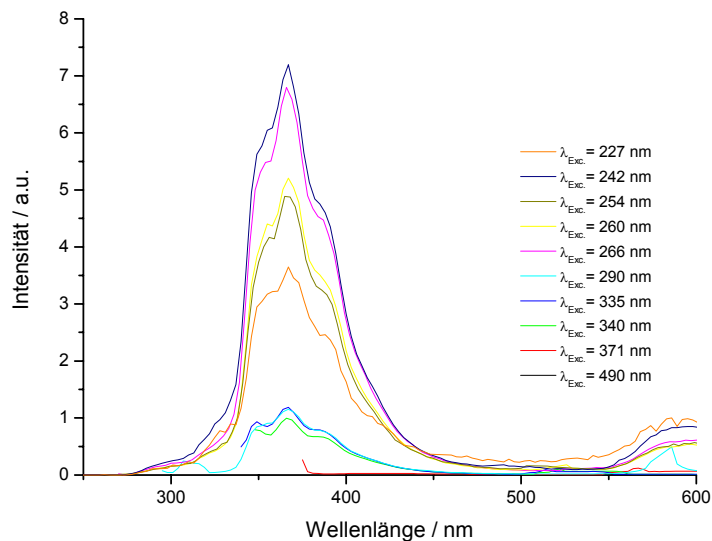


Abbildung 3-32: Anregung von PPX bei unterschiedlichen Wellenlängen.

Die Emission des Sensormoleküls dürfte nur dann in diesen beiden Wellenlängenbereichen liegen, wenn sie deutlich größer wäre und die Fluoreszenzintensität des PPX bei der Anregungswellenlänge des Biomoleküls stabil wäre. In diesem Fall könnte die Lumineszenz des PPX herausgerechnet werden. Versuchsreihen, bestehend aus zwei Teilversuchen, wurden zur Klärung dieses Sachverhalts durchgeführt. Eine Versuchsreihe startete mit einer Fluoreszenzmessung des PPX-Films bei der Anregungswellenlänge $\lambda = 260$ nm. Eine Belichtung mit einer Wellenlänge x für einen bestimmten Zeitraum schloß sich

dieser Messung an. Mögliche Veränderungen im PPX-Film durch die UV/Vis-Belichtung wurden durch eine erneute Fluoreszenzmessung festgestellt. Dieser Vorgang einer Belichtung und einer folgenden Fluoreszenzmessung wurde bis zu 200-mal für eine einzelne Belichtungswellenlänge wiederholt. Die Anregungswellenlänge war in allen Versuchen 260 nm, die Belichtungswellenlänge λ wurde zwischen 200 und 490 nm in Abständen von zu meist 20 nm variiert.

Die Ergebnisse dieser Messungen lassen sich am besten durch die Abhängigkeit des Intensitätsmaximums von der Belichtungszeit beschreiben. Abbildung 3-32 ist zu entnehmen, dass dieses bei 372 nm liegt. Abbildung 3-33 zeigt die Veränderung dieses Maximums in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Eine kontinuierliche Abnahme der Intensität mit zunehmender Belichtungszeit konnte nachgewiesen werden. In einer zweiten Messreihe konnten die Ergebnisse gut reproduziert werden, die geringen Unterschiede in der Intensität sind auf Abweichungen in den Schichtdicken des PPX-Films zurückzuführen. Dieser Intensitätsverlauf ist charakteristisch für alle durchgeführten Belichtungsversuche mit Wellenlängen zwischen 200 und 490 nm.

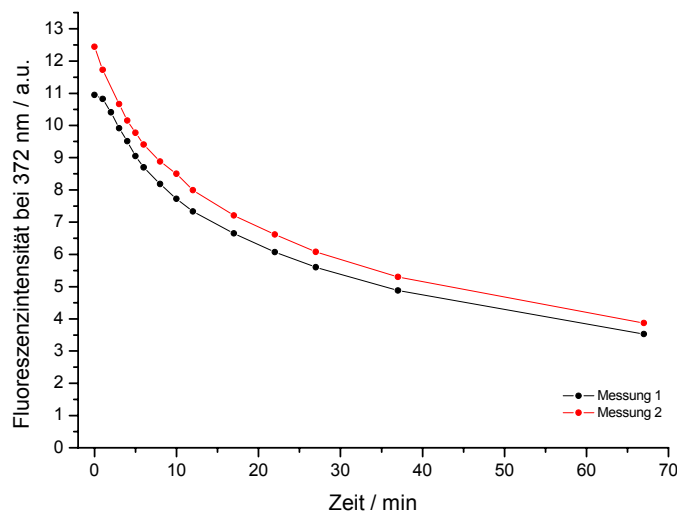


Abbildung 3-33: Intensitätsmaximum (bei $\lambda = 372$ nm) der Fluoreszenz von PPX bei Anregung mit $\lambda = 260$ nm in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Die Belichtung erfolgte mit $\lambda = 260$ nm.

Die Veränderungen im Fluoreszenzverhalten des PPX im Bereich von 300 bis 450 nm sind auf die photooxidativen Reaktionen zurückzuführen, welche in Kapitel C.I. beschrieben werden. Die Ergebnisse der Belichtungsversuche schließen somit den Einsatz eines Biomoleküls, welches in diesem Bereich emittiert, aus.

Verschiedene Derivate vom PPX, wie z.B. das monochlorierte PPX-C (Abbildung 3-34), zeigen ähnliche mechanischen Eigenschaften wie das PPX selbst und wären somit auch für den Einsatz als Membranmaterial geeignet. Würde das PPX-C eine stabile Fluoreszenz zeigen, wäre es dem PPX vorzuziehen.

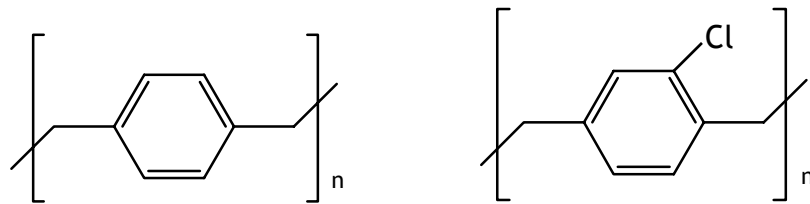


Abbildung 3-34: Strukturformel von PPX und PPX-C.

Die Ergebnisse der Belichtungsversuche mit PPX-C zeigen jedoch noch eine viel größere Instabilität in dem Fluoreszenzverhalten auf (Abbildung 3-35). Im Gegensatz zu PPX steigt die Fluoreszenz bei PPX-C zuerst an, geht durch ein Maximum und fällt dann wieder ab. Dieses Verhalten lässt sich gemäß Kapitel C.I. durch die Bildung und anschließende Zersetzung von Polyphenylenen erklären.

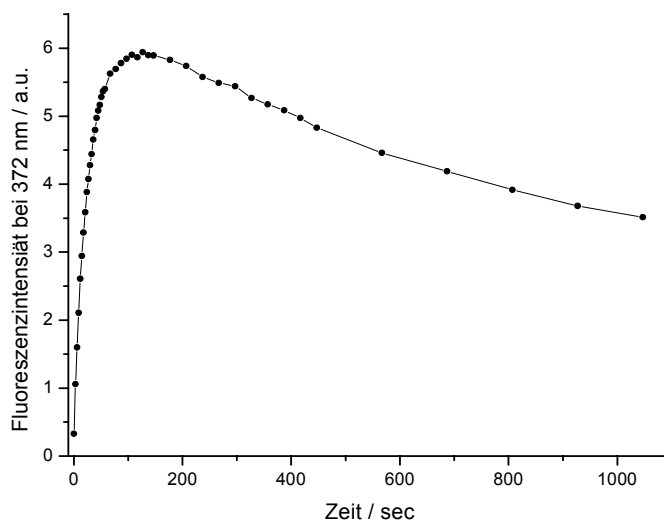


Abbildung 3-35: Intensitätsmaximum (bei $\lambda = 372$ nm) der Fluoreszenz von PPX-C bei Anregung mit $\lambda = 260$ nm in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Die Belichtung erfolgte mit $\lambda = 280$ nm.

Diskussion der Ergebnisse

Die Auswahl des Biomoleküls wird durch die optischen Eigenschaften des PPX eingeschränkt. Ein Sensormolekül kann eingesetzt werden, wenn dessen Emission in einem Wellenlängenbereich erfolgt, in dem PPX transparent ist und die Photolumineszenz des Sensormoleküls nicht von einer Fluoreszenzbande des PPX überlagert wird. Die Anregung des Biomoleküls mit UV/Vis-Strahlung sollte möglichst effektiv sein. Eine Anregung des Biomoleküls in einem Bereich, in dem PPX absorbiert, wäre durch eine entsprechend hohe Intensität der verwendeten Strahlung möglich, eine Steigerung der photooxidativen Reaktionen des PPX und eine Denaturierung des Biomoleküls wären aber die Folge.

Wird ein Einsatz der Sensormoleküle über einen sehr langen Zeitraum angestrebt, ist eine Anregungswellenlänge ab 380 nm (Abbildung 3-31) und eine Emissionsbande zwischen 450-550 nm (Abbildung 3-32) ideal. Üblicherweise ist die Einwirkdauer der Anregungswellenlänge um Größenordnungen geringer als die Belichtungsdauer, die in den oben beschriebenen Experimenten verwendet wurde, so dass sich das optische Fenster entsprechend vergrößert und eine Anregung schon ab 300 nm möglich ist (Abbildung 3-30).

3.2.3 Biomolekül

Die Auswahl des Biomoleküls wurde von zwei unterschiedlichen Zielen geleitet. Das erste Ziel war, den Nachweis zu führen, dass das Konzept in der optischen Biosensorik anwendbar ist. Die Absorption oder Emission eines optischen Signals, welches durch einen Analyten verändert werden kann, muß somit zu den Eigenschaften des eingesetzten Biomoleküls gehören. Die Lage der optischen Signale wird durch die in Kapitel 3.2.2.1 herausgearbeiteten Eigenschaften des Membranmaterials PPX vorgegeben. Darüber hinaus soll gezeigt werden, dass diese Immobilisierungsmethode ein Biomolekül unter Erhalt der vollständigen Reaktionsfähigkeit räumlich fixiert. Die Reaktivität vieler biologischer Verbindungen hängt direkt von ihrer geometrischen Gestalt ab. Es muß demzufolge gezeigt werden, dass das Biomolekül trotz der Einkapselung in einer Matrix in der Lage ist seine natürliche Konformation einzunehmen. Gelingt es diesen Anspruch zu erfüllen, kommt der biologischen Verbindung Modellcharakter zu. Die Hauptvoraussetzungen für die Übertragbarkeit des Konzeptes auf völlig andere biologische Verbindungen würden darin bestehen, dass diese Verbindung ähnliche Ansprüche an die Umgebung stellt, eine vergleichbare Stabilität gegenüber den Versuchsparametern aufweisen würde und ungefähr die Größe des Modellmoleküls besäße. Das verwendete Modellmolekül muß infolgedessen eine leicht nachzuweisende Eigenschaft besitzen, die ausschließlich vorhanden ist, wenn das Molekül in seiner natürlichen Konformation vorliegt.

Die Charakteristika, die dem Biomolekül zu Eigen sein müssen, werden zum einen durch die zuvor beschriebenen Ziele bestimmt und zum anderen durch präparative Bedingungen. Letzteren kommt eine besondere Rolle zu, weil das angestrebte Bioimmobilisierungskonzept keine Weiterentwicklung von bestehenden Methoden ist, sondern eine neuartige Herangehensweise an diese Problematik darstellt. Daraus folgt, dass in vielen Punkten nicht auf bestehende experimentelle Erfahrungen zurückgegriffen werden kann und daher die Notwendigkeit besteht, sehr viele Faktoren selbst zu bestimmen. Von entscheidender Bedeutung ist bei solch einer Herausforderung, die Fehlerquellen möglichst gering zu halten. Das Biomolekül muß daher mindestens für die Dauer der Probenpräparation und Messung stabil gegenüber verschiedenen Parametern sein und sollte überdies

einfach zugänglich sein. Die Parameter setzen sich wie folgt zusammen: Das Biomolekül soll normalen Umweltbedingungen (Luftsauerstoff, Raumtemperatur, etc.) ausgesetzt werden können, ferner einer elektrischen Spannung während des Elektrosinnens und UV/Vis-Belichtung hoher Intensität bei Fluoreszenzmessung standhalten.

Grün Fluoreszierendes Protein (GFP) ist ein seit vielen Jahrzehnten in der Forschung bekanntes Enzym und hat in zahllosen wissenschaftlichen Gebieten Einzug gehalten, so dass sehr viele experimentelle Daten zu GFP vorliegen. Die aus diesen Arbeiten abgeleiteten theoretischen Erkenntnisse gaben den Ausschlag, GFP hinsichtlich seiner Anwendbarkeit auf das Bioimmobilisierungskonzept zu untersuchen. Die Ergebnisse einer Literaturrecherche bezüglich der für diese Arbeit relevanten Daten zu GFP sind im folgenden Abschnitt zu finden. Experimentelle Untersuchungen mit dem Protein schließen sich dem Kapitel an.

D.I. Historie und wichtigste Entwicklungen von Grün Fluoreszierendem Protein

Bei der Aufreinigung des blau fluoreszierenden Proteins Aequorin aus der Qualle *Aequorea victoria* beobachteten Shimomura et al. 1962 zufällig die grünliche Färbung einer Lösung. Nähere Untersuchungen zeigten, dass neben dem bereits bekannten Aequorin ein weiteres, ebenfalls fluoreszierendes Protein vorliegt, das Grün Fluoreszierende Protein GFP [161]. Diese Entdeckung ermöglichte es die grüne Biolumineszenz der *Aequorea* Qualle aufzuklären, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht mit der blauen Chemilumineszenz des reinen Aequorin in Zusammenhang gebracht werden konnte. Dem Förster-Mechanismus folgend ist das GFP in der Lage, Strahlung spektral zu verschieben, indem es die blaue Emission des Aequorin absorbiert und die aufgenommene Energie durch eine grüne Fluoreszenz wieder abgibt [162, 163].

In den Folgejahren wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, die zur Aufklärung von grundlegenden Fragen beitragen sollten. Der Bestimmung des genauen Molekulargewichts des Proteins [164] und der Aufklärung der Strukturformel des Chromophors (4-(p-Hydroxybenzyliden)-imidazolidinon), siehe

Abbildung 3-37) [165], folgten zahlreiche Untersuchungen bezüglich des Verhaltens von GFP z.B. gegenüber Veränderungen des pH-Werts, der Tendenz zur Aggregation [166] und der Renaturierung des Proteins [167]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass GFP in weiteren marinen Lebewesen wie dem Hohltier *Obelia*, einem Hydroidpolypen und *Renilla*, einer Weichkoralle zu finden sind [168, 169].

Der entscheidende Durchbruch, der GFP in der Wissenschaft eine solch exponierte Position zukommen lässt, gelang Anfang der 1990iger Jahre. Die Isolierung und das Klonen des kodierenden Gens [170] sowie der nachfolgende Einbau des GFP in andere Organismen [171, 172] ermöglichte eine Vielzahl an Experimenten, an die bis zu diesem Zeitpunkt nicht zu denken war. Die intrinsische Fluoreszenz des GFP bleibt, auch nachdem es in andere biologische Spezies eingebaut wurde, existent und versetzt somit die Forscher in die Lage, z.B. Zellen zu markieren und dadurch deren Bewegungen und Reaktionen zu verfolgen [173]. In weiteren Arbeiten wurde versucht, durch Veränderungen des Chromophors die Eigenschaften dieses *in vivo* Markers zu verbessern. Auf die Erzeugung anderer Farben und die Erhöhung der Fluoreszenzintensität wurde dabei besonderes Augenmerk gelegt. Die Synthese von z.B. blau und cyan fluoreszierenden Proteinen (BFP und CFP) ermöglicht es mehrere Prozesse parallel zu verfolgen [173, 174].

D.II. Biophysikalische Eigenschaften von Grün Fluoreszierendem Protein

Die Aufklärung der Kristallstruktur von GFP [175, 176] ermöglichte es, die Vorteile von GFP gegenüber anderen fluoreszierenden Proteinen sehr anschaulich zu verdeutlichen. Die 238 Aminosäuren des Proteins bilden drei unterschiedliche Strukturelemente: elf β -Faltblätter, eine α -Helix und ein Chromophor, wobei sich der Chromophor autokatalytisch aus der genetisch kodierten Protein-Primärsequenz bildet.

Die β -Faltblätter formen einen Zylinder aus, in dessen Inneren die α -Helix und der Chromophor räumlich fixiert sind (Abbildung 3-36). Diese außergewöhnlich kompakte und stabile geometrische Struktur schirmt den Chromophor vollständig gegenüber äußeren Einflüssen, wie z.B. Sauerstoff oder Lösungsmittel ab und zeigt

sich somit für die stabile und intensive intrinsische Fluoreszenz des GFP verantwortlich [177].

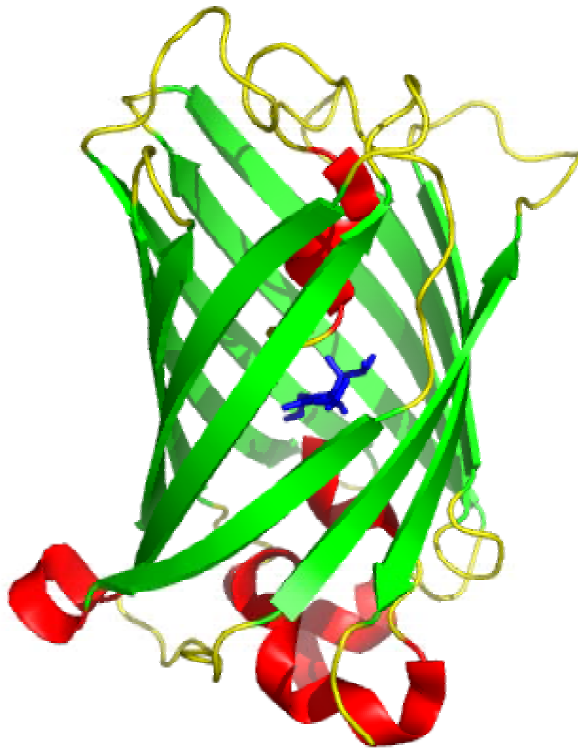


Abbildung 3-36: Struktur des Grün Fluoreszierenden Proteins. Durchmesser bzw. Länge des Proteins betragen circa 24 bzw. 50 Å.

Der genaue Mechanismus, welcher der autokatalytischen Chromophorsynthese zu Grunde liegt, konnte erst Mitte bzw. in den späten 1990iger Jahren aufgeklärt werden (Abbildung 3-37) [178-180]. An der Chromophorsynthese sind die Aminosäuren Serin bzw. Threonin, Tyrosin und Glycin beteiligt. In einem ersten Schritt wird die Bildung eines Imidazolinons durch die nukleophile Reaktion der Amid-Gruppe des Glycins mit der Carbonyl-Gruppe des Serins bzw. Threonins eingeleitet und durch eine Dehydratation vollendet. Den Abschluss der Synthese stellt eine Oxidation durch Sauerstoff dar, wodurch ein konjugiertes System aus dem aromatischen Teil des Tyrosins und des Imidazolinons generiert wird [177]. Die Oxidation ist bei dieser Synthese mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} \approx 19 - 83$ min der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [177].

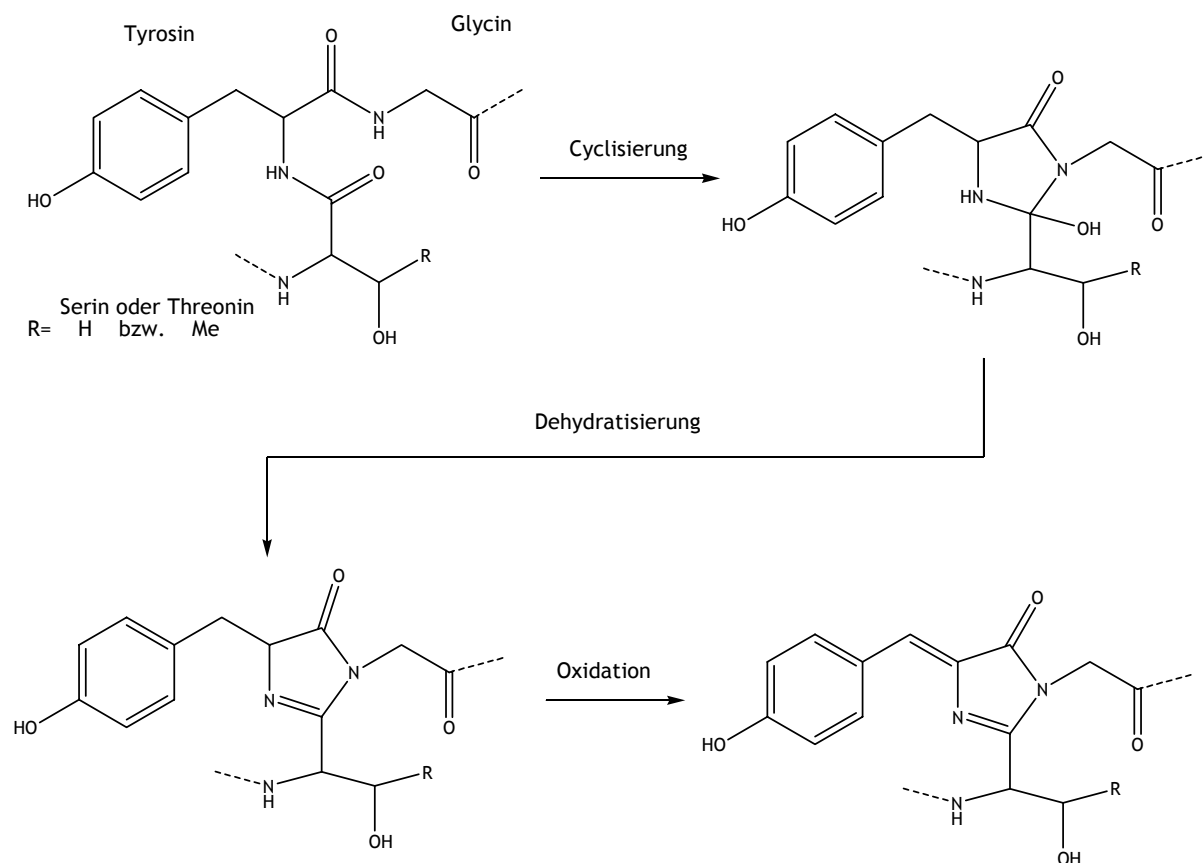


Abbildung 3-37: Synthesemechanismus des GFP-Chromophors [179].

Bei den derzeit sieben bekannten Variationen des GFP zeigen sich die Unterschiede in der Struktur des Chromophors. So ist z.B. ein GFP bekannt, bei dem die neutrale Phenol-Gruppe mit der anionischen Phenolat-Gruppe im Gleichgewicht steht. Eine andere Variante wiederum enthält nur das Phenolat anion [177]. Diese Unterschiede ziehen teilweise erhebliche Differenzen in dem Absorptions- und Emissionsverhalten des GFP nach sich. Der Chromophor absorbiert zwischen 350 und 500 nm und kann in diesem Bereich sowohl ein als auch zwei Absorptionsmaxima aufweisen. Absorptionen bei niedrigeren Wellenlängen sind aromatischen Gruppen von anderen Aminosäuren des Proteins zuzuschreiben [177]. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei der grün fluoreszierenden Variante bei circa 510 nm. Bei anderen Varianten weicht das Maximum jedoch erheblich von diesem Wert ab [177], so dass man nicht mehr von GFP spricht, sondern von z.B. den bereits erwähnten BFP oder CFP. Veränderungen der spektroskopischen Eigenschaften sind allerdings nicht nur durch intrinsische Faktoren möglich.

Das Absorptions- und Emissionsverhalten von GFP ist fest mit der geometrischen Struktur, die den Chromophor gegen äußere Parameter abschirmen soll, verbunden. Externe Parameter, wie z.B. Veränderungen des pH-Werts, Temperaturveränderungen oder denaturierende Verbindungen (z.B. Harnstoff oder Guanidin) können zu einer Entfaltung des GFP führen, die sich durch eine Verschiebung der Banden und/oder einer Verminderung oder Erhöhung der Intensitätsmaxima bemerkbar machen können bzw. die Fluoreszenz vollständig verhindern. Werden diese externen Parameter wieder aufgehoben, kann das GFP in seine native Struktur zurückkehren und seine vorherigen Eigenschaften zurückgewinnen. Eine Renaturierung aller Proteine ist dabei jedoch nicht möglich. In der Praxis kann unter optimalen Bedingungen ein Anteil von bis zu 90 % erreicht werden [181].

Die Abhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften des GFP von externen Parametern macht ausführliche optische Messungen des eingesetzten GFP unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen somit unablässig.

3.2.3.1 Experimentelle Bestimmung der spektroskopischen Eigenschaften von GFP

Die Umsetzung des Bioimmobilisierungskonzeptes mit Grün Fluoreszierendem Protein erfordert eine genaue Kenntnis der spektroskopischen Eigenschaften des verwendeten Biomoleküls. Das für diese und folgende Arbeiten notwendige GFP wurde freundlicherweise von Herrn Thomas Kurpiers (Arbeitskreis Dr. Henning Mootz, Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

Zur Bestimmung dieser Eigenschaften wurden umfassende Versuchsreihen durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde das Absorptionsverhalten im UV/Vis-Bereich untersucht, um an Hand dieser Werte genaue Studien an GFP bezüglich dessen Fluoreszenzverhaltens durchführen zu können. Die zu beantwortenden Fragen waren dabei:

- Bei welcher Anregungswellenlänge emittiert GFP die intensivste Strahlung?
- Bis zu welcher GFP-Konzentration ist die Fluoreszenz detektierbar?
- Über welchen Zeitraum ist die Fluoreszenzintensität von GFP in Pufferlösung stabil?
- Wie verändert sich die Fluoreszenz durch eine denaturierende Substanz?
- Zeigt GFP nach der Verwendung als Additiv bei dem Elektrosprinprozess noch Fluoreszenz?

Die gesamten Versuchsreihen wurden mit GFP in Pufferlösungen durchgeführt. Die Zusammensetzung des Puffers gibt Tabelle 3-6 wieder.

Zusammensetzung des Puffers

50 mM Tris-HCl

300 mM NaCl

1 mM EDTA

pH 7

Tabelle 3-6: Zusammensetzung des Puffers in dem GFP aufgenommen wurde.

Zur Bestimmung der Absorptionsmaxima wurde ein Spektrum von 6,6 μM GFP-Lösung aufgenommen. Abbildung 3-38 sind die Maxima zu entnehmen. Sie liegen bei 232 nm, 276 nm, 392 nm und 488 nm.

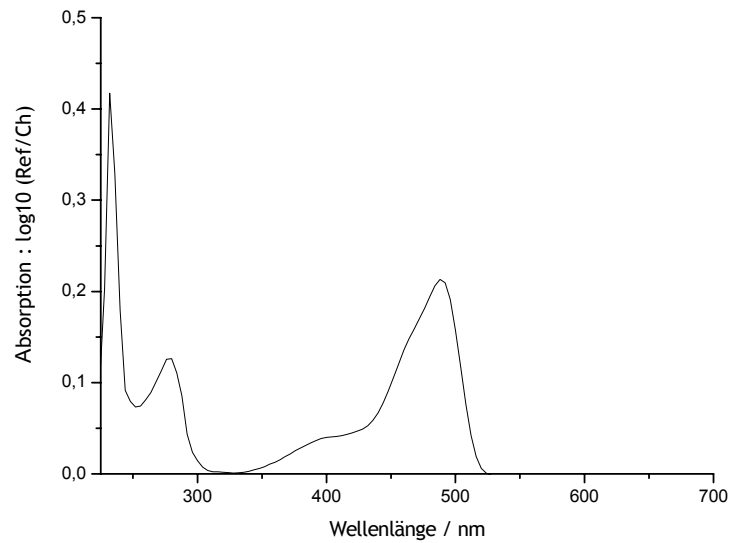


Abbildung 3-38: Absorptionsspektrum einer 6,6 μM GFP-Lösung.

Bestimmung der Anregungswellenlänge

Basierend auf diesen Werten wurde die GFP-Lösung zur Fluoreszenz angeregt. In Übereinstimmung mit den Literaturdaten, die die beiden Absorptionsmaxima bei den höheren Wellenlängen dem Chromophor und die beiden unteren Maxima der Proteinhülle zuschreiben [181], emittiert GFP durch eine Anregung bei 488 nm die intensivste Strahlung. Das Maximum der Fluoreszenz liegt bei 511 nm (Abbildung 3-93).

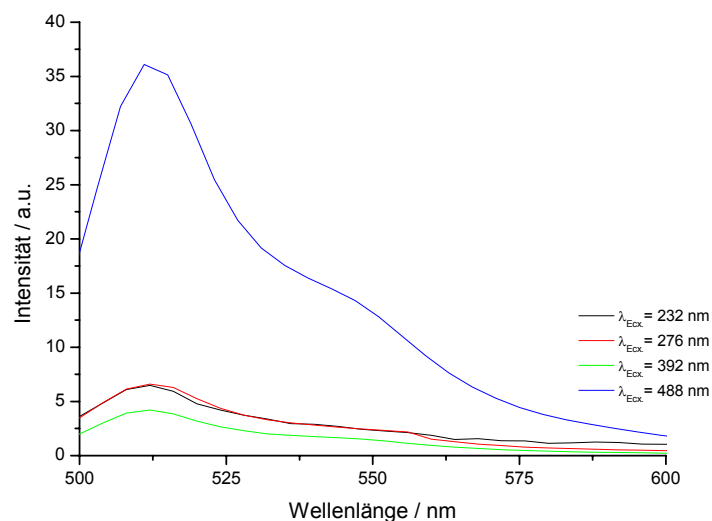


Abbildung 3-39: Anregung einer 6,6 μM GFP-Lösung bei den Absorptionsmaxima.

Die Einkapselung des Biomoleküls soll in Nanocontainern erfolgen, was beinhaltet, dass nur sehr wenige GFP-Moleküle in einem Container sein werden. Dieser Umstand macht es unablässig, die maximal mögliche Fluoreszenzintensität zu bestimmen. Die Messungen wurden deshalb auf weitere Anregungswellenlängen ausgedehnt, um zu überprüfen, ob die Anregungswellenlänge von 488 nm die am besten geeignete darstellt. Die Messungen, die in Abbildung 3-40 wiedergegeben sind, zeigen, dass die höchste Fluoreszenzintensität mit einer Anregungswellenlänge von 490 nm erzielt wird.

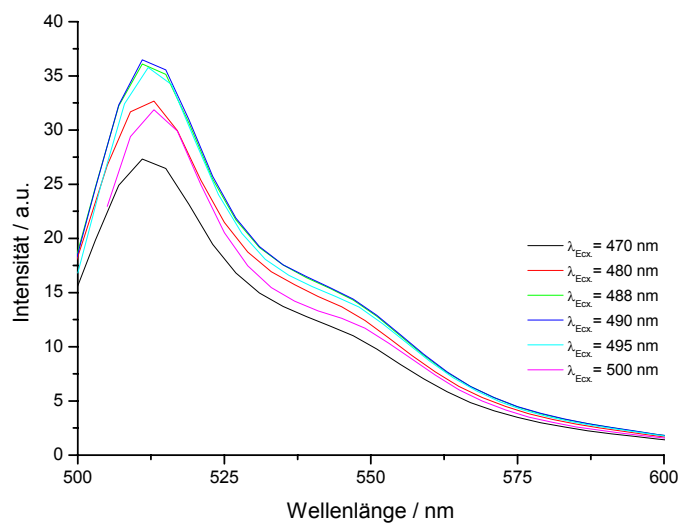


Abbildung 3-40: Bestimmung der maximalen Fluoreszenzintensität einer 6,6 µM GFP-Lösung.

Bestimmung des Zusammenhangs zwischen GFP-Konzentration und Fluoreszenzintensität

Spektroskopie an solch geringen Substanzmengen, wie sie hier angestrebt werden, stellt eine enorme Herausforderung dar. Diese Versuche sind nur durchführbar, wenn der Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Fluoreszenzintensität genau bekannt ist. Zur Ermittlung dieses Zusammenhangs wurden ausführliche Studien an einer GFP-Verdünnungsreihe durchgeführt.

Die 6,6 µM GFP-Lösung wurde in mehreren Schritten jeweils um den Faktor zehn verdünnt und von jeder der Lösungen Fluoreszenzspektren, bei Anregung mit 490 nm, aufgenommen. Die Ergebnisse der Versuchsreihen sind in den folgenden

zwei Abbildungen wiedergegeben. Abbildung 3-41 umfasst die Spektren der gesamten Verdünnungsreihe. Abbildung 3-42 hebt die Daten für die geringeren Konzentrationen vor. Den Daten sind zwei wichtige Erkenntnisse zu entnehmen.

Zum einen lässt sich an Hand der Messungen eine Aussage treffen, bis zu welcher Konzentration die Fluoreszenzintensität groß genug ist, um sie nachweisen zu können. Die dritte Stufe der Verdünnungsreihe (GFP Konzentration = 66 nM) stellt mit einer Fluoreszenzintensität von 0,4 die niedrigste Konzentration dar, die unter den Versuchsbedingungen zu verwendbaren Ergebnissen führt. Die Fluoreszenzintensität des eingekapselten GFP sollte somit mindestens in diesem Bereich liegen, besser noch den Wert deutlich übertreffen. Die Einstellung der Fluoreszenzintensität ist bei vielen fluoreszierenden organischen Verbindungen problematisch, da es zu „Quenching-Effekten“ kommen kann. Mit Quenching (engl.: löschen) wird in der Spektroskopie das Phänomen der Lumineszenzlöschung beschrieben. Dabei wird die aufgenommene Energie nicht in vollem Umfang in Form von Strahlung an die Umgebung abgegeben, sondern die Energie wird auf andere Farbstoffmoleküle übertragen (die Verbindung löscht sich in diesem Fall selbst aus) oder eine Übertragung auf z.B. Verunreinigungen, Lösungsmittel oder Sauerstoff erfolgt. Das bedeutet, dass eine Steigerung der Farbstoffkonzentration nicht zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität führt, sondern gerade das Gegenteil tritt ein, eine Erniedrigung der Fluoreszenz ist festzustellen. Diese Problematik führt direkt zu dem zweiten wichtigen Ergebnis der Studien an der Verdünnungsreihe.

Der Auftragung der Fluoreszenzintensität bei dem Maximum ($\lambda=511$ nm) gegen die GFP-Konzentration (Abbildung 3-43) ist zu entnehmen, dass über den gesamten Konzentrationsbereich ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der GFP-Konzentration und der daraus resultierenden Fluoreszenzintensität besteht. Diese Ergebnisse zeigen klar auf, dass eine GFP-Konzentrationserhöhung nicht zu einem „Eigenquenching“ führt. Darüber hinaus wird GFP auch nicht durch andere Moleküle, wie z.B. Lösungsmittel oder Sauerstoff gequenchet. Zurückzuführen ist diese Eigenschaft auf die einzigartige Struktur der Proteinhülle (Abbildung 3-36), die es vermag, den Chromophor gegenüber allen externen Einflüssen abzuschirmen.

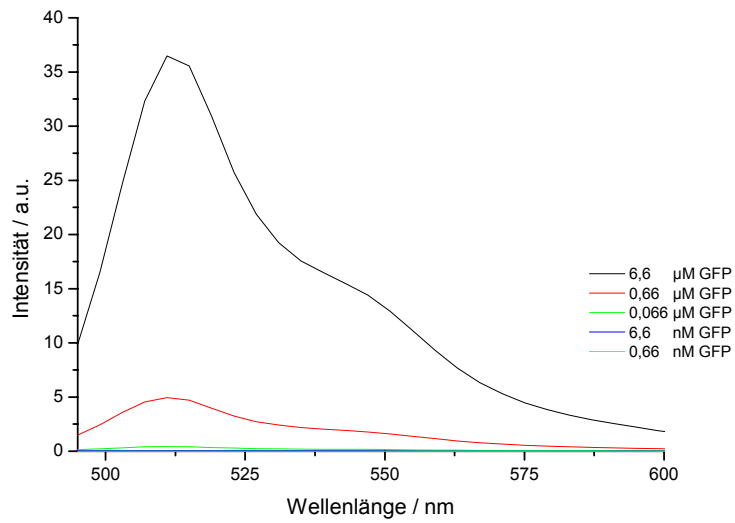


Abbildung 3-41: Fluoreszenzmessungen ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) an einer GFP-Verdünnungsreihe.

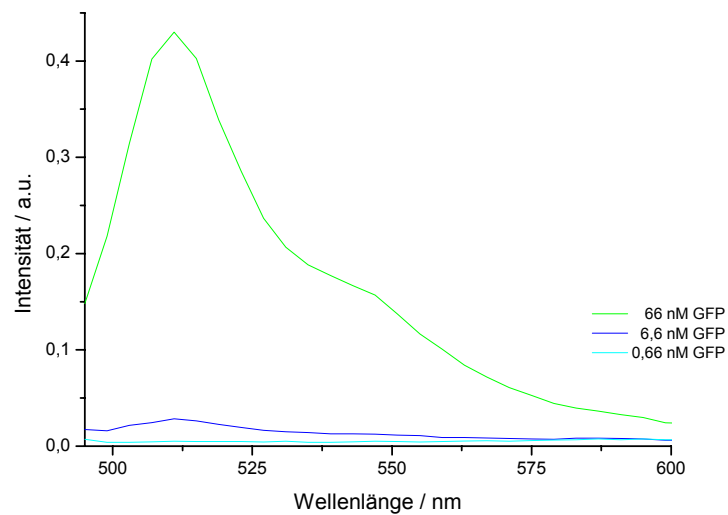


Abbildung 3-42: Fluoreszenzmessungen ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) an einer GFP-Verdünnungsreihe. Spektren der niedrigeren Konzentrationen.

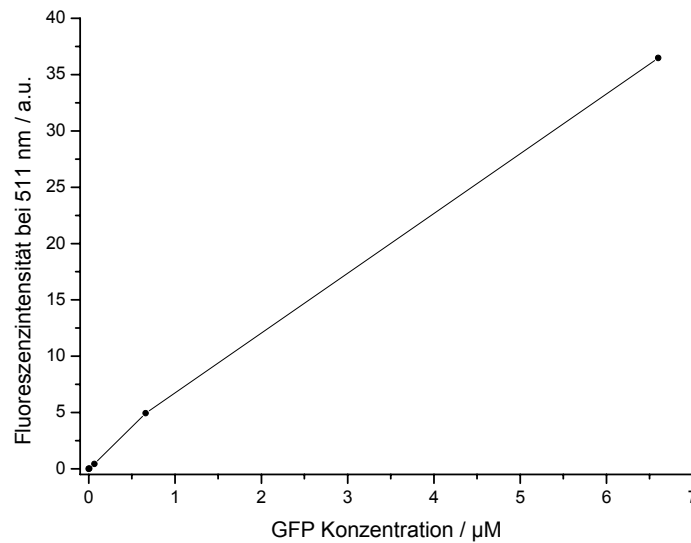


Abbildung 3-43: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität bei 511 nm ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) von der GFP-Konzentration.

Bestimmung der Fluoreszenzstabilität in Abhängigkeit von der Zeit

Eine weitere Voraussetzung für die Sensorik an GFP ist dessen Stabilität über einen angemessenen Zeitraum. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die Fluoreszenzmessungen an der GFP-Verdünnungsreihe nach unterschiedlichen Zeiträumen wiederholt. Die Proben lagerten zwischen den Messungen im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach fast zwei Tagen unter diesen Bedingungen ist bei den höchsten beiden Konzentrationen (Abbildung 3-44 und 3-45) nahezu kein Abbau der Fluoreszenzintensität festzustellen. Bei 100facher Verdünnung (Abbildung 3-46) hingegen beeinflusst die Denaturierung des Proteins die Fluoreszenz deutlich. Bei einer Verdünnung um Faktor 1000 setzt sich dieser Trend entsprechend fort (Abbildung 3-47).

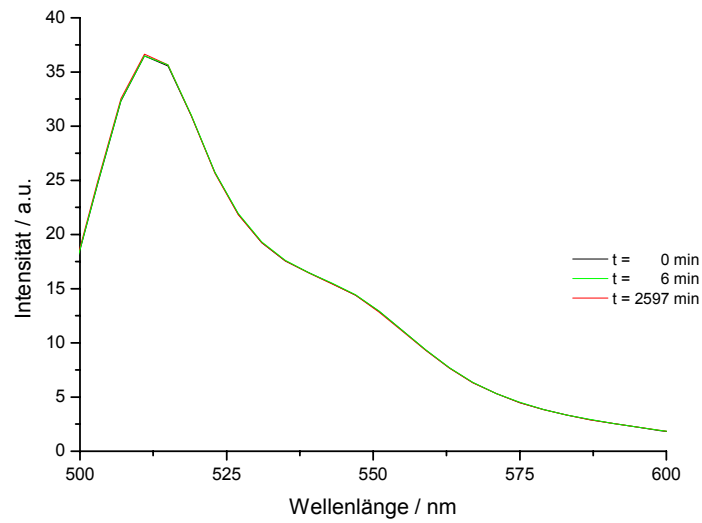


Abbildung 3-44: Bestimmung der Fluoreszenzstabilität ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) einer $6,6 \mu\text{M}$ GFP-Lösung in Abhängigkeit der Zeit.

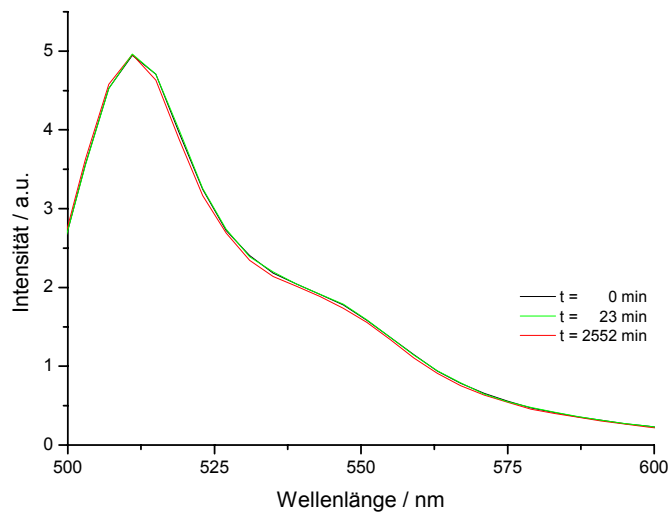


Abbildung 3-45: Bestimmung der Fluoreszenzstabilität ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) einer $0,66 \mu\text{M}$ GFP-Lösung in Abhängigkeit der Zeit.

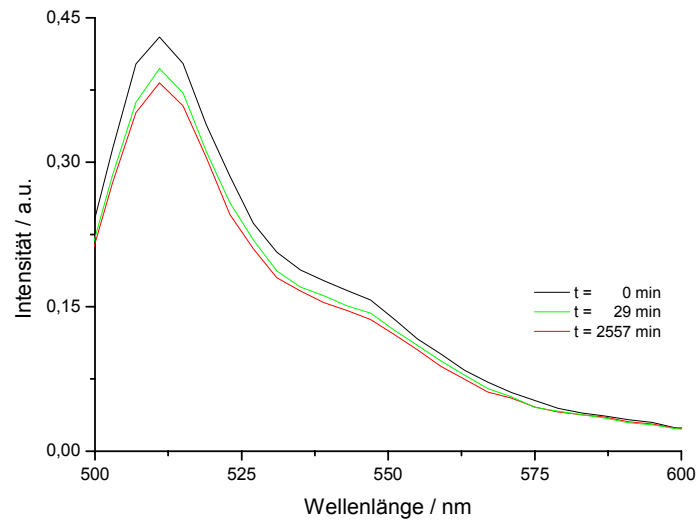


Abbildung 3-46: Bestimmung der Fluoreszenzstabilität ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) einer 66 nM GFP-Lösung in Abhängigkeit der Zeit.

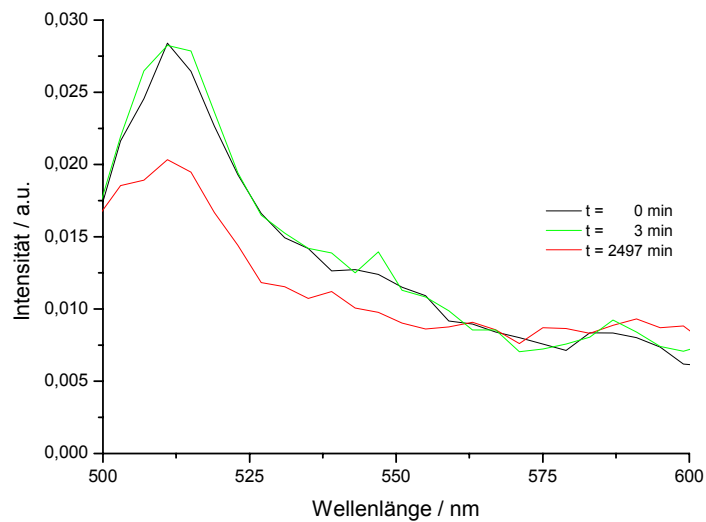


Abbildung 3-47: Bestimmung der Fluoreszenzstabilität ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) einer 6,6 nM GFP-Lösung in Abhängigkeit der Zeit.

Fluoreszenzänderung durch einen Analyten

Von entscheidender Bedeutung für den Einsatz des hier dargelegten Konzeptes z.B. in der Sensorik oder der Synthese ist, dass das immobilisierte Biomolekül weiterhin zu Reaktionen mit anderen Verbindungen in der Lage ist. Ein eindeutiger Nachweis einer Reaktion von GFP gelingt z.B. mit Harnstoff. Diese organische Verbindung wirkt, indem es die Proteinhülle zerstört, denaturierend auf das Protein. Der Verlust der Fluoreszenz ist die Folge [181].

Um spätere Sensorversuche an immobilisiertem GFP mit Harnstoff als Analyten einordnen zu können, sind Vorversuche notwendig, die die Fluoreszenzveränderungen von GFP in Lösung durch Einwirkung von Harnstoff dokumentieren. Zur Klärung dieses Sachverhalts wurde die Fluoreszenz einer 6,6 μM GFP-Lösung (Probenmenge 1,64 g) bestimmt. Zweimal wurde die Reproduzierbarkeit dieser Messwerte überprüft und als sehr gut eingestuft. Die Auswirkung die eine Zugabe von Harnstoff nach sich zieht, ist in Abbildung 3-48 deutlich nachvollziehbar. Mehrere Minuten nach einer Harnstoffexposition ist eine Verminderung der Fluoreszenzintensität auf ungefähr die Hälfte des Ausgangswertes zu vermerken. Die Wiederholung der Fluoreszenzbestimmung im Abstand von einigen Minuten führt zu identischen Spektren, so dass festgestellt werden kann, dass die zugeführte Harnstoffmenge vollständig abreagiert ist und die nicht denaturierten Proteinmoleküle eine stabile Fluoreszenz aufweisen.

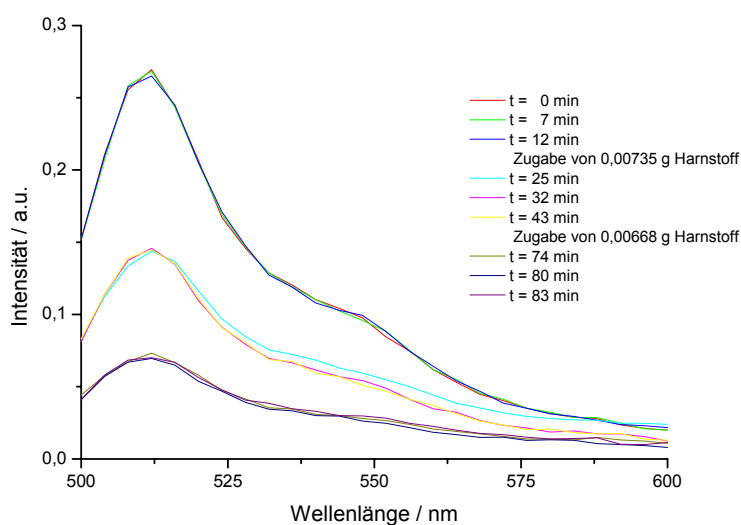


Abbildung 3-48: Veränderung der Fluoreszenzspektren ($\lambda_{\text{EXC.}} = 490 \text{ nm}$) einer 6,6 μM GFP-Lösung (Probenmenge 1,64 g) durch Harnstoffexposition.

Die genaue Auswirkung einer denaturierend wirkenden Verbindung auf die Fluoreszenz des Proteins wird durch die Auftragung der Fluoreszenzintensität bei 511 nm gegen die zugeführte Harnstoffmenge in Abbildung 3-49 verdeutlicht. Geringe Harnstoffmengen bewirken ein extremes Absinken der Fluoreszenz auf einen Wert, der auch bei Zugabe von weiterem Harnstoff erhalten bleibt. Dieses Verhalten wurde in zwei unabhängigen Versuchsreihen nachgewiesen.

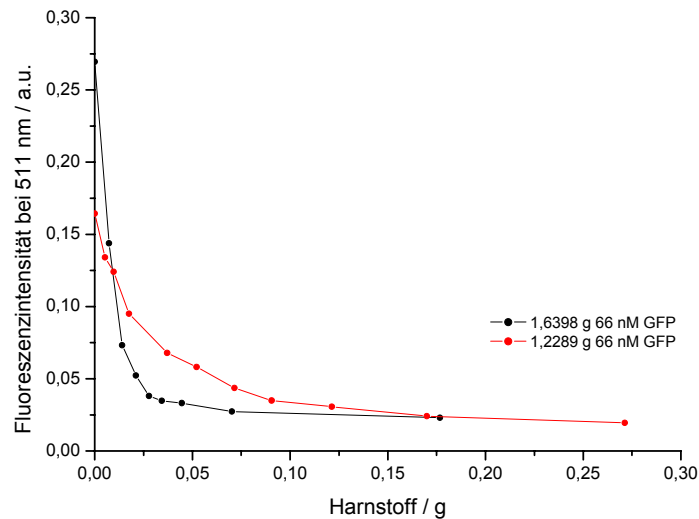


Abbildung 3-49: Fluoreszenzintensität ($\lambda_{Exc.} = 490$ nm) von GFP bei 511 nm in Abhängigkeit von der zugeführten Harnstoffmenge.

Bestimmung der Fluoreszenz nach dem Elektrosponnen

Essentiell für die Umsetzung des Konzeptes ist, dass das Biomolekül nach der Aufnahme in eine Polymerlösung und der Verarbeitung der Lösung zu Nanofasern über Elektrosponnen in der Lage ist, nachdem die Nanofasern aufgelöst wurden, in seine native Form zurückzukehren. Dieser Nachweis wurde geführt, indem GFP als Zusatz einer wässrigen PEO-Lösung zugeführt wurde, die Lösung zu Nanofasern verarbeitet wurde und dieses Biomolekül-Nanofaser-Konjugat kurze Zeit später wieder in einer Pufferlösung aufgelöst wurde. Bei Anregung der Lösung mit 490 nm zeigte sich eine deutliche Fluoreszenz (Abbildung 3-50), wodurch eindeutig nachgewiesen werden konnte, dass das GFP in der Lage ist nach dem Elektrosponnen in seine native Konformation zurückzukehren. Der Anstieg der Fluoreszenz mit der Zeit ist darauf zurückzuführen, dass der Rückfaltungsprozeß einen längeren Zeitraum in Anspruch nimmt. Weitere Versuchsreihen zeigten, dass dieser Vorgang teilweise erst nach einigen Tagen abgeschlossen ist.

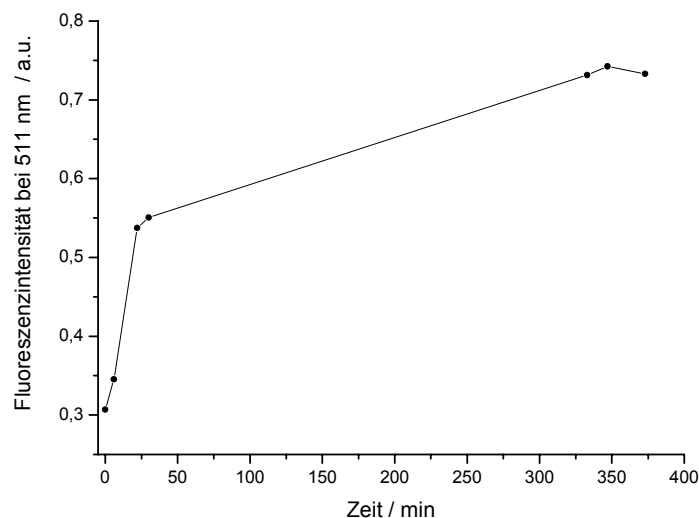


Abbildung 3-50: Entwicklung der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) bei 511 nm von GFP in Abhängigkeit der Zeit. Zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$ wurden elektrogesponnene Nanofasern mit GFP als Additiv in einem Puffer aufgelöst.

3.3 Umsetzung des Konzepts zur Bioimmobilisierung in einer privilegierten Umgebung

Die vorangehenden Kapitel haben sich ausführlich mit den zur Bioimmobilisierung notwendigen Einzelkomponenten auseinander gesetzt. Basierend auf theoretischen Überlegungen und experimentellen Untersuchungen wurde für die Wahl der Einzelkomponenten folge Entscheidung getroffen:

Einzelkomponente	Material
Trägermaterial	Poly(ethylenoxid)
Membran	Poly(p-xylylen)
Biomolekül	Grün Fluoreszierendes Protein

Tabelle 3-7: Material der Einzelkomponenten.

Nachweis der Immobilisierung

Für die Bioimmobilisierung in einer privilegierten Umgebung wurde eine Lösung gemäß Tabelle 3-8 angesetzt und daraus Nanofasern unter den Bedingungen, die in Tabelle 3-9 zusammengefasst sind, gesponnen. Tabelle 3-9 beschreibt die Bedingungen, die auch bei allen folgenden Spinnprozessen eingehalten wurden.

Komponente	Zusammensetzung
Polymer	6 wt% wässrige PEO / Puffer Lösung Der Polymeranteil setzt sich zusammen aus: PEO 900.000 g/mol und 4.000 g/mol im Verhältnis 70:30
Biomolekül	22,5 µM GFP

Tabelle 3-8: Zusammensetzung der Elektrospinnlösung.

Wert	Parameter
15 kV	Spannung
20 cm	Elektrodenabstand
0,45 mm	Kanüldurchmesser
25 mm	Kanülenlänge
0,2 mL / h	Vorschub

Tabelle 3-9: Elektrosppinparameter.

Durch Verspinnen der Lösung unter den eingestellten Bedingungen bildeten sich circa 1 μm dicke Nanofasern mit einer glatten Oberflächenstruktur aus. Die Produktion einer kompletten Matte mit Fasern dieser Qualität konnte jedoch nicht erreicht werden, da die Lösung während des Spinnens sehr stark spritzte und dadurch größere Lösungstropfen auf den Fasern abgeschieden wurden, wodurch diese zerstört wurden. Dieses Problem wurde versucht zu beheben, in dem die Zusammensetzung der Lösung modifiziert wurde. Das Polymer wurde nicht in Pufferlösung, sondern in Wasser aufgelöst. Diese Veränderung führte zu sowohl sehr guten Fasern als auch insgesamt einer sehr guten Fasermatte, da bei dieser Lösung kein Spritzen mehr auftrat (Abbildung 3-51).

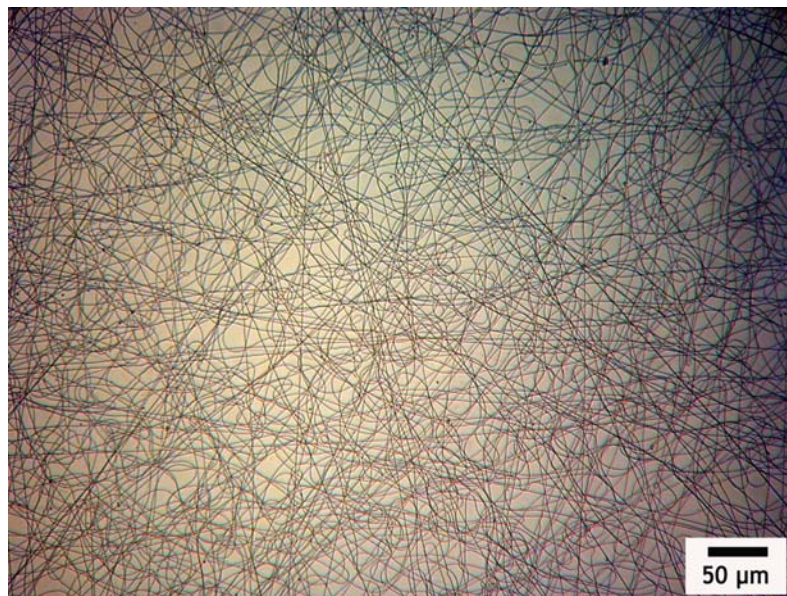


Abbildung 3-51: Nanofasern der Zusammensetzung gemäß Tabelle 3-8 (Pufferlösung gegen Wasser ersetzt). Optische Mikroskopieaufnahme mit 200facher Vergrößerung.

Eine Matte dieser Nanofasern wurde mit 520 nm PPX-beschichtet und zur Fluoreszenz angeregt. In Übereinstimmung mit der Erwartung zeigte das System keine Lumineszenz, da das GFP in einer polymeren Matrix fixiert vorliegt. Erst durch die Substitution von Teilen der polymeren Matrix gegen Pufferlösung können die angestrebten Nanocontainer ausgebildet werden und so eine fluide Matrix für das Biomolekül entstehen. Aufgrund dessen wurde im nächsten Schritt die beschichtete Fasermatte für einige Minuten in eine Pufferlösung gelegt und anschließend Fluoreszenzspektren von diesem System aufgenommen. Das System zeigte jedoch keine Fluoreszenz. Der Grund für dieses Ergebnis konnte leicht festgestellt werden.

Diffundiert PEO durch die PPX-Membran und erzeugt dadurch lösungsmittelgefüllte Kavitäten, so können diese mit bloßem Auge bzw. an den mechanischen Eigenschaften erkannt werden: Das weiße PEO wird durch eine wässrige Lösung ersetzt und es bilden sich transparente Bereiche aus. Durch die Substitution des PEO gegen Wasser wird das gesamte System deutlich flexibler. Weder eine Veränderung der optischen noch der mechanischen Eigenschaften konnte für das System festgestellt werden, nachdem es einige Minuten in der Pufferlösung gelegen hat. Somit kann eindeutig festgestellt werden, dass kein bzw. nur ein extrem geringer Teil des niedermolekularen PEO durch die Membran diffundiert ist, wodurch erklärt wird, warum das System nicht zur Fluoreszenz angeregt werden kann.

Daraufhin wurde die beschichtete Fasermatte für insgesamt drei Tage in die Pufferlösung eingelegt und in unregelmäßigen Abständen Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Dauer der Einwirkung des Lösungsmittels hatte jedoch keinen Einfluss auf das Diffusionsverhalten. Es konnte zu keinem Zeitpunkt eine Fluoreszenz detektiert werden.

Auf dieses Problem wurde reagiert, indem die Zusammensetzung der Lösung dahingehend verändert wurde, daß das PEO 4000 gegen PEO 600 ausgetauscht wurde, unter der Annahme, dass die Verringerung der Molekülgröße eine Diffusion ermöglichen sollte. Die gesamte Zusammensetzung der neuen Lösung ist in Tabelle 3-10 aufgeführt.

Komponente	Zusammensetzung
Polymer	6 wt% wässrige PEO-Lösung Der Polymeranteil setzt sich zusammen aus: PEO 900.000 g/mol und 600 g/mol im Verhältnis 70:30
Biomolekül	3 μ M GFP

Tabelle 3-10: Zusammensetzung der Elektrospinnlösung.

Die Lösung wurde versponnen und eine Fasermatte mit 600 nm PPX-beschichtet. Dieses System wurde wiederum in eine Pufferlösung gegeben und nach unterschiedlichen Zeitabschnitten Fluoreszenzspektren aufgenommen. Die Erniedrigung des Molekulargewichts von 4000 g/mol auf 600 g/mol verbesserte das Ergebnis nicht. Es konnte keine Fluoreszenz festgestellt werden und die optischen und mechanischen Eigenschaften des Systems zeigten wieder klar auf, dass keine nennenswerte Diffusion vorhanden war.

Der Polymerblend der bisher zum Einsatz kam, setzte sich zu 70% aus dem hochmolekularen und zu 30% aus dem niedermolekularen Polymer zusammen. Die durchgeführten Messreihen belegen, dass die beschichteten Fasern bzw. Teile der Fasern nicht in dem notwendigen Umfang rausgelöst werden können und somit nicht in der Lage sind durch die Membran zu diffundieren. Aufgrund der viel besseren Wasserlöslichkeit des niedermolekularen PEO wurden Vorversuche durchgeführt, in denen festgestellt werden sollte, in wie weit der Anteil des niedermolekularen Polymers gesteigert werden kann. Es zeigte sich, dass bei einer Steigerung des Gesamtpolymergehalts in der Lösung von 6 wt% auf 12 wt% ein Verhältnis von 30 zu 70 von PEO 900.000 zu 1.000 sehr gut zu verspinnen ist. Fasermatten dieses Systems wurden mit PPX-beschichtet, in eine Pufferlösung gelegt und Fluoreszenzmessungen an ihr durchgeführt. Das Resultat der Untersuchungen war eindeutig negativ. Die Steigerung des kleinen Polymeranteils zeigte keine Wirkung.

Nachdem in den vorigen Versuchsreihen gezeigt wurde, dass Veränderungen an den Faktoren Molekülgröße und Verhältnis der Polymere nicht zu dem gewünschten Ergebnis führt, wurde im nächsten Schritt ein weiterer Parameter, der entscheidenden Einfluss auf das Diffusionsverhalten des Systems hat, variiert. Die

Dicke der Membran wurde sukzessiv vermindert. Trotz einer Absenkung der Schichtdicke auf zuerst 360 nm und in einer weiteren Messreihe auf 185 nm konnten keine Verbesserungen gegenüber den ersten Experimenten festgestellt werden.

Nachdem die Veränderungen an dem Trägermaterial und der Membran nicht den gewünschten Erfolg brachten, wurde durch Variation der externen Bedingungen versucht die Permeation des kleinen PEO durch die PPX-Membran zu ermöglichen. Dafür wurde das beschichtete Fasersystem nicht mehr wie es bisher geschah bei Raumtemperatur in eine Pufferlösung gelegt, sondern die Pufferlösung aufgeheizt und in ein Ultraschallbad gegeben. Um eine Denaturierung des GFPs zu verhindern, konnte eine Temperatur von 40 °C nicht überschritten werden. Die Fasermatte wurde in unregelmäßigen Abständen der Lösung entnommen und Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die Versuchsreihe wurde nach einem Zeitraum von 15 Stunden beendet, weil keine Auswirkungen auf das System festgestellt werden konnten.

Die bisherigen experimentellen Untersuchungen zeigten, dass die Veränderungen an dem bestehenden Konzept nicht ausreichend sind und weitergehende Modifikationen notwendig sind.

In den Vorversuchen aus Kapitel 3.2.1.1 konnte die Permeation von PEO, der hier versponnenen Molekulargewichte, durch Membranen mit Schichtdicken von bis zu drei µm eindeutig nachgewiesen werden. Obwohl die hier verwendete Membrandicke (185 nm) eine Größenordnung unter diesem Wert liegt, diffundiert PEO nicht durch die PPX-Schicht. Berücksichtigt man den aus der Literatur bekannten, stark hydrophoben Charakter des PPX, so kann man dieses Verhalten damit erklären, dass die Permeation des PEO durch die Membran verhindert, weil die Diffusion des Wassers durch die Membran zu den Fasern hin verhindert wird und dadurch die PEO-Fasern nicht aufgelöst werden und somit das PEO nicht die PPX-Membran durchdringen kann.

Würde diese Theorie stimmen, könnte durch eine entsprechende Erhöhung der Hydrophilie auf Seiten der Fasern eine Diffusion des Wassers durch die Membran ermöglicht werden. Zur Untersuchung dieses Ansatzes wurde der zu verspinnenden Lösung Salz zugefügt, welches bildlich gesprochen, das Wasser durch die Membran

ziehen sollte. Es wurden Fasern gemäß Tabelle 3-11 hergestellt und mit 400 nm PPX-beschichtet.

Komponente	Zusammensetzung
Polymer	12 wt% wässrige PEO-Lösung Der Polymeranteil setzt sich zusammen aus: PEO 900.000 g/mol und 1000 g/mol im Verhältnis 30:70
Biomolekül	16 μ M GFP
Salz	2 wt% Natriumchlorid

Tabelle 3-11: Zusammensetzung der Elektrospinnlösung.

Wenige Sekunden nachdem dieses System in eine Pufferlösung gegeben wurde, konnte deutlich beobachtet werden, dass PEO aus dem System diffundiert und im Gegenzug diese Bereiche mit Pufferlösung gefüllt werden. Bei Anregung des Fasersystems mit 490 nm ist eine intensive Fluoreszenz mit einem Maximum bei 511 nm zu verzeichnen (Abbildung 3-52). Diese Fluoreszenzaufnahme dokumentiert, dass das GFP wie angestrebt in den Nanofasern immobilisiert vorliegt und zwar in seiner nativen Konformation. Dieses Ergebnis stellt den entscheidenden Durchbruch des Forschungsprojektes dar.

Die vollständige Umsetzung des Konzeptes ist jedoch nur erreicht, wenn nachgewiesen werden kann, dass das GFP in den Fasern über einen längeren Zeitraum immobilisiert ist und nicht aus dem System heraustreten kann. Darüber hinaus muß gezeigt werden, dass die Daten reproduzierbar sind.

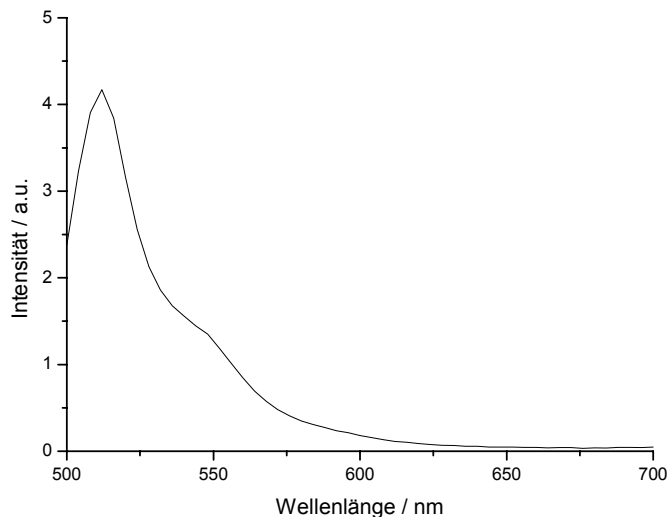


Abbildung 3-52: Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) von PPX-beschichteten Fasern mit einer Zusammensetzung gemäß Tabelle 3-11.

Die Reproduzierbarkeit des Versuchs wird durch Abbildung 3-53 belegt, welche die Daten für ein neu hergestelltes Fasersystem wiedergibt. Ein Vergleich mit den Ergebnissen des ersten Versuchs zeigt, dass die Daten bestätigt werden konnten. Des Weiteren enthält die Abbildung zwei Fluoreszenzspektren der Pufferlösung, nachdem die Fasermatte acht Minuten bzw. 1,5 Stunden in der Lösung gelegen hat. Abbildung 3-54 hebt diese Spektren noch einmal hervor. Die Daten zeigen deutlich auf, dass das Biomolekül in den Nanocontainern über einen sehr langen Zeitraum in seiner nativen Form immobilisiert vorliegt. Dieses System erwies sich auch als mechanisch sehr robust. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Matte mehrfach für kurze Zeit aus der Lösung geholt und dabei sehr stark mechanischen Belastungen durch Zusammendrücken der Matte ausgesetzt. Die Messungen zeigen, dass dies fast keinen Einfluss auf die Bioimmobilisierung hat.

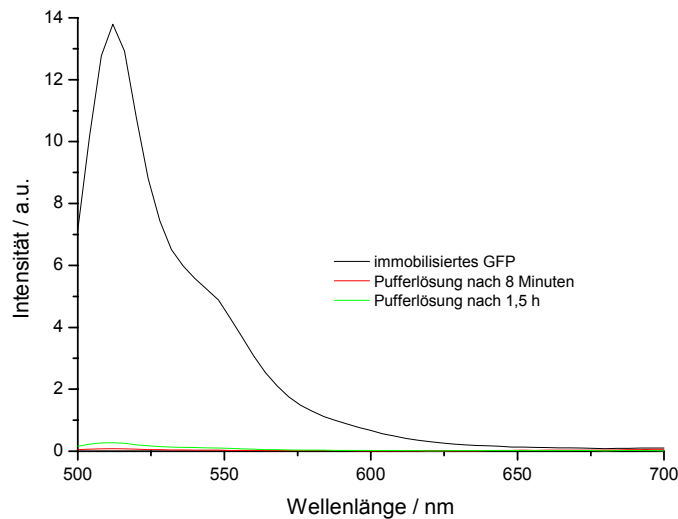


Abbildung 3-53: Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{Exc.} = 490$ nm) von immobilisiertem GFP in einer privilegierten Umgebung und Spektren der Pufferlösung in der sich die Fasermatte befunden hat.

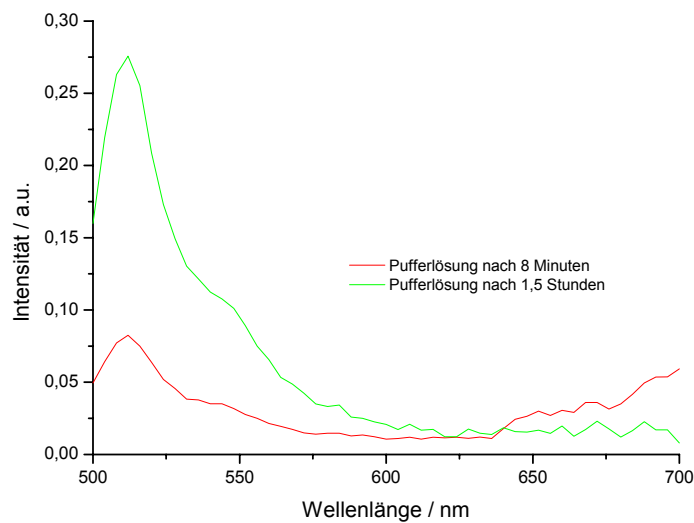


Abbildung 3-54: Fluoreszenzspektren ($\lambda_{Exc.} = 490$ nm) der Pufferlösung in der sich die Fasermatte befunden hat.

Die Fluoreszenzspektren belegen, dass das GFP immobilisiert ist und in seiner nativen Form vorliegt. Die Daten geben jedoch keine Auskunft darüber, ob das Biomolekül, wie angestrebt, in Nanofasern räumlich fixiert ist oder ob sich größere Hohlräume ausgebildet haben, die auf z.B. makroskopische Polymertropfen zurückzuführen sind. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden verschiedene mikroskopische Bilder aufgenommen.

Digitalmikroskopische Aufnahmen belegen die Ausbildung von Nanocontainern bzw. die Etablierung von größeren Hohlräumen in PPX-beschichteten PEO-Nanofasern (Abbildung 3-55). Die Aufnahmen wurden durchgeführt, nachdem das System für vier Minuten in einer Pufferlösung gelegen hat. Mittels eines Fluoreszenzmikroskops (blauer Anregungsfilter) konnten darüber hinaus Bilder (Abbildung 3-56) aufgenommen werden, die eindrucksvoll wiedergeben, dass die Immobilisierung des GFP in den Containern der elektrogesponnenen Polymernanofasern erfolgreich durchgeführt werden konnte und dass für das Protein eine privilegierte Umgebung geschaffen werden konnte.

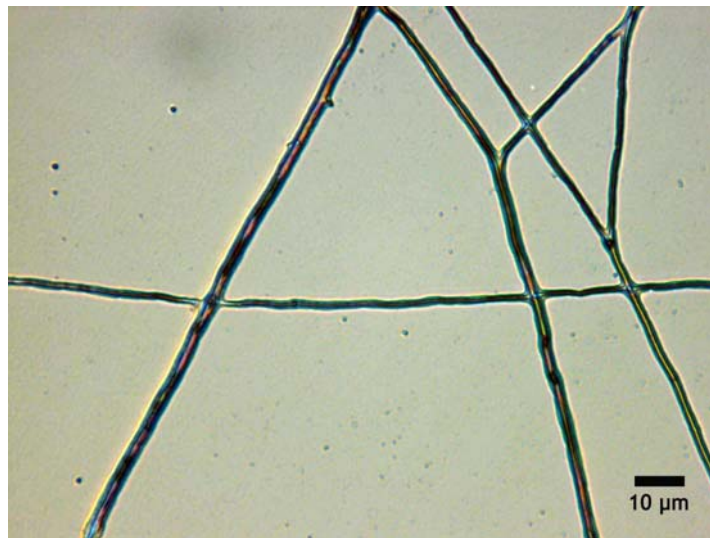


Abbildung 3-55: Digitalmikroskopische Aufnahmen PPX-beschichteter elektrogesponnener PEO-Nanofasern mit GFP als Additiv.

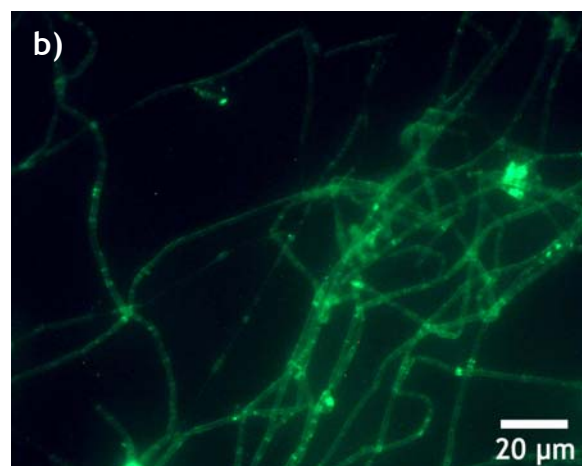
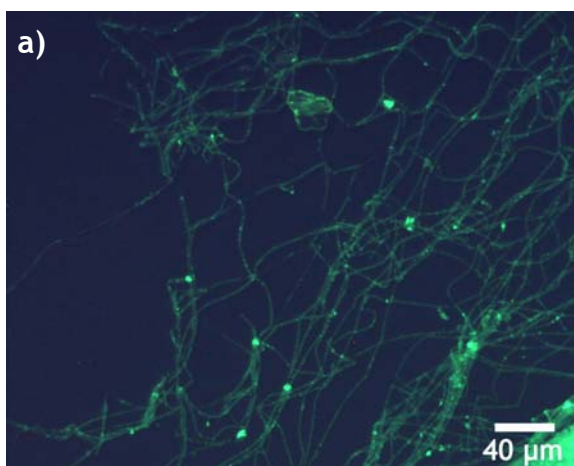


Abbildung 3-56: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (blauer Anregungsfilter) PPX-beschichteter elektrogesponnener PEO-Nanofasern mit immobilisiertem GFP. a) 200fache Vergrößerung und b) 500fache Vergrößerung.

Sensorik

Damit dieses System in der Biosensorik Anwendung finden kann, muß die Veränderung der Fluoreszenzintensität durch die Reaktion mit einem Analyten nachgewiesen werden. Die Chancen dieses Konzept als Sensorsystem oder in einem anderen Gebiet als reine Immobilisierungsmethode, wie z.B. bei der Synthese, zur Produktreife zu führen, würden deutlich gesteigert werden, wenn eine Mehrfachverwendung des eingekapselten Biomoleküls möglich wäre.

Sowohl die Biosensoraktivität als auch die Reversibilität der Denaturierungsreaktion des GFP konnte an Hand folgender Versuche gezeigt werden: Das immobilisierte GFP wurde einer 9 molaren Harnstofflösung ausgesetzt und die Fluoreszenz des Proteins über einen längeren Zeitraum verfolgt. Die Reaktion zwischen Protein und organischer Verbindung kann anhand der deutlichen Fluoreszenzabnahme des Systems belegt werden (Abbildung 3-57).

In einer weiteren Versuchsreihe konnte die Reversibilität der Denaturierung des eingekapselten Proteins nachgewiesen werden. Das Fasersystem mit GFP wurde für vier Minuten in die Harnstofflösung gegeben, ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen, anschließend für den gleichen Zeitraum in eine Pufferlösung gelegt und erneut ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Die Abnahme der Fluoreszenz durch die Reaktion mit Harnstoff auf 50% der Ausgangsintensität konnte dokumentiert werden. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität auf 93% der Ausgangsintensität, nachdem der Harnstoff durch die Pufferlösung wieder aus dem System entfernt wurde, belegt zweifelsfrei die Renaturierung des GFP (Abbildung 3-58).

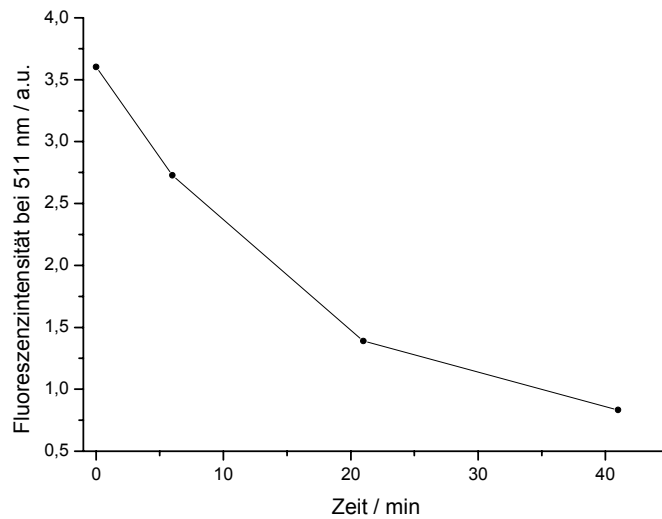


Abbildung 3-57: Verminderung der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) bei $\lambda = 511 \text{ nm}$ von immobilisiertem GFP durch die denaturierende Wirkung von 9 molarer Harnstofflösung.

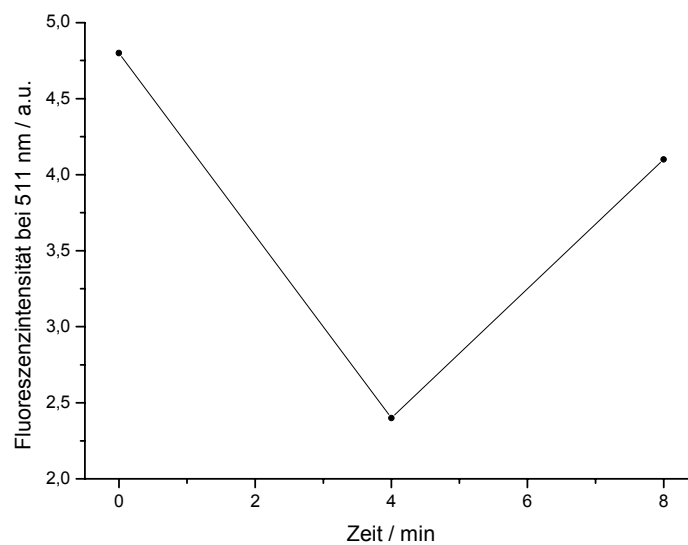


Abbildung 3-58: Verminderung der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) bei $\lambda = 511 \text{ nm}$ von immobilisiertem GFP durch die denaturierende Wirkung von 9 molarer Harnstofflösung und anschließende Renaturierung des GFP durch Entfernung des Harnstoff.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass zur weiteren Verbesserung des entwickelten Biosensors vor allem die Qualität der Fasermatten erhöht werden muß. Dazu muß die Tropfenbildung beim Spinnen der Lösung verringert werden und der Durchmesser der Nanofasern einheitlicher werden. Das nachfolgende Kapitel stellt für diese Herausforderung verschiedene Lösungsansätze vor.

Lösungsansätze zur Verbesserung der Nanofaserqualität

Wässrige PEO-Lösung ist ein extrem gut zu verspinnendes System und findet unter anderem auf Grund dessen vielfältige Anwendung in aktuellen Forschungsprojekten. Die Zugabe von Salz, die für die hier beschriebene Anwendung essentiell ist, verschlechtert den Elektrospinprozess erheblich, analog zu den auf Seite 78 beschriebenen Schwierigkeiten beim Spinnen von PEO-Fasern aus Pufferlösung. Dadurch, dass die Fasermatten nicht sehr gleichmäßig ausgebildet werden, kann nachdem die Faserplatte bewegt wurde, ein viel dünnerer bzw. viel dickerer Bereich spektroskopisch untersucht werden. Dieser Umstand zieht nach sich, dass die absoluten Werte der Fluoreszenzaufnahmen nicht sehr gut zu reproduzieren sind.

Auf dieses Problem kann unterschiedlich reagiert werden. Versuche zeigten, dass es nicht möglich ist, den Salzgehalt soweit zu senken, dass die Qualität der Fasern entscheidend verbessert wird und gleichzeitig die Diffusion des PEO noch ermöglicht wird. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Veränderungen tiefgehend sein müssen. Anstelle das Salz mit der Lösung zu verspinnen, könnte das Salz in einem nachfolgenden Prozess auf die gesponnenen Fasern aufgedampft werden und im Anschluss daran die PPX-Membran aufgebracht werden. Eine andere Möglichkeit würde darin bestehen zu testen, ob sich andere Trägermaterialien (z.B. Poly(vinylalkohol), PVA) bei Zugabe von Salz besser verspinnen lassen und dann im Folgenden auch die weiteren Anforderungen erfüllen.

Übertragung des Konzeptes

Den Abschluss dieses Forschungsprojektes stellen Versuche dar, die die Übertragung des Konzeptes 1.) auf eine andere Art der Immobilisierung und 2.) auf andere Biomoleküle thematisieren.

In Kapitel B.I. wurde das Co-Elektrospinn-Verfahren vorgestellt. Bei dieser Methode werden zwei Lösungen gleichzeitig verarbeitet, mit dem Resultat einer Nanofaser bestehend aus einem Kern, der von einer Schale umschlossen ist. Bei geschickter Wahl der Komponenten sollte es möglich sein, dass Biomolekül im Kern einer Faser zu fixieren. Für die Umsetzung dieses Anliegens wurde eine 10 wt% Polycarbonatlösung ($M_w=64.000$ g/mol, Lösungsmittel Dichlormethan) und eine 150 μ M GFP-Lösung ausgewählt und mit dem Co-Elektrospinn-Verfahren verarbeitet. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Herrn Roland Dersch (AG Wendorff, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Abbildung 3-59 b)) belegen eindrucksvoll die Immobilisierung des GFP im Kern einer Polycarbonatfaser. Offensichtlich befindet sich das GFP in einer privilegierten Umgebung.

Damit diese Methode Anwendung finden könnte, wären intensive Forschungsarbeiten notwendig, die eine Verbesserung des Co-Elektrospinn-Verfahrens anstreben würden. Derzeit ist es noch nicht möglich qualitativ hochwertige Fasern in ausreichender Menge zu produzieren, so dass dieses Verfahren derzeit nicht dem auf PPX-PEO-Fasern basierenden Verfahren vorzuziehen ist.

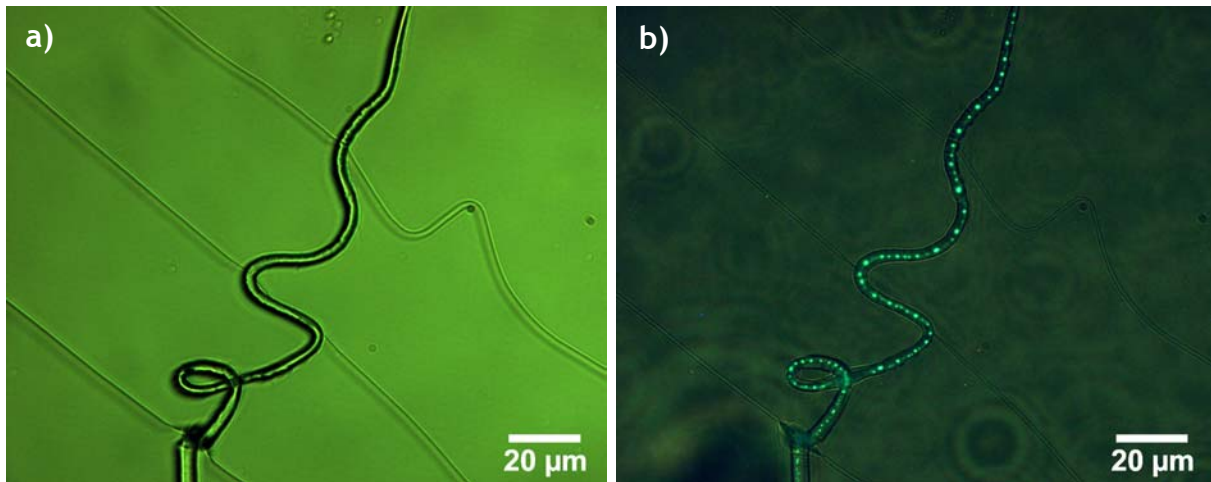


Abbildung 3-59: Co-gesponnene Polycarbonatfaser mit immobilisiertem GFP im Kern der Faser. a) optisches Mikroskop und b) Fluoreszenzmikroskop (blauer Anregungsfilter).

In weiteren Arbeiten wurde von der Nanofaser als beschränkendes Element abgewichen und eine völlig andere Umgebung zur Immobilisierung gewählt.

Nanofilter aus Aluminiumoxid der Firma Whatman wurden als Matrix verwendet (Abbildung 3-60 a)). Die Poren der Filter (Abbildung 3-60 b)) mit einem Durchmesser von circa 50 nm dienen in diesem Fall zur Einkapselung der Biomoleküle. Die SEM-Aufnahmen aus Abbildung 3-60 und 3-66 wurden freundlicherweise von Frau Stefanie Schlitt (AG Wendorff, Philipps-Universität Marburg) angefertigt.

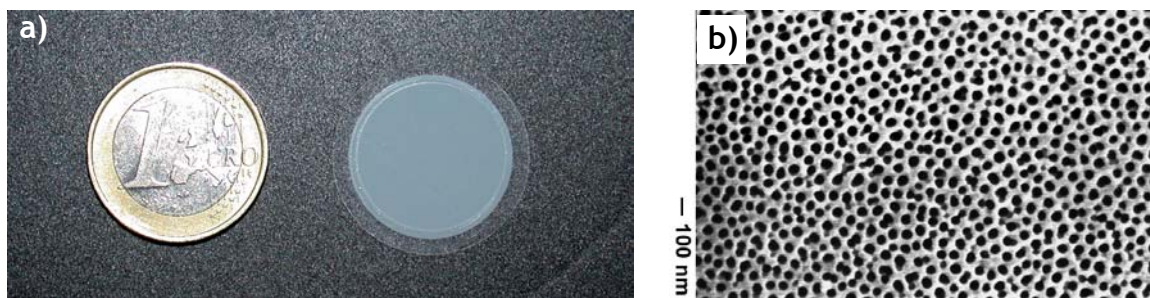


Abbildung 3-60: a) Bild einer Whatman-Membran und eines ein-Euro-Stückes. b) SEM-Bild einer Whatman-Membran.

Abbildung 3-61 erläutert schematisch den Ablauf des Immobilisierungskonzeptes, der nur geringfügig von dem Verfahren unter Verwendung von Nanofasern abweicht.

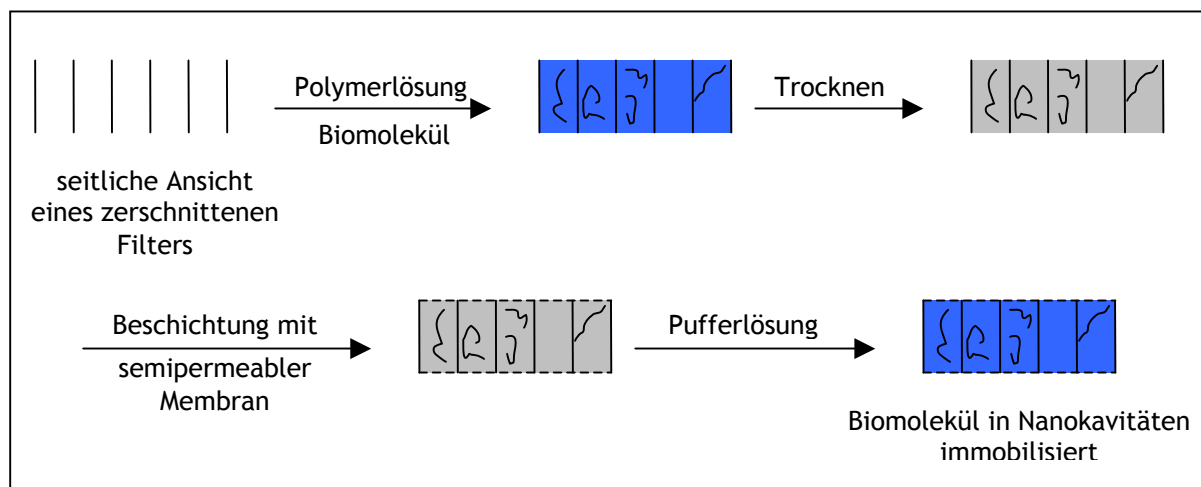


Abbildung 3-61: Konzept zur Immobilisierung eines Biomoleküls in einer privilegierten Umgebung in Nanoporen.

Die Whatman-Membran wird für einige Minuten in eine hochviskose wässrige Lösung, bestehend aus PEO 1000 und GFP gelegt, bis diese vollständig mit der Lösung benetzt ist. Nachdem die befüllte Membran an der Luft getrocknet ist, wird sie mit einem PPX-Film beschichtet und abschließend in eine Pufferlösung gelegt. Das PEO 1000 löst sich in der Pufferlösung innerhalb weniger Minuten und diffundiert durch die PPX-Membran. Das GFP ist auf Grund seiner Größe nicht in der Lage die PPX-Membran zu durchdringen, mit dem Ergebnis, dass das Biomolekül in Nanocontainern in einer fluiden Matrix immobilisiert vorliegt. Warum das PEO in diesem Fall, im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Fasermmodell, ohne die Zugabe von Salz in der Lage ist, durch die PPX-Membran zu diffundieren, kann verschiedene Gründe haben. Die Darstellung von Nanofasern erfordert einen PEO-Blend mit einem Anteil an sehr hohem Molekulargewicht (PEO 900.000 g/mol), welches schwer wasserlöslich ist. Bei dem hier verwendeten Verfahren kommt hingegen nur das deutlich besser wasserlösliche PEO 1000 zum Einsatz, so dass eine deutlich geringere Wassermenge ausreichend ist, um die Diffusion des PEO zu ermöglichen. Diese geringen Wassermengen können zudem noch in dem System vorhanden sein, da bei der Präparation das wässrige PEO/GFP-Gemisch nicht vollständig getrocknet sein könnte und sich dadurch noch Wasser im Inneren des Systems befinden kann.

Die experimentelle Realisierung dieses Konzeptes wurde mit den Spezifikationen in Tabelle 3-12 durchgeführt. Die Dicke der aufgetragenen PPX-Schicht betrug 440 nm.

Komponente	Zusammensetzung
Polymer	57,9 wt% wässrige PEO 1000 Lösung
Biomolekül	27 μ M GFP

Tabelle 3-12: Zusammensetzung der Polymer-GFP-Lösung zur Bioimmobilisierung in einer Whatman-Membran.

Nachdem das System für 167 Minuten in einer Pufferlösung lag, wurde das in der Membran immobilisierte GFP angeregt, um festzustellen, ob das Biomolekül in seiner nativen Konformation vorliegt. Die Fluoreszenzintensität von circa 1,3 bei 511 nm belegt dies eindeutig. Nach der ersten Messung wurde die Pufferlösung gegen eine 0,5 molare Harnstofflösung ausgetauscht. Die denaturierende Wirkung des Agens lässt sich deutlich an den Messwerten belegen, die Wirkung tritt jedoch erst nach einer längeren Expositionszeit ein (Abbildung 3-62). Dies ist zum Einen auf die sehr geringe Konzentration des Harnstoffs und zum Anderen auf die Kompaktheit des Systems zurückzuführen. Im Vergleich zu Nanofasern ist die Oberfläche bei diesem System um einige Größenordnungen kleiner, weil hier nur die Stirnflächen der Membran für die Diffusion zur Verfügung stehen und nicht wie bei einer Faser die gesamte Oberfläche. Dadurch werden im Mittel die Wege deutlich länger, wodurch die Empfindlichkeit des Sensorsystems erheblich minimiert wird.

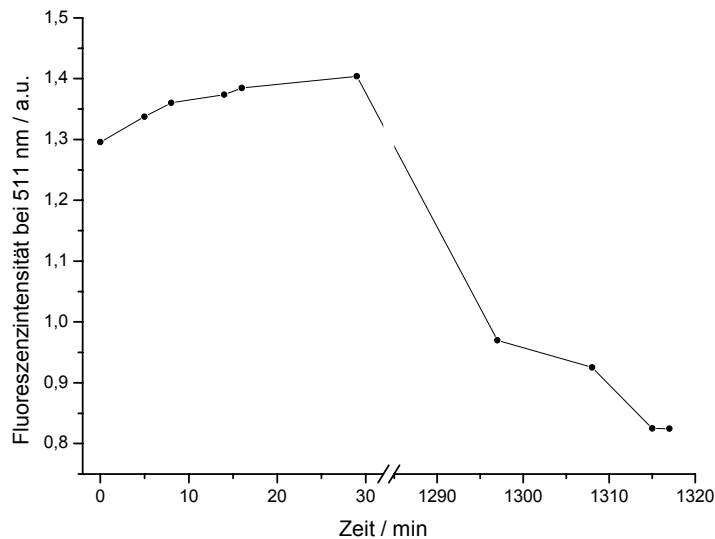


Abbildung 3-62: Verminderung der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{Exc.}} = 490 \text{ nm}$) bei $\lambda = 511 \text{ nm}$ von immobilisiertem GFP durch die denaturierende Wirkung von 0,5 molarer Harnstofflösung.

Weitere Versuche verdeutlichen diese längeren Wege sehr anschaulich. Abbildung 3-63 gibt die Fluoreszenzintensitäten bei 511 nm für den Wechsel von Wasser auf 5 molare Harnstofflösung und den erneuten Wechsel auf Wasser wieder. Gemäß dem Konzept muß durch den Austausch von Harnstofflösung gegen Wasser das System eine Steigerung der Fluoreszenz zeigen und bei dem umgekehrten Wechsel von Wasser auf Harnstoff eine Erniedrigung der Fluoreszenz. In dem durchgeführten Experiment ist aber scheinbar der genau gegenteilige Fall zu beobachten, was damit begründet werden kann, dass die Diffusion des Harnstoffs in bzw. aus diesem kompakten System einen erheblichen Zeitraum in Anspruch nimmt und sich somit der Austausch erst stark verzögert in den Messwerten niederschlägt.

Insgesamt kann man festhalten, dass eine Reaktion zwischen immobilisiertem Sensormolekül und Analyten eintritt und die Renaturierung des Biomoleküls zu erreichen ist. Die Ergebnisse zeigen jedoch weiterhin, dass unter den verwendeten Spezifikationen die Zeit, die verstreicht bis die Sensorreaktion eintritt, für die praktische Anwendung viel zu groß ist.

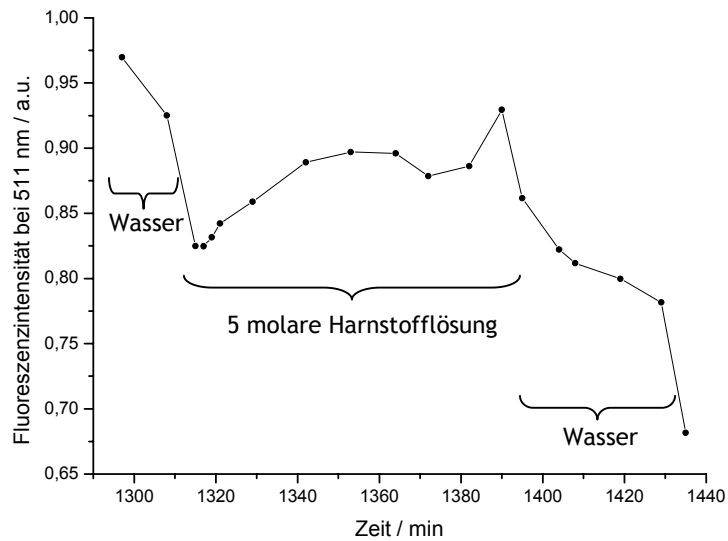


Abbildung 3-63: Fluoreszenzintensität ($\lambda_{Exc.} = 490 \text{ nm}$) bei $\lambda = 511 \text{ nm}$ von immobilisiertem GFP in einer Whatman-Membran. Denaturierung und Renaturierung von GFP.

Würde der Faktor Zeit bei einer Anwendung jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielen, so könnten durch einen Wechsel von der Whatman-Membran zu z.B. hochgeordneten Silizium-Templaten neue herausragende Anwendungen erschlossen werden. Die zur Verfügung stehende Oberfläche wäre in diesem Fall immer noch geringer als bei Nanofasern, dafür stehen jedoch Nanocontainern mit exakt definierter Größe und Abständen zueinander zur Verfügung. Abbildung 3-64 zeigt eine SEM-Aufnahme eines solchen Templats. Reaktionen in diesen Nanocontainern könnten mit Hilfe der optischen Nahfeldmikroskopie (scanning near-field optical microscopy, SNOM) beobachtet werden. Diese spektroskopische Methode zeichnet sich dadurch aus, dass mit ihr eine extrem hohe Ortsauflösung erzielt wird, indem eine submikroskopische Strahlungsquelle in Form einer so genannten Nahfeldsonde im Abstand weniger Nanometer rasterförmig über die Probenoberfläche bewegt wird.

Dieser Ausblick zeigt erneut das enorme Entwicklungspotential in dem Bereich der Bioimmobilisierung im Nanometermaßstab auf.

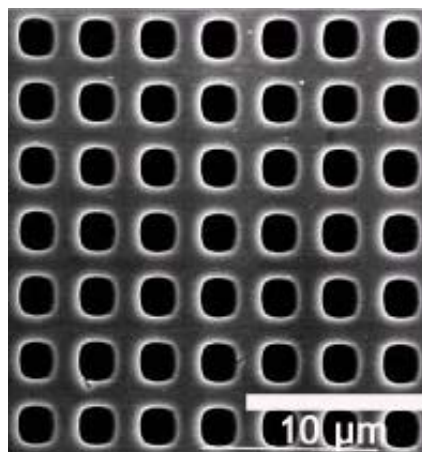
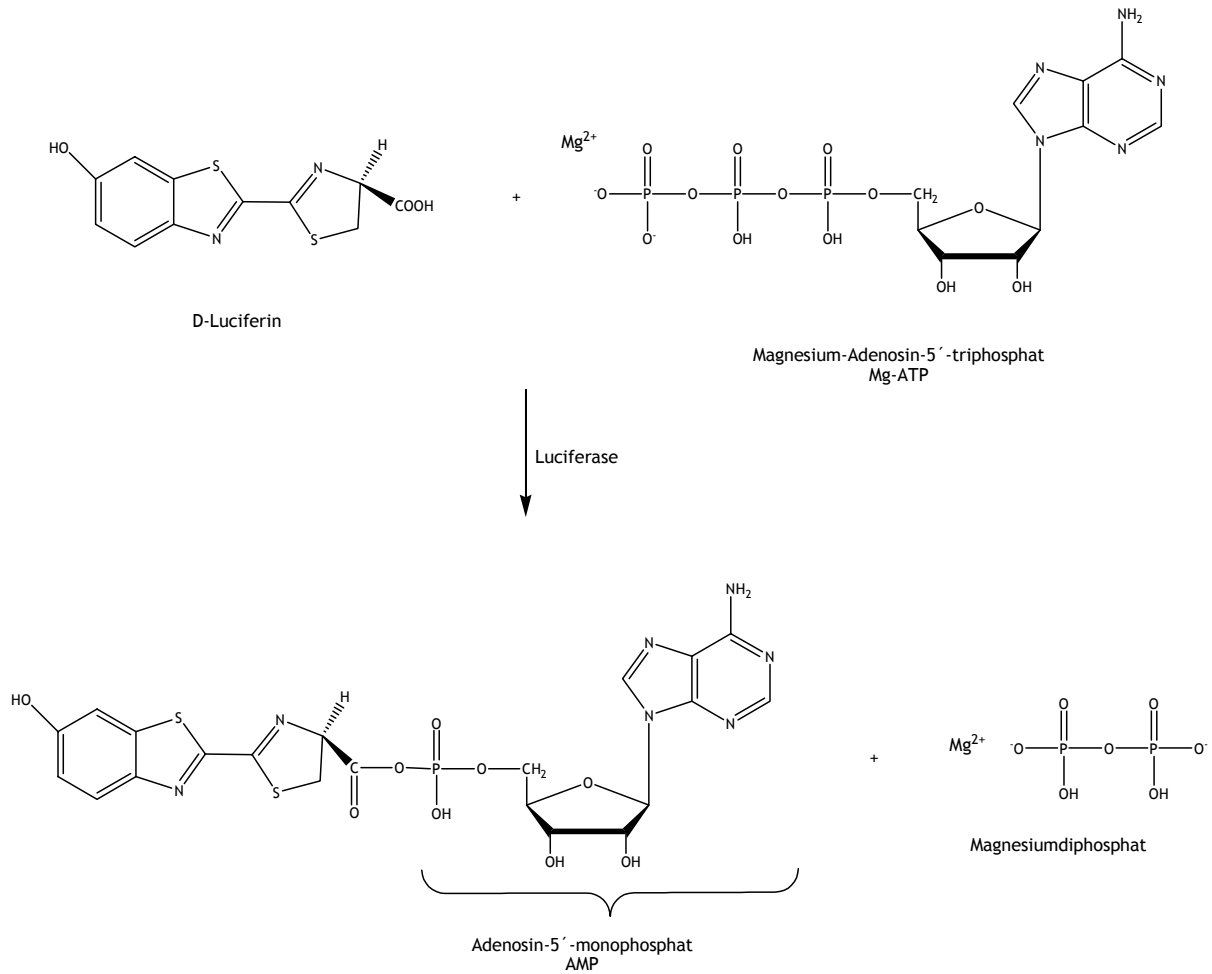


Abbildung 3-64: SEM-Aufnahme eines hochgeordneten Silizium-Templats.

Übertragung des Konzeptes auf ein anderes Biomolekül

Die erfolgreichen Experimente mit GFP als Biomolekül waren Anlass dazu die Übertragbarkeit des Konzeptes auf eine andere biologische Verbindung zu untersuchen. Für diese Versuche wurde die Reaktion von Luciferin mit Luftsauerstoff untersucht, die zu einer Biolumineszenz im gelb-grünen Wellenlängenbereich führt. Für diese Reaktion ist die katalytische Wirkung eines Enzyms, der Luciferase, essentiell. Bezug nehmend auf die experimentellen Daten die für GFP gewonnen wurden, sind die Größen von Luciferin mit einem Molekulargewicht von 280,32 g/mol und Luciferase mit einem Molekulargewicht von circa 62 000 g / mol ausreichend klein, um die PPX-Membran zu durchdringen bzw. groß, um in der PPX-Membran immobilisiert zu werden. Der genaue Reaktionsablauf ist schematisch in Abbildung 3-65 wiedergegeben. Die Komplexbildung von Magnesiumchlorid mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) führt zu Mg-ATP welches mit Luciferin unter Abspaltung von Magnesiumdiphosphat zu Luciferyl-Adenosin-5'-monophosphat (Luciferyl-AMP) reagiert. Luciferase dient sowohl in dieser als auch in der nachfolgenden Reaktion von Luciferyl-AMP mit Luftsauerstoff zu angeregtem Oxyluciferin als Katalysator. Die Gesamtreaktion wird durch die Auflösung des Enzym-Substrat-Komplexes und den Übergang des angeregten Oxyluciferin in den Grundzustand unter Emission von gelb-grünem Licht abgeschlossen [182, 183].

1. Luciferase-katalysierte Reaktion von D-Luciferin mit Mg-ATP.



2. Luciferase-katalysierte Reaktion von Luciferyl-AMP mit Sauerstoff.

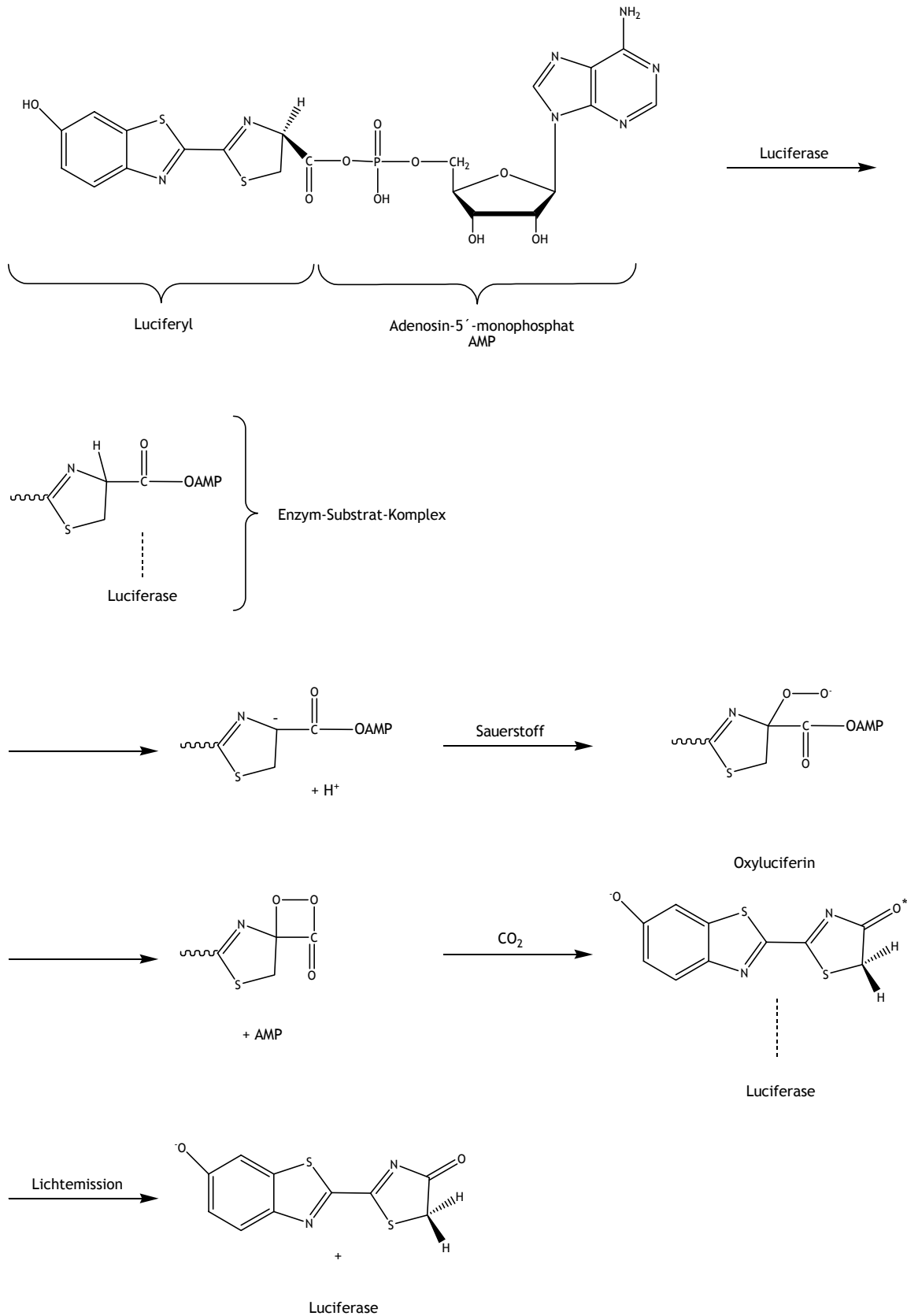


Abbildung 3-65: Reaktion von Luciferin mit Sauerstoff unter enzymatischer Katalyse durch Luciferase.

In einem ersten Schritt wurde eine Lösung gemäß Tabelle 3-13 angesetzt und die entstehende Biolumineszenz gemessen. Das Spektrum in Abbildung 3-66 zeigt in Übereinstimmung mit den Literaturdaten [183] eine intensive Lumineszenz zwischen 500 und 700 nm, mit einem Maximum bei 556 nm.

Konzentration	Substanz
0,1 mM	Luciferin
0,2 μ M	Luciferase
2,0 mM	Adenosin-5'-triphosphat
10 mM	Magnesiumchlorid
	Tris Puffer pH 7,7

Tabelle 3-13: Zusammensetzung der Lösung für die Luciferase-katalysierte Reaktion zwischen Luciferin und Sauerstoff.

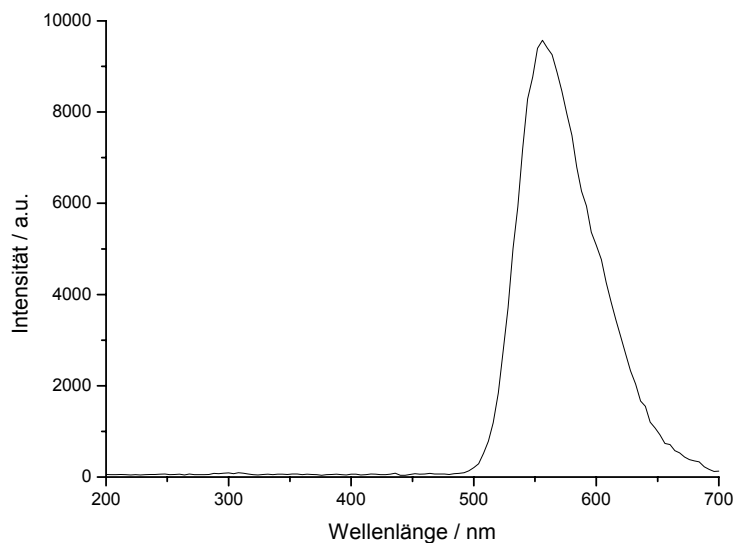


Abbildung 3-66: Biolumineszenz der Luciferase-katalysierten Reaktion zwischen Luciferin und Sauerstoff.

In einem nächsten Schritt sollte die Reaktion in Nanofasern durchgeführt werden. Dafür wurde Luciferase in PEO-Nanofasern immobilisiert, durch Verspinnen einer Lösung mit der Zusammensetzung gemäß Tabelle 3-14. Die Fasern wurden mit einer 490 nm dicken PPX-Schicht versehen.

Komponente	Zusammensetzung
Polymer	12 wt% wässrige PEO-Lösung Der Polymeranteil setzt sich zusammen aus: PEO 900.000 g/mol und 1000 g/mol im Verhältnis 30:70
Biomolekül	1,6 µM Luciferase
Salz	1,8 wt% Natriumchlorid

Tabelle 3-14: Zusammensetzung der Elektrospinnlösung.

Dieses Gesamtsystem wurde in eine Pufferlösung gelegt, wodurch die Diffusion des PEO 1000 durch die PPX-Membran ermöglicht wurde. Nach einer Verweilzeit von 15 Minuten in der Pufferlösung wurden die Fasermatten aus der Lösung geholt, mit Pufferlösung abgespült und eine Luciferin-Lösung auf die Matten getropft (Zusammensetzung laut Tabelle 3-13 ohne Luciferase). Trotz mehrfacher Wiederholung dieses Versuchs konnte keine Biolumineszenz detektiert werden.

Die Gründe dafür können vielfältig sein. Neben dem gesamten Fragenkatalog, der sich bei den Versuchen mit GFP gestellt hat, treten hier neue kritische Faktoren auf. Im Vergleich zu GFP liegt keine intrinsische Lumineszenz vor, sondern die Lumineszenz entsteht erst durch eine komplexe Reaktion, so dass deutlich mehr Parameter, wie z.B. die richtige Konzentration der beteiligten Parameter, berücksichtigt werden müssen.

In den vorhergehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass das angestrebte Immobilisierungskonzept erfolgreich auf GFP anzuwenden ist. Prinzipiell spricht somit nichts gegen eine Übertragung dieses Konzeptes auf andere Biomoleküle, wenn diese über eine ausreichende Stabilität gegenüber den Versuchsbedingungen verfügen. In gezielten Versuchsreihen muß dieses Konzept jedoch für jedes neue System optimiert werden.

4. Eingesetzte Chemikalien und Biomoleküle

Das eingesetzte GFP wurde von Herrn Thomas Kurpiers (Arbeitskreis Dr. Henning Mootz, Universität Marburg) nach folgender Vorschrift dargestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Biomoleküle und Chemikalien wurden gekauft und eingesetzt wie erhalten.

Biomoleküle

Das eGFP (enhanced green fluorescent protein) wurde mit einer kurzen Peptidsequenz (Aminosäuren CFFKDEL + Restriktionsschnittstelle für KpnI, entspricht GT) in den Vektor pET22b kloniert und besitzt somit einen C-terminalen His6-tag. Das fertige Plasmid pTK024 wurde dann mit dem E. coli Stamm BL21 transformiert. Für die Proteingewinnung wurde das Gen in E. coli (über-)exprimiert. Dazu wurde 600 mL LB-Medium mit 6 mL (1:100) einer Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer optischen Dichte von 0.7 bei 250 rpm und 37 °C wachsen gelassen. Danach wurde die Expression durch Zugabe von 0.4 mM IPTG induziert und dann ließ man die Zellen für 3-4 Stunden bei 30 °C das Protein produzieren. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (7000 rpm, 20 min) abgetrennt, in Lysepuffer resuspendiert (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0), mit einer French Press, bzw. mit einem Emulsifier aufgeschlossen und die lösliche Fraktion durch erneute Zentrifugation von den unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt (30 min, 17000 rpm). Danach folgte die Reinigung mithilfe der Ni-NTA-Chromatographie. Dazu wurde der Überstand der Zentrifugation drei Mal auf eine vorher äquilibrierte 2 mL Ni-NTA-Säule gegeben. Anschließend wurde mit dem zehnfachen Säulenvolumen mit Auftragungspuffer gewaschen (50 mM Tris, 300 mM NaCl, 5mM Imidazol, pH 8,0), dann mit dem fünffachen Säulenvolumen Waschpuffer 1 (wie zuvor nur mit 20 mM Imidazol) dann mit drei Säulenvolumen Waschpuffer 2 (wie zuvor nur + 40 mM Imidazol). Das Protein wurde schließlich mit Elutionspuffer (wie zuvor nur + 250 mM Imidazol) eluiert. Der letzte Schritt war die Dialyse gegen PBS-Puffer (10-20 mM Phosphat, 150 mM NaCl, 2-5 mM DTT, 10% Glycerin). Anschließend konnte das Protein zum weiteren Gebrauch bei -80 °C weggefroren werden.

Eingesetzte Chemikalien und Biomoleküle

Adenosin-5´-Triphosphat Dinatriumsalzhydrat	Fluka
D-Luciferin Natriumsalz	Fluka
Luciferase aus Glühwürmchen, Pulver, lyophilisiert	Fluka
Paracyclophane	SCS International
Wasser-d ²	Deutero GmbH, 99,9 %
Chloroform-d ¹	Deutero GmbH, 99,8 %
Chloroform	Merck, 99,8 %
Methanol	Merck, 99,8 %
Harnstoff	Fluka
Natriumchlorid	Merck
Poly(ethylenoxid)	Acros M _w : 200 g/mol 900.000 g/mol Merck M _w : 2000 g/mol Fluka M _w : 1000g/mol 3000 g/mol 4000 g/mol 6000 g/mol

5. Instrumenteller Teil

5.1 Experimenteller Aufbau und Auswertung der Permeationsversuche

5.1.1 Experimenteller Aufbau

Zur experimentellen Bestimmung der Diffusionskoeffizienten wurden Kammern mit den Abmessungen 4 x 3,75 x 5 cm und einer Wandstärke von 0,5 cm eingesetzt. Das eingesetzte Lösungsmittel war ausschlaggebend für die Auswahl des Kammermaterials. Experimente mit Chloroform-d¹ wurden in Aluminiumkammern durchgeführt, der Einsatz von deuteriertem Wasser sah die Verwendung von Poly(oxymethylen) Kammern vor. Die Kammern waren nach oben hin mit einem Deckel verschließbar und zu einer Seite mit einem 2 cm großen kreisförmigen Loch versehen, die einen kontrollierten Materietransport ermöglichten. Vor diese Öffnung wurde eine Polymermembran gespannt, welche von zwei fluorierten Gummidichtungen umfasst war. Über Schraubverbindungen wurden zwei Kammern gegeneinander zu einem Doppelkammersystem fixiert (Abbildung 5-1).

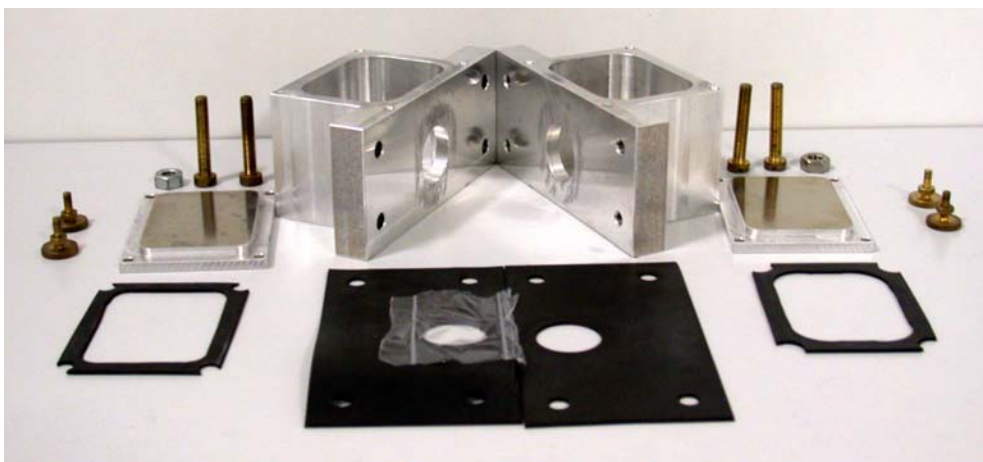
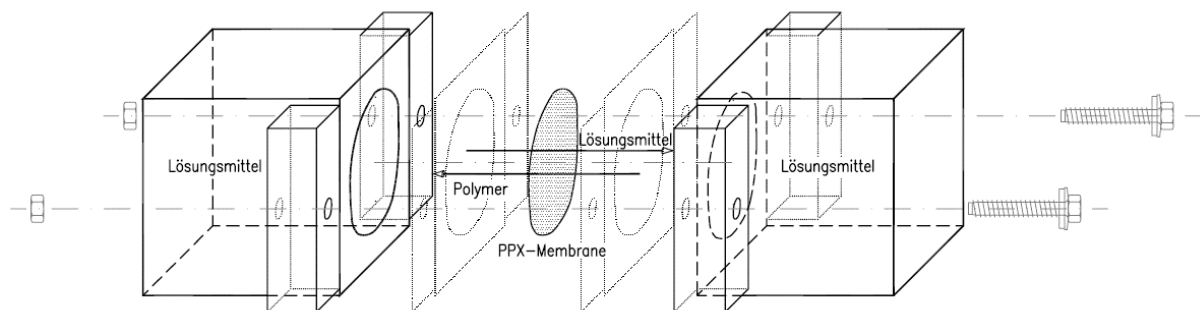


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung und Bild des experimentellen Aufbaus zur Durchführung der Permeationsversuche.

Beide Kammern wurden mit 60 mL des deuterierten Lösungsmittels und einem internen Standard für die Durchführung der NMR-Versuche befüllt. Experimente mit Chloroform-d¹ wurden auf Chloroform als Standard und Versuche mit deuteriertem Wasser auf Methanol bezogen. Insgesamt sollte das Volumen des internen Standards pro Kammer immer 1 mL betragen, so dass die Lösungsmittelqualität des Chloroform-d¹ beachtet werden musste, weil immer von geringen Verunreinigungen durch Chloroform auszugehen ist. Kammer eins wurde nur mit dem Lösungsmittelgemisch befüllt, Kammer zwei mit dem Lösungsmittelgemisch, in dem 10 wt% Poly(ethylenoxid) gelöst war.

Dem zeitgleichen Befüllen der beiden Kammern mit den Lösungen folgte in bestimmten Zeitintervallen die Probennahme für NMR-Untersuchungen in Kammer eins. Der nächste Teilabschnitt gibt Aufschluß darüber, wie aus den NMR Daten die permeierte Polymermenge bestimmt wurde und basierend auf diesen Daten der Diffusionskoeffizient.

5.1.2 Auswertung der Daten

Die permeierte Polymermenge wird über das Molekulargewicht des eingesetzten Polymers, welches bekannt ist, und die Konzentration des PEO bestimmt.

$$(5-1) \quad m(\text{PEO}) = M(\text{PEO}) \cdot c(\text{PEO}) \cdot V$$

m: Masse
M: Molekulargewicht
c: Konzentration
V: Volumen

Die PEO-Konzentration in der jeweiligen Probe wird mittels der NMR Daten bestimmt.

$$(5-2) \quad c(\text{PEO}) = c(\text{st}) \frac{I(\text{PEO}) \cdot N_p(\text{st})}{I(\text{st}) \cdot N_p(\text{PEO})}$$

st: interner Standard
I: Peak Integral (NMR)
N _p : Protonenanzahl

Die Protonenanzahl für Methanol als internen Standard reduziert sich für die Berechnungen auf drei, weil nur das Signal für die Methyl Gruppe integriert wurde. Die Protonenanzahl des PEO ist gegeben durch:

$$(5-3) \quad N_p(\text{PEO}) = \frac{M(\text{PEO})}{m(\text{ru})} N_p(\text{ru}) \quad .$$

$m(\text{ru})$: Masse der Repetiereinheit
 $N_p(\text{ru})$: Protonenanzahl pro Repetiereinheit

Eine Auftragung der aus NMR Untersuchungen bestimmten Masse an permeiertem Polymer gegen die Zeit ist beispielhaft in Abbildung 5-2 dargestellt. Charakteristisch für den Verlauf eines solchen Permeationsexperimentes ist das Auftreten von drei Abschnitten: der Induktionsphase folgt ein linearer Anstieg, der in eine Sättigung übergeht. Diese drei Phasen geben Aufschluß über unterschiedliche Prozesse während des Versuches und ermöglichen darüber hinaus eine indirekte Bestimmung des Diffusionskoeffizienten.

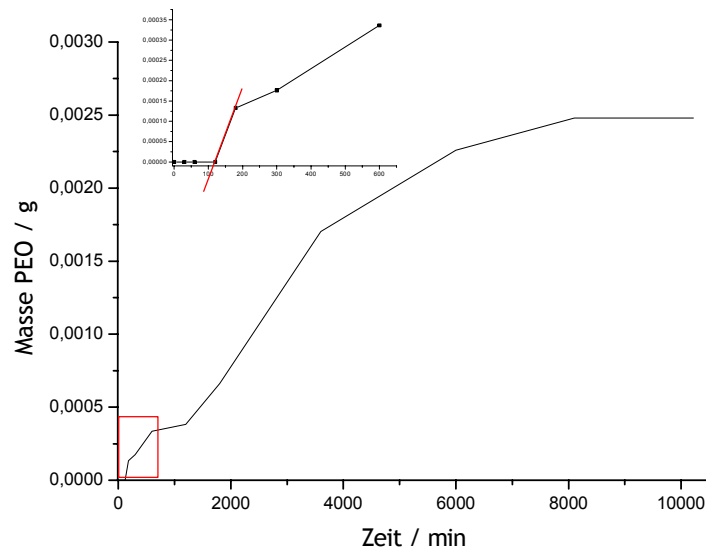


Abbildung 5-2: Permeation von PEO 1000 ($M_w = 1000 \text{ g/mol}$) durch eine $1,3 \mu\text{m}$ dicke PPX-Membran unter Verwendung von Chloroform als Lösungsmittel.

Der Induktionsphase wird die Adsorption des PEO auf der Membran, die Diffusion durch die Membran und die Desorption auf der anderen Membranseite zugeschrieben. Dieser Prozeß nimmt eine bestimmte Zeit in Anspruch, im Folgenden als Verzögerungszeit t' bezeichnet. Gemäß FICK (1. FICKsches Gesetz 5-4) lässt sich die Bewegung der Teilchen durch die Membran als Änderung der Teilchendichte in Abhängigkeit von der Konzentrationsdifferenz über die Membrandicke, dem Konzentrationsgradienten, beschreiben [76].

$$(5-4) \quad J = D \frac{(C_1 - C_2)}{x}$$

J: Teilchenstromdichte
 D: Diffusionskoeffizient
 x: Membrandicke
 C_{1/2}: Konzentration am Anfang bzw. am Ende der Membran

Die Detektion der Permeanden innerhalb der Membran am Anfang bzw. am Ende ist jedoch nicht möglich, erst nach dem Austritt des Permeanden auf der anderen Membranseite ist dessen Bestimmung möglich bzw. bevor er überhaupt erst in die Membran eingedrungen ist. Diesem Sachverhalt wird durch die Definition von externen Konzentrationen $c_{1/2}^{ext}$ Rechnung getragen, die einen Zusammenhang zwischen der Konzentration in der Membran und dem Sorptionskoeffizienten S geben [76].

$$(5-5) \quad c_1^{ext} = \frac{C_1}{S} \quad \text{und} \quad c_2^{ext} = \frac{C_2}{S}$$

$c_{1/2}^{ext}$: Konzentration vor bzw. hinter der Membran
 S: Sorptionskoeffizient

Eine Verknüpfung von (5-5) mit (5-4) führt zu

$$(5-6) \quad J = D \cdot S \frac{\Delta c^{ext}}{x} .$$

Durch das Einbringen des Sorptionskoeffizienten wird der Vorgang der Permeation vollständig beschrieben.

$$(5-7) \quad P = D \cdot S$$

P: Permeationskoeffizient

Der Vorgang der Permeation wird mit der Desorption aus der Membran abgeschlossen, was gleichzeitig das Ende der Induktionsphase darstellt. Ein linearer Anstieg der Masse mit der Zeit ist die Folge, welcher bei dem Erreichen des Konzentrationsausgleiches zwischen den beiden Kammern in eine Sättigung übergeht. Ab diesem Zeitpunkt herrscht ein dynamisches Gleichgewicht vor. Bei dem ersten FICKschen Gesetz wird angenommen, dass das Konzentrationsgefälle konstant groß bleibt, so dass das Gesetz nur für den linearen Anstieg Gültigkeit besitzt. Dem Übergang in die Sättigung ist jedoch zu entnehmen, dass offensichtlich ein Absinken des Konzentrationsgefälles mit der Zeit eintritt. Die

Beschreibung dieses sich mit der Zeit veränderten Zustands gelingt mit dem zweiten FICKschen Gesetz (5-8).

$$(5-8) \quad \frac{dc(\text{PEO})}{dt} = D \left(\frac{d^2c(\text{PEO})}{dx^2} \right)$$

t: Zeit

Die Lösung dieser Differentialgleichung gibt einen Zusammenhang zwischen permeierter Masse in Abhängigkeit von der Zeit und dem Diffusionskoeffizienten an.

$$(5-9) \quad m = \frac{Dc_1^{\text{ext}}}{x} \left(t - \frac{x^2}{6D} \right)$$

Der Schnittpunkt einer Sekante mit der Zeitachse, die an den linearen Teil des Kurvenverlaufs angelegt wird (Abbildung 5-2 rote Gerade), gibt die Verzögerungszeit t' wieder, welche es ermöglicht über (5-10) den Diffusionskoeffizienten D zu bestimmen [76].

$$(5-10) \quad D = \frac{x^2}{6t'}$$

t' : Verzögerungszeit

5.2 Optischer Aufbau

Die spektroskopischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit einem optischen Aufbau durchgeführt, der von Dr. Armin Bayer während seiner Promotion entworfen und aufgebaut wurde. Mit Hilfe von Herrn Dr. Ralf Wombacher und Herrn Frommknecht (Elektronikwerkstatt der Universität Marburg) wurde dieser Aufbau stark verbessert, unter besonderer Berücksichtigung der Reproduzierbarkeit der Spektren.

Durch die offene Bauweise des optischen Aufbaus weist dieser gegenüber kommerziellen Geräten sehr viele Vorteile auf: Die Probenart und -größe sowie die Messverfahren können sehr viel variabler gestaltet werden. Lösungen in Küvetten können genauso in den Aufbau eingebracht werden, wie feste Proben auf z.B. Quarzträgern. Darüber hinaus ermöglicht die freistehende Bauweise den Einbau

verschiedener Elemente, wodurch unterschiedlichste Messungen realisiert werden können. Optische Elemente wie z.B. Linearpolarisatoren, $\lambda/2$ - oder $\lambda/4$ -Verzögerungsplatten gestatten die Messung von Zirkular-/Lineardichroismus, polarisierter Absorption/Emission oder Selektivreflektionen. Der Einsatz einer speziell angefertigten Probenkammer gestattet Messungen im Vakuum ($p \geq 10^{-5}$ mbar) und bei Temperaturen von -190 bis $+200$ °C. Eine elektrische Kontaktierung der Probe in der Kammer ist ebenfalls möglich.

Im Folgenden wird nur näher auf die Bauelemente und Messungen eingegangen, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz gekommen sind.

Funktionsweise und Bauelemente des optischen Aufbaus

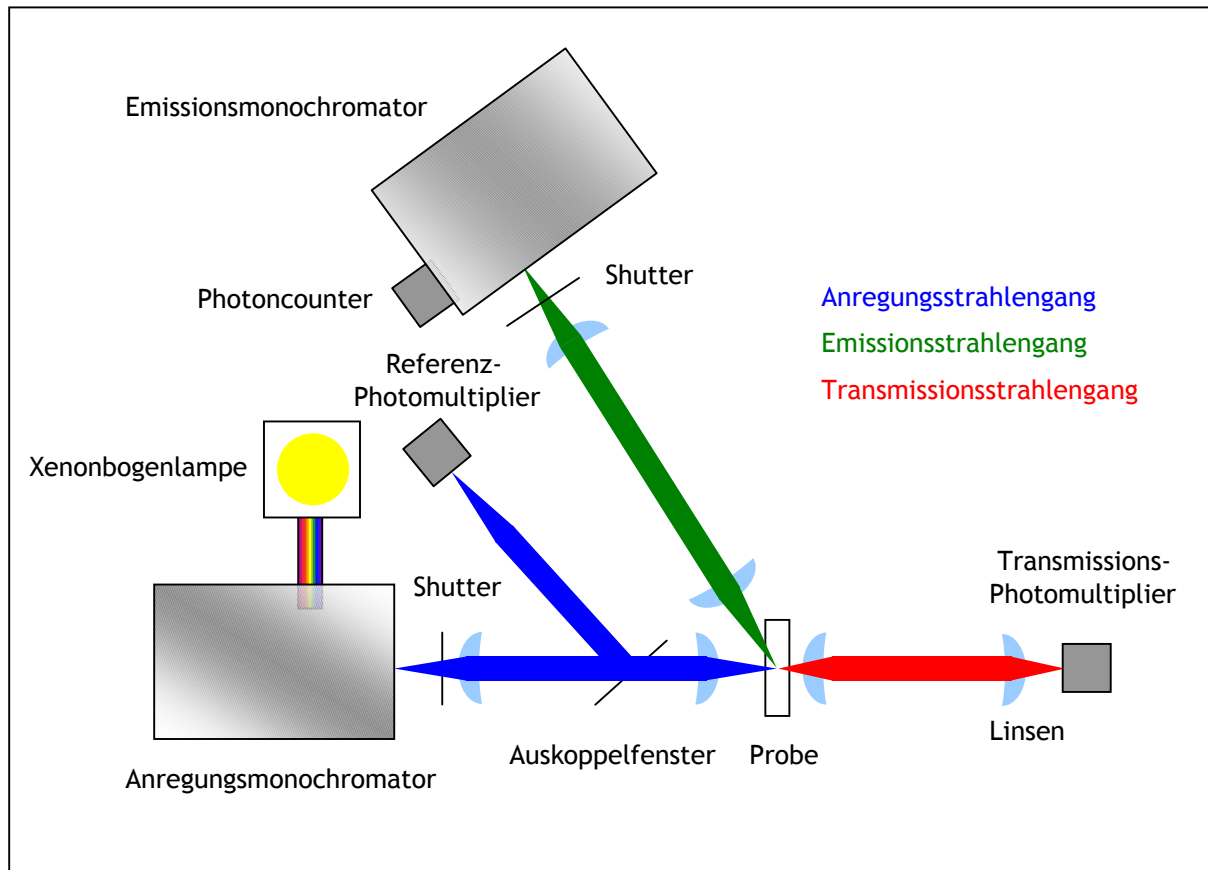


Abbildung 5-3: Schematische Darstellung des optischen Aufbaus.

Abbildung 5-3 sind die einzelnen Elemente des optischen Aufbaus und ihre relative Anordnung zu entnehmen. Eine 500 W Xenon Kurzbogenlampe emittiert im Bereich von 200 bis 900 nm Strahlung, welche in den Anregungsmonochromator eingespeist wird. Sowohl der Anregungs- als auch der Emissionsmonochromator sind von der Firma Acton Research Corporation des Typs SP 300 i. Der Aufbau der Monochromatoren entspricht der Czerny-Turner-Anordnung, wie es in Abbildung 5-4 schematisch dargestellt ist.

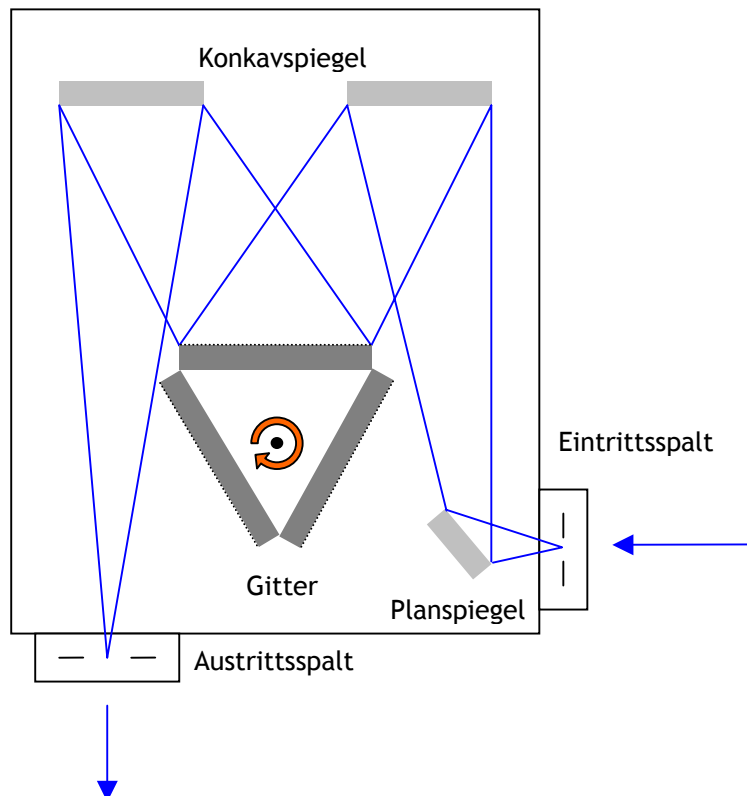


Abbildung 5-4: Aufbau der Monochromatoren in der Czerny-Turner-Anordnung.

Das Licht wird nach dem Eintritt in den Monochromator von einem Planspiegel auf einen Konkavspiegel gelenkt, der den Lichtkegel parallelisiert und auf das aktive Reflexionsgitter schickt. Drei unterschiedliche Gitter stehen zur Verfügung, die für unterschiedliche Wellenlängenbereiche einsetzbar sind (Abbildung 5-5). Das am Gitter gebeugte Licht wird von einem zweiten Konkavspiegel mit demselben Öffnungswinkel über den Austrittsspalt aus dem Monochromator reflektiert.

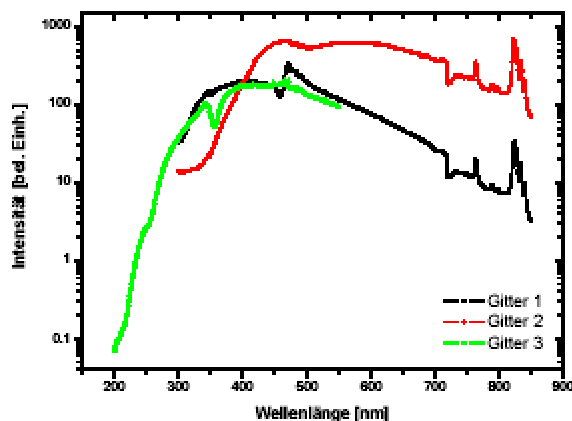


Abbildung 5-5: Intensität der Xenonbogenlampe in Abhängigkeit von dem verwendeten Gitter [184].

Eine Linse direkt hinter dem Austrittsspalt parallelisiert die Strahlung und ermöglicht so an dieser Stelle den Einsatz von optischen Elementen (z.B. Linearpolarisatoren, $\lambda/2$ - oder $\lambda/4$ -Verzögerungsplatten). Alle Linsen im Aufbau wurden von Melles Griot bezogen und bestehen aus künstlichem UV-Quarz (Synthetic Fused Silica), um eine Transmission bis in den fernen UV-Bereich (~ 200 nm) zu gewährleisten. Bevor das Licht wieder gebündelt und auf den Probenort gelenkt wird, wird durch ein Quarzfenster (Heraeus Quarzglas Suprasil 2; durchlässig bis 200 nm) circa 8-10 % des Lichtes ausgekoppelt und in einen Referenzphotomultiplier fokussiert. Die Auskopplung eines Teiles des Anregungslichtes dient dazu, Schwankungen in der Lampenintensität zu dokumentieren. Diese Abweichungen werden bei der späteren Berechnung des Spektrums berücksichtigt, so dass man ein bereinigtes Signal erhält.

Bei der Durchführung von Absorptionsmessungen wird die Strahlung nach der Transmission durch die Probe parallelisiert und abschließend in dem Transmissionsphotomultiplier gesammelt. Die verwendeten Photomultiplier sind beide vom Typ R 928 der Firma Hamamatsu. Emittiert eine zur Fluoreszenz angeregte Probe Strahlung, wird dieses parallelisiert, auf den Eintrittsspalt des Emissionsmonochromators abgebildet und im Monochromator spektral aufgespalten. Ein Photoncounter des Typs R 4632 der Firma Hamamatsu detektiert die Photolumineszenz.

5.3 Schichtdickenbestimmung

Die PPX-Schichtdicke wurde mit Hilfe eines Profilometers des Typs Dektak³ST der Firma Veeco Instruments Inc. erfaßt. Das Hauptbauelement des Dektak besteht aus einer Abtastspitze, die über eine Wippe mit zwei Spulen verbunden ist (Abbildung 5-6). Zur Bestimmung der Schichtdicke wurde mit einem Skalpell ein Ritz in den PPX-Film geschnitten, der gerade bis auf die Objektträgeroberfläche reicht. Die Nadelspitze mit einem Durchmesser von einem μm sitzt auf der Probenoberfläche mit einer bestimmten Kraft auf, welche abhängig ist von der Härte des untersuchten Materials. Die angelegte Kraft wird durch Gewichte zwischen 2 und 8 mg variiert. Für die Untersuchungen von PPX wurde die Kraft durch den Einsatz von 2 mg eingestellt. Die Spitze fährt in x-Richtung über die Probenoberfläche und wird dabei in y-Richtung ausgelenkt. Durch die Kopplung der Nadelspitze mit der Wippe wird entsprechend der Topologie des Filmes der Abstand zwischen der Wippe und den beiden Spulenenden verändert, was zu Veränderungen der Induktivitäten der beiden Spulen führt. Dieses Signal wird detektiert und in ein Oberflächenprofil umgerechnet.

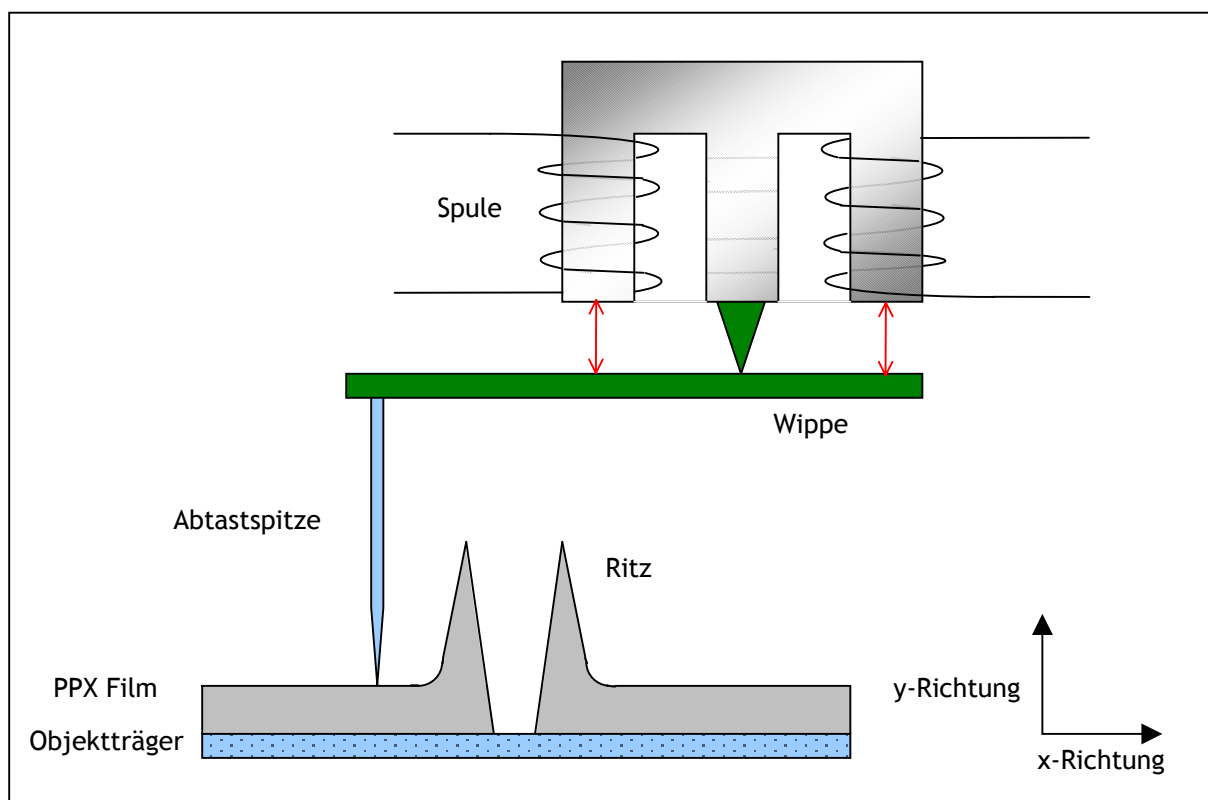


Abbildung 5-6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Dektak³ST.

5.4 Verbrennungsanalyse

Die Verbrennungsanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Lars Füchtjohann im HuK Umweltlabor GmbH / Wenden-Hünsborn unter Verwendung eines TN 3000 der Firma Thermo Euroglas durchgeführt. Die Messungen erfolgten gemäß DIN EN 12260 (2003-12).

Die flüssige Probe wird bei diesem Analyseverfahren in den 1000°C heißen Ofen injiziert und dort verbrannt. Die Verbrennungsgase gelangen anschließend in einen IR-Detektor, worüber die Gesamtkohlenstoffkonzentration ermittelt wird. Danach passieren die Verbrennungsgase den Chemolumineszenz-Detektor, wo der Gehalt an gebundenem Stickstoff ermittelt wird. Als zweiter Schritt wird die flüssige Probe in ein mit 10 %iger Phosphorsäure gefülltes Gefäß injiziert. Die Phosphorsäure treibt den anorganischen Kohlenstoff als CO₂ aus, der ebenfalls in dem IR-Detektor bestimmt wird. Aus der Differenz der Konzentrationen des Gesamtkohlenstoffs und des anorganischen Kohlenstoffs kann anschließend der Gehalt an organischem Kohlenstoff berechnet werden.

5.5 Mikroskope

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Mikroskope verwendet:

- Optisches Mikroskop UNIVAR der Firma Reichert
- Digitalmikroskop VHX 100 der Firma KEYENCE mit dem Objektiv VH-Z 500
- Fluoreszenzmikroskop DMR Der Firma Leica

5.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

¹H-NMR-Messungen wurden an dem Gerät ARX300 der Firma Bruker in der NMR-Abteilung des Fachbereiches Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

5.7 Scanning Electron Microscope (SEM)

Die Bilder wurden an einem Hitachi Modell 300 aufgenommen. Zur Verbesserung der Leitfähigkeit wurden die Substrate mit Kohlenstoff und Gold beschichtet.

6. Zusammenfassung

Viele technische Verfahren in der Medizin und Biotechnologie, der Chemie und Physik oder auch in den Materialwissenschaften machen sich die besonderen Eigenschaften und Funktionen biologischer Materialien wie z.B. Enzyme, Proteine, Bakterien oder Mikroorganismen zu Nutze. Anwendung finden solche Materialien unter anderem in der optischen Speicherung, Katalyse, chemischen Synthese, Medikamentenfreisetzung, Abwasserreinigung oder auch der Sensorik. Für die meisten Anwendungen ist es essentiell, dass das Biomaterial über einen ausreichend langen Zeitraum immobilisiert vorliegt und in der Lage ist, mit der Umgebung effektiv zu kommunizieren. Das Spektrum der Immobilisierungsverfahren ist breit; jedoch ist häufig nicht gewährleistet, dass die Immobilisierung keinerlei Rückwirkungen auf die Struktur und Funktionen der Biomaterialien hat.

Dies war der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Der Frage der nachgegangen werden sollte war, ob es Immobilisierungsverfahren für biologische Funktionsträger gibt, bei denen diese negative Rückwirkung weitestgehend unterdrückt werden kann. Ein Anstoß für diese Forschungsarbeit war unter anderem eine Firmenkooperation, in der die Entwicklung eines Blutzuckertests für medizinische Labore angestrebt wurde. Es ging in dieser Kooperation um die Mikroinkapselung eines Sensormoleküls mittels einer semipermeablen Membran zur selektiven Detektion der Glucose im menschlichen Blut und zwar unter Verwendung der Fluoreszenzspektroskopie.

Das Konzept, das entwickelt und im Rahmen der Doktorarbeit verfolgt wurde, sah vor, die Biomoleküle in ihrer natürlichen fluiden Umgebung in „Container“ einzubringen und diese Container selbst räumlich zu fixieren. Dabei sollten die Container und die immobilisierend wirkenden Strukturen auf der Nanoskala strukturiert werden, damit der Austausch von Stoffen oder gegebenenfalls auch von Signalen mit der Umgebung schnell erfolgen kann. Dabei soll die Gesamtstruktur so gewählt werden, dass ein Austausch des kleinen Analyten nicht aber des großen Sensormoleküls durch die Containerwände möglich ist (siehe Abbildung).

Die Realisierung dieser spezifischen fluiden Umgebung erfolgt im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch

- das Einschleusen des Biomaterials in ein polymeres Trägermaterial
- eine gezielten faserartige Nanostrukturierung des Trägermaterials
- eine Beschichtung der Fasern mit einer semipermeablen Membran und schließlich
- einen kontrollierten Austausch eines Teils des Trägermaterials gegen ein vorgegebenes Solvens.

Der letzte Punkt ist ganz entscheidend für die Realisierung des Konzepts: durch die partielle Entfernung des faserbildenden Feststoffs öffnen sich Leerräume, die als Nanocontainer dienen. Die Diffusion nur eines Teils des Trägermaterials durch die Membran wurde dabei erreicht, indem eine Polymermischung aus niedrigem und hohem Molekulargewicht verwendet wurde, wobei ausschließlich der niedermolekulare Anteil in der Lage ist die semipermeable Membran zu durchdringen. Als Ergebnis liegt das Biomolekül umgeben von einer fluiden Matrix in Nanocontainern immobilisiert vor.

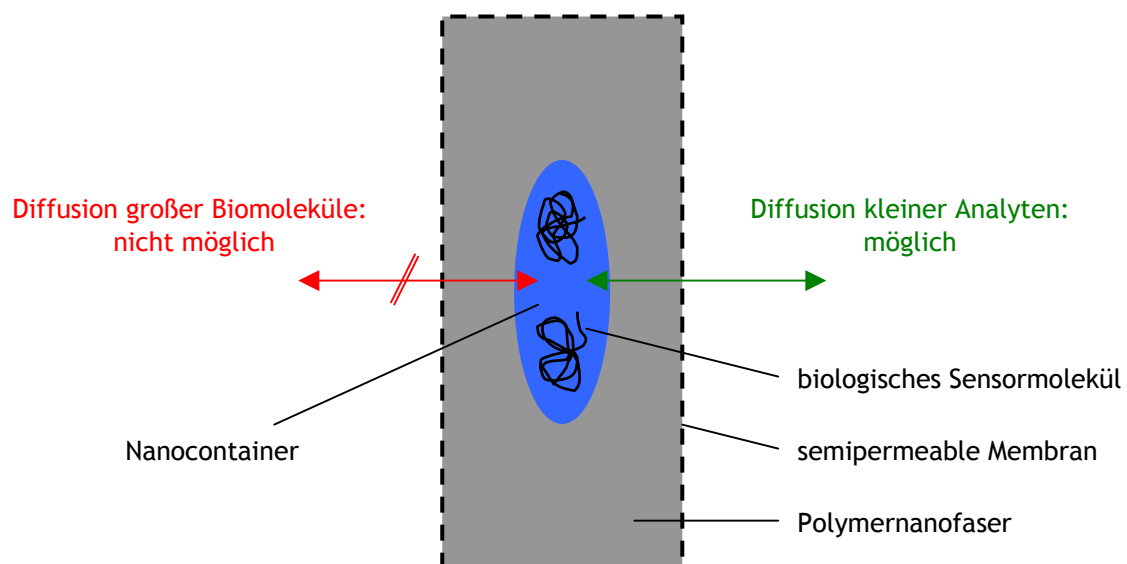


Abbildung 6-1: Schematische Darstellung des Konzepts zur Bioimmobilisierung.

Als Zugang zu Polymernanofasern wurde in der Arbeit das Elektrospinverfahren gewählt. Eine Polymerlösung wurde durch eine Metallkanüle gepumpt, an die eine Hochspannung im Bereich von einigen Kilovolt angelegt wurde. Im Abstand von einigen Zentimeter bis Dezimeter befand sich eine Gegenelektrode, zu der die Polymerlösung hin beschleunigt wurde. Auf dem Weg zu Gegenelektrode verdampft das Lösungsmittel und die Bildung von Polymernanofasern tritt ein.

Für die Umsetzung des Konzeptes war weiterhin eine gezielte Auswahl von drei verschiedenen Hauptkomponenten notwendig und zwar

- des polymeren Trägermaterials
- der semipermeablen Membran und
- des Biomoleküls.

An diese Komponenten wurden sehr viele unterschiedliche Anforderungen gestellt. So musste z.B. die Mischung des polymeren Trägermaterials verspinbar sein, die Membran musste stabil und transparent gegenüber UV/Vis-Bestrahlung und gleichzeitig semipermeabel gegenüber dem polymeren Trägermaterial sein und schließlich musste das Biomolekül den Einsatz als Funktionsadditiv beim Elektrospinnen ohne Verlust seiner Funktion überstehen, um nur einige der notwendigen Charakteristika der einzelnen Komponenten zu nennen.

Der erste Teil dieser Arbeit stellt Literaturrecherchen und experimentelle Versuchsreihen vor, an Hand derer geeignete Materialien für die drei Einzelkomponenten gefunden werden sollten. Die Untersuchungen der optischen und mechanischen Eigenschaften der Einzelkomponenten zeigten auf, dass Poly(ethylenoxid) (PEO) (polymeres Trägermaterial), Poly(p-xylylen) (PPX) (semipermeable Membran) bzw. Grün Fluoreszierendes Protein (GFP) (Biomolekül) die unterschiedlichen Anforderungsprofile vollständig erfüllen.

Der zweite Abschnitt der Arbeit setzt sich mit der Fragestellung auseinander, wie die einzelnen Parameter für den Übergang von den isolierten Einzelkomponenten zu der Umsetzung des Gesamtkonzeptes variiert werden müssen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde herausgearbeitet, dass zusätzlich zu dem ursprünglichen Konzept Salze als Additive in die Polymernanofaser eingeschleust werden müssen. Erst das Salz ermöglicht durch seine Hydrophilie, dass das Solvens in ausreichendem Maße die semipermeable Membran durchdringt und so den niedermolekularen Anteil der Polymernanofaser aus dem System spült, wodurch die angestrebten Nanocontainerstrukturen ausgebildet werden.

Durch gezielte Versuchsreihen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine geeignete Kombination der Einzelkomponenten gefunden werden, welche eine erfolgreiche Umsetzung des Konzeptes ermöglicht. Das Biomolekül GFP, das nach dem Einspinnen in Nanofasern seine Fluoreszenz verlor, zeigte diese nach der Ausbildung der Nanocontainerstruktur wieder. Für GFP in einer solchen privilegierten Umgebung wurde die Verwendung als Biosensor demonstriert und zwar für den Nachweis von Harnstoff. Den Abschluss dieser Arbeit stellt die Übertragung des Konzeptes auf andere Methode der Nanostrukturierung und die Verwendung anderer Biomoleküle im Rahmen des erarbeiteten Konzeptes dar.

7. Literatur

- [1] R. Feynman; The pleasure of Finding Things out: There is plenty of room at the bottom (Hrsg.: J. Robbins), Perseus, 1999
- [2] Frost&Sullivan; D 254, 2003
- [3] K. Sajkaguchi, M. Matsui, F. Mizukami; *Applied Microbiol. Biotechnol.* 2005, 67, 306-311
- [4] H.W. Scouten, J.H.T. Luong, R.S. Brown; *Trends in Biotech.* 1995, 13, 178-185
- [5] B. Johnsson, S. Lofas, G. Linquist; *Anal. Biochem.* 1991, 198, 268-277
- [6] R.J. Chen, Y. Zhang, H. Dai; *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 3838-3839
- [7] S. Sano, K. Kato, Y. Ikada; *Biomat.* 1993, 14, 817-822
- [8] N. Hampp, D. Oesterhelt; Bacteriorhodopsin and its potential in Technical applications, *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives*, C.Mirkin C.Niemeyer Eds., Wiley-VCH 146-167, 2004
- [9] T. Fischer, N. Hampp; Encapsulation of Purple Membrane Patches into polymeric Nanofibres by Electrospinning, *IEEE Transactions on NanoBioScience* 2, 118-120, 2004
- [10] H. Jia, G. Zhu, B. Vugrinovich, W. Kataphinan, D.H. Reneker, P. Wang; *Biotechnol. Prog.* 2002, 18, 1027-1032
- [11] T. Frese, P. Hanefeld, N. Füchtjohann, A. Greiner, J.H. Wendorff; „Verfahren zum Einkapseln von Sensormolekülen mit einer semipermeablen Membran“, deutsche Patentanmeldung; EMB 04 1021
- [12] Z.-M. Huang, Y-Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna; *Composites Science and Technology* 2003, 63, 2223-2253
- [13] E.T. Vandenberg, R.S. Brown, U.J. Krull; I.E. Veliky (Ed.), *Immobilized Biosystems in Theory and Practical Applications*, Elsevier, Holland, 1983, p. 129
- [14] H.H. Weetall; *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1993, 41, 157
- [15] L. Doretto, D. Ferrara, S. Lora; *Biosens. Bioelectron.* 1993, 8, 443
- [16] K.F. O´Driscoll; *Meth. Enzymol.*, 1976, 44, 169
- [17] W.H. Scouten; *Meth. Enzymol.*, 1987, 135, 30
- [18] B. Lu, M.R. Smyth, R. O´Kennedy; *Analyst* 1996, 121, 29R

- [19] W. Jin, J.D. Brennan; *Analytica Chimica Acta* **2000**, 461, 1-36
- [20] K. Eugenie, I. Willner; *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6166-6235
- [21] Z.-M. Huang, Y.-Z. Zhang, M. Kotakic, S. Ramakrishna; *Composites Science and Technology* **2003**, 63, 2223-2253
- [22] X. Wang, Y.-G. Kim, C. Drew, B.-C. Ku, L.A. Samuelson; *Nano Lett.* **2004**, 4(2), 31-334
- [23] S.G. Penn, L. Hey, M.J. Natan; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 609-615
- [24] J.L. West, N.J. Halas; *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2003**, 5, 285-292
- [25] P. Alivisatos; *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 47-52
- [26] A. Fertala, W.B. Han, F.K. Ko; *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 57, 48-58
- [27] H.J. Jin, S. Fridrikh, G.C. Rutledge, D. Kaplan; *Abstracts of Papers Am. Chem. Society* **2002**, 224(1-2), 408
- [28] C.J. Buchko, L.C. Chen, Y. Shen, D.C. Martin; *Polymer* **1999**, 40, 7397-407
- [29] G.T. Hermanson, A.K. Mallia, P.K. Smith; *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, London, **1992**
- [30] R.F. Taylor; *Protein Immobilization*, Dekker, New York, **1990**
- [31] A.F. Collings, F. Caruso; *Rep. Prog. Phys.* **1997**, 60, 1397-1445
- [32] S.V. Rao, K.W. Anderson, L.G. Bachas; *Microchim. Acta* **1998**, 128, 127-143
- [33] W.H. Scouten, J.H.T. Luong, R.S. Brown; *Trends Biotech.* **1995**, 13, 178-185
- [34] C. Linqu; *Current Opinion in Chemical Biology* **2005**, 9, 217-226
- [35] J.E. Butler, M. Suter, B. Rosenberg, L.A. Cantarero; *J. Immunol. Methods* **1992**, 150, 77-90
- [36] J.E. Butler, B. Rosenberg, E.W. Voss; *Mol. Immunol.* **1993**, 30, 1165-1175
- [37] L.G. Mendoza, P. McQuary, M. Eggers; *Biotechniques* **1999**, 27, 778-786.
- [38] P. Arenkov, A. Kukhtin, A. Mirzabekov; *Anal. Biochem.* **2000**, 278, 123-131
- [39] H. Zhu, J.F. Klemic, M. Gerstein, M. Snyder; *Nat. Genet.* **2000**, 26, 283-289
- [40] G. MacBeath, S.L. Schreiber; *Science* **2000**, 289, 1760-1763
- [41] B. Lu, J. Xie, C. Lu, C. Wu, Y. Wei; *Anal. Chem.* **1995**, 67, 83-87

- [42] R.A. Vijayendran, D.E. Leckband, *Anal. Chem.* **2001**, 73, 471-480
- [43] K. Nakanishi, H. Muguruma, I. Karube; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1695-1700
- [44] T.M. Spitznagel, D.S. Clark, *Biotechnology (NY)* **1993**, 11, 825-829
- [45] P. Peluso, D.S. Wilson, et al.; *Analytical Biochemistry* **2003**, 312, 113-124
- [46] G.P. Anderson, K.D. King, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, 12, 329-336
- [47] S. Kanno, Y. Yanagida, M. Aizawa; *J. Biotechnol.* **2000**, 76, 207-214
- [48] W. Shenton, S.A. Davis, S. Mann; *Adv. Mater.* **1999**, 11, 449-452
- [49] I.D.G. MacDonald, W.E. Smith; *Langmuir* **1996**, 12, 706-713
- [50] B.N. Rospendowski, K. Kelly; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 1217-1225
- [51] H. Mattoussi, J.M. Mauro, M.G. Bawendi; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12142-12150
- [52] D. Ibane, Y. Yokota, T. Tominaga; *Chem. Lett.* **2003**, 32, 574-575
- [53] H. Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs; *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, 237, 98-103
- [54] M.J. Meziani, H.W. Rollins, L.F. Allard, Y.-P. Sun; *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 11178-11182
- [55] M. J. Meziani, Y.-P. Sun; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8015-8018
- [56] F. Caruso; *Adv. Mater.* **2001**, 13, 11-22
- [57] F. Caruso, H. Möhwald; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6039-6046
- [58] F. Caruso, H. Fiedler, K. Haage; *Colloids Surf. A* **2000**, 169, 287-293
- [59] C. Schüler, F. Caruso; *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, 21, 750-753
- [60] F. Caruso, C. Schüler; *Langmuir* **2000**, 16, 9595-9603
- [61] Y. Lvov, F. Caruso; *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4212-4217
- [62] A. C. Jen, M. Conley Wake, A. G. Mikos; *Biotech. Bioeng.*, **1996**, 50, 357-364
- [63] H. Kobayashi, Y. Ikada; *Curr. Eye Res.* **1991**; 10, 899-908
- [64] R. Shatford, S. Nyberg, S. Meier, F. Cerra; *J. Surg. Res.* **1992**, 53, 549-557
- [65] M.L. Plunkett, J.A. Hailey; *Lab. Invest.* **1990**, 62, 510-517

- [66] A. Groboillot, D.K. Boadi, D. Poncelet, R.J. Neufeld; *Crit. Rev. Biotechnol.* **1994**, 14, 75-107
- [67] P. Aebischer, M. Goddard, P. Tresco; Cell encapsulation for the nervous system; In: M.F.A. Goosen (ed.), *Fundamentals of animal cell encapsulation and immobilization*; **1993**; pp. 197-224; CRC Press, Boca Raton, FL.
- [68] Z. Lum, I. Tai, M. Krestnow, A.M. Sun; *Diabetes* **1991**, 40, 1511-1516
- [69] R. Langer, J.P. Vacanti; *Science* **1993**, 260, 920-926
- [70] A.M. Sun, I. Vacek, I. Tai, Microencapsulation of living cells and tissues; In: M. Dunbrow (ed.), *Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy*; **1992**; pp. 315-322; CRC press, Boca Raton, FL.
- [71] M.T. Reetz, W. Könen, A. Zonta; *Adv. Synth. Catal.* **2003**, 345, 717-728
- [72] R. Fukai, P.H.R. Dakwa, W. Chen; *J. Polymer Science A: Polym. Chem.* **2004**, Vol. 42, 5389-5400
- [73] J. Crank, G.S. Park; *Diffusion in Polymers*, Academic Press, N.Y., **1986**
- [74] J. Comyn; *Polymer Permeability*, Elsevier Appl. Sci. London, **1986**
- [75] H.B. Hopfenberg, V. Stannett: *The Physics of Glassy Polymers*, R.N. Haeward Ed. Applied Science Publ. London, **1973**, 504
- [76] T.V. Naylor; *Comprehensive Polymer Science*, S.G. Allen Ed., Pergamon Press, N.Y. **1989**
- [77] F. Bueche; *Physical Properties of Polymers*, Interscience Publ. N.Y., **1962**
- [78] M.M. Coleman, J.F. Graf, P.C. Painter; *Techno. Publ. Comp. Lanc.*, **1991**
- [79] P.G. de Gennes; *J. Chem. Phys.* **1971**, 55 (2), 572
- [80] M. Doi, S.F. Edwards; *The theory of polymer dynamics*, Clarendon Press, Oxford, **1986**
- [81] P.G. de Gennes; *Scaling concepts in polymer physics*, Cornell Univ. Press, **1979**
- [82] M. Antonietti, J. Countandin, H. Sillescu; *Macromolecules* **1986**, 18, 9793
- [83] M. Antonietti, H. Sillescu; *Macromolecules* **1986**, 19, 798
- [84] H. Sillescu; *Chemistry and physics of macromolecules*, VCH, Weinheim **1991**, 295

- [85] W. Yau, J. Kirkland, D. Bly; *Modern size exclusion liquid chromatography: practice of gel permeation and gel filtration chromatography*, Wiley, N.Y., **1979**
- [86] J. Gunderson, J.C. Giddings; *Comp. polymer science* **1989**, Vol. I, 279
- [87] B.A. Wolf; *Adv. Polym. Sci.* **1972**, 10, 109
- [88] H. Inagaki; *Adv. Polym. Sci.* **1977**, 24, 189
- [89] K. Binder; *J. Chem. Phys.* **1983**, 79 (12), 6387-6409
- [90] P.G. de Gennes; *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 4756
- [91] F. Brochard, P. Lewinson; *Macromolecules* **1983**, 16 (6), 1638-1641
- [92] D.G. Bucknall, S.A. Butler, J.S. Higgins; *Macromolecules* **1999**, 32, 5453-5456
- [93] A. Dhinojwala, J.M. Torkelson; *Macromolecules* **1994**, 27, 4817-4824
- [94] Y. Xia, P. Yang, B. Mayers, B. Gates, F. Kim; *Adv. Mater.* **2003**, 15, 353
- [95] J. Hu, T.W. Odom, C.M. Lieber; *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32; 435
- [96] R. Dersch, A. Greiner, M. Steinhart, J.H. Wendorff; *Chem. Unserer Zeit* **2005**, 39, 26-35
- [97] X. Wang, C. Drew, S.-H. Lee, K.J. Senecal, J. Kumar, L.A. Samuelson; *Nano Letters* **2002**, Vol.2, No. 11, 1273-1275
- [98] M. Bognitzki, H. Hou, M. Ishaque, T. Frese, M. Hellwig, C. Schwarte, A. Schaper, J.H. Wendorff, A. Greiner; *Adv. Mater.* **2000**, 12, No. 9, 637
- [99] D. Li, Y. Xia; *Adv. Mater.* **2004**, 16, No. 14, 1151
- [100] D.H. Reneker, I. Chun; *Nanotechnology* **1996**, 7, 216
- [101] A. Frenot, I.S. Chronakis; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, 8, 64
- [102] A. Formhals; US patent 1 975 504; **1934**
- [103] P.K. Baumgarten; *J. Colloid Interface Sci.* **1971**, 36, 71
- [104] L. Larrondo, R. Manley; *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.* **1981**, 19, 909
- [105] L. Larrondo, R. Manley; *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.* **1981**, 19, 921
- [106] L. Larrondo, R. Manley; *J. Polym. Sci.: Polym. Phys. Ed.* **1981**, 19, 933
- [107] J. Doshi, D.H. Reneker; *J. Electrostat.* **1995**, 35, 151

- [108] R. Kessick, J. Fenn, G. Tepper; *Polymer* **2004**, 45, 2981
- [109] D.H. Reneker, H. Fong, S. Koomghongse; *J. Appl. Phys.* **2000**, 87, 4531
- [110] Y.M. Shin, M.M. Hohman, G.C. Rutledge; *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 78, 1149
- [111] M. Bognitzki, A. Greiner, J.H. Wendorff, et al.; *Polymer Engineering and Science* **2001**, Vol. 41, No. 6, 982-989
- [112] N.I. Kovtyukhova, T.E. Mallouk; *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4354
- [113] Y. Huang, X. Duan, Q. Wei, C.M. Lieber; *Science* **2001**, 291, 630
- [114] F. Favier, E.C. Walter, T. Benter, R.M. Penner; *Science* **2001**, 293, 2227
- [115] N.A. Melosh, A. Boukai, P.M. Petroff, J.R. Heath; *Science* **2003**, 300, 112
- [116] F. Kim, S. Kwan, J. Akana, P. Yang; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 4360
- [117] D. Li, G. Ouyang, J. T. McCann, Y. Xia; *Nano Letters* **2005**, 5, No. 5, 913-916
- [118] D. Li, Y. Wang, Y. Xia; *Adv. Mater.* **2004**, 16, No. 4, 361
- [119] R. Dersch, T. Liu, K. Schaper, A. Greiner, J.H. Wendorff; *J. Polymer Science: Part A: Polym. Chem.* **2003**, Vol. 41, 545-553
- [120] R. Dersch, M. Steinhart, U. Boudriot, A. Greiner, J.H. Wendorff; *Polym. Adv. Technol.* **2005**, 16, 276-282
- [121] T. Subbiah, G.S. Bhat, R.W. Tock, S. Parameswaran, S.S. Ramkumar; *Appl. Polym. Sci.* **2005**, Vol. 96, 557-569
- [122] S. Megelski, J.S. Stephens, D.B. Chase, J.F. Rabolt; *Macromolecules* **2002**, 35, 8456
- [123] M.M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, B. Erman; *Polymer* **2002**, 43, 3303-9
- [124] H. Fong, D.H. Reneker; *J. Polym Sci: Part B Polym. Phys* **1999**, 37(24), 3488-93
- [125] J.M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, T. Beck; *Polymer* **2001**, 42, 261
- [126] X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. Chu; *Polymer* **2002**, 43(16), 4403-4412
- [127] A. Suthat, G. Chase; *Chemical Engineer* **2001**, 26-8
- [128] D. Groitzsch, E. Fahrback; US patent 4 618 524; **1986**
- [129] H.L. Schreuder-Gibson, W. Yeomans; *Adv. Mater.* **2002**, 34(3), 44-55

- [130] M. Szwarc; *Nature* 1947, 160, 403
- [131] M. Szwarc; *Discuss. Faraday Soc.* 1947, 2, 46
- [132] M. Szwarc; *J. Chem. Phys.* 1948, 16, 128
- [133] M. Szwarc; *J. Polym. Sci.* 1951, 6, 319
- [134] L.A. Auspos, J.R. Schaefgen, S. B. Speck; *J. Polym. Sci.* 1955, 15, 9
- [135] W.F. Gorham; *J. Polym. Sci. A-1* 1966, 4, 3027-3039
- [136] A. Greiner, S. Mang, O. Schäfer, P. Simon; *Acta Polym.* 1997, 48, 1
- [137] A. Greiner, *The Polymeric Materials Encyclopaedia*, Ed. J. C. Salamone, CRC Press, 1996, 9, 7171
- [138] J.B. Fortin, T.-M. Lu; *Chem. Mater.* 2002, 14, 1945-1949
- [139] U. Göschel; *Langmuir* 2000, 16, 2887-2892
- [140] S. Isoda; *Polymer* 1984, 25, 615
- [141] W. Zhang, E.L. Thomas; *Polym. Sci., Polym. Phys.* 1992, 30, 1285
- [142] P. Simon, S. Mang, A. Greiner; *Macromolecules* 1998, 31, 8775-8780
- [143] R.G. Shaw, Y.L. Yeh, J.W. Lewis; US Patent 35 03 903, 1970
- [144] J.R. Schaefgen; *J. Polym. Sci.* 1959, 51, 133
- [145] T.E. Baker, G.L. Fix, J.S. Judge; *J. Electrochem. Soc.* 1980, 127, 1851
- [146] M. Gazicki, W.J. James, H.K. Yasuda; *J. Polym. Lett. Ed.* 1985, 23, 639-645
- [147] P. Hanefeld; Dissertation 2005, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie
- [148] T. Peng, P. Gibula, K. de Yao, M.F. Goosen; *Biomaterials* 1996, 17, 685-694
- [149] C. Schmidt, J.H. Wendorff, A. Greiner; *Acta Polym.* 1998, 49, 232-235
- [150] D.J. Monk, H.S. Toh, J. Wertz; *Sensors and Materials* 1997, 9(5), 307
- [151] M. Szwarc; *Polym. Eng. Sci.* 1976, 16, 473
- [152] P.K. Wu, G.R. Yang, J.F. McDonald, T. M. Lu; *J. Elect. Mater.* 1995, 24, 53
- [153] J.F. McDonald, H.T. Lin, H.J. Greub, R.A. Pholhower, S. Dabral; *IEEE Trans Comp, Hybrids, Manuf. Tech.* 1989, 12, 195

- [154] W.F. Beach, C. Lee, D.R. Bassett, T.M. Austin, R. Olson; Xylylene polymers. In: Encyclopedia of polymer science and engineering. New York: Wiley, **1989**. p. 195.
- [155] D. M. Mahoney; U.S. Patent No. 4, 163 828 7; **1979**
- [156] B.L. Joesten; *J Appl Polym Sci* **1974**, 18, 439
- [157] S. Dabral, et al.; *J. Vac. Sci. Technol.* **1993**, B11, 1825
- [158] Motorola: Pressure Sensor Device Data (Motorola Literature Distribution Centers, P.O. Box 20912, Phoenix, AZ 85036, Phoenix, AZ, **1993**
- [159] M. Bera, J.L. Gardette; *European Polymer Journal* **2000**, 36, 1753-1764
- [160] A. Rivaton, J.L. Gardette; *Angew. Makromol. Chem.* **1998**, 261/262, 173 Nr. 4627
- [161] O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga; *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 59, 223-39
- [162] F.H.Johnson, J.R. Waters; *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 60, 85-103
- [163] H. Morise, F.H. Johnson, J. Winant; *Biochemistry* **1974**, 13, 2656-62
- [164] F.G. Prendergast, K.G. Mann; *Biochemistry* **1978**, 17, 3448-53
- [165] O. Shimomura; *FEBS Lett.* **1979**, 104, 220-22
- [166] W.W. Ward, S.C. Reeves; *Photochem. Photobiol.* **1982**, 35, 803-8
- [167] W.W. Ward, S.H. Bokman; *Biochemistry* **1982**, 21, 4535-40
- [168] J.G. Morin, J.W. Hastings; *J. Cell.Physiol.* **1971**, 77, 313-18
- [169] W.W. Ward, M.J. Cormier; *Photochem. Photobiol.* **1980**, 31, 611-15
- [170] D.C. Prasher, V.K. Eckenrode, W.W. Ward; *Gene* **1992**, 111, 229-33
- [171] M. Chalfie, Y. Tu, W.W. Ward, D.C. Prasher; *Science* **1994**, 263, 802-5
- [172] S. Inouye, F. Tsuji; *FEBS Lett.* **1994**, 341, 277-80
- [173] R. Heim, R.Y. Tsien; *Current Biology* **1996**, 6, 178-182
- [174] A. Miyawaki; *Nature Biotechnology* **2004**, Vol 22, 11, 1374-1376
- [175] M. Ormö, R.Y. Tsien, S.J. Remington; *Science* **1996**, 273,1392-95
- [176] F. Yang, L.G. Moss, G.N. Phillips; *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 1246-51

- [177] R.Y. Tsien; *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509-544
- [178] R. Heim, D.C. Prasher, R.Y. Tsien; *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1994**, 91, 12501-4
- [179] A.B. Cubitt, R. Heim, R.Y. Tsien; *Trends. Biochem. Sci.* **1995**, 20, 448-55
- [180] B.G. Reid, G.C. Flynn; *Biochemistry* **1997**, 36, 6786-91
- [181] W.W. Ward, S.H. Bokman; *Biochemistry* **1982**, 21, 4535-4540
- [182] E. Conti, N.P. Franks, P. Brick; *Structure* **1996**, Vol. 4, No. 3, 287-298
- [183] B.R. Branchini, M. Zimmer, et al.; *Biochemistry* **2005**, 44, 1385-1393
- [184] A. Bayer; Dissertation 2003, Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie
- [185] D.W. Grattan; *Can. Chem. News* **1989**, 25

8. Anhang

8.1 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Immobilisierung von Proteinen in elektrogesponnenen polymeren Nanofasern“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 4. Januar 2006

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

<i>Name</i>	Nils Füchtjohann
<i>Geburtsdaten</i>	08. August 1975 in Iserlohn
<i>Familienstand</i>	ledig

Schulbildung

<i>1982 - 1986</i>	Grundschule Nachrodt-Wiblingwerde
<i>1986 - 1992</i>	Realschule Iserlohn-Letmathe
<i>1992 - 1995</i>	Burggymnasium Altena

Studium

<i>1995 - 1998</i>	Grundstudium Chemie an der Universität Dortmund
<i>1998 - 2002</i>	Hauptstudium Chemie an der Universität zu Köln
<i>2002</i>	Diplomarbeit am Institut für Physikalische Chemie der Universität zu Köln bei PD Dr. Swiderek (Prof. Dr. Hohlneicher) mit dem Thema „Spektroskopie dünner molekularer Schichten“

Promotion

<i>12/2002 - 01/2006</i>	Promotion an der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. J. H. Wendorff als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physikalische Chemie, Kernchemie und Makromolekulare Chemie
--------------------------	--

8.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben.

Bei Herrn Prof. Wendorff möchte ich mich ganz besonders bedanken für sein Vertrauen in den Erfolg meines Themas und seine uneingeschränkte Unterstützung während meiner gesamten Promotion, sowie die ausgesprochen angenehme Atmosphäre in unserem Arbeitskreis.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Greiner für die Übernahme des Koreferats, seine stete Diskussionsbereitschaft und die unkomplizierte Unterstützung bei verschiedenen Problemen meiner Arbeit.

Herrn Dr. Henning Mootz & Herrn Thomas Kurpiers gilt mein Dank für die Bereitstellung des GFP und die ausführlichen Erläuterungen zu biochemischen Fragestellungen, durch die es mir erst möglich wurde dieses interdisziplinäre Thema zu bearbeiten.

Bei Phillip Hanefeld möchte ich mich für die gemeinsamen praktischen Arbeiten und die Veröffentlichungen bedanken, sowie für die daraus resultierenden fachlichen Diskussionen zu den unmöglichsten Uhrzeiten, die zumeist in sehr freundschaftliche Gespräche übergingen.

Recht herzlich bedanken möchte ich mich bei den jetzigen Kollegen der Arbeitsgruppe Sonja Dick, Roland Dersch, Daniel Placke, Michael Stasiak, Christopher Stillings, Max von Bistram, Martin Graeser, sowie auch bei den ehemaligen Kollegen Thomas Frese, Ralf Wombacher, Bernd Brandl, Martin Steinhart und Armin Bayer für die gute Zusammenarbeit, das kollegiale Klima und die stete Hilfsbereitschaft. Ausdrücklich bedanken möchte ich mich dabei bei Roland Dersch und Thomas Frese. Das Verhältnis zu Roland Dersch hat sich dadurch ausgezeichnet, dass er mir bei Fragen des Elektrosplinnens sehr geholfen hat und durch die steten Diskussionen über unsere misslungenen Experimente. Thomas Frese hat auch nach seiner Zeit in Marburg meine Arbeit noch sowohl durch fachlichen Rat, als auch durch Messungen und die Bereitstellung von Materialien sehr unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt meinen langjährigen Bürokollegen Sven Zimmermann, Stefanie Schlitt und Markus Rudisile. So unterschiedlich die Stimmung und die täglichen Themen mit dem Einzelnen auch waren, eines ist gewiss: es war immer eine sehr lustige Atmosphäre und große Hilfsbereitschaft, die unser Büro ausgezeichnet hat.

Bei Frau Gabi ter Laak bedanke ich für die gemeinsame Zeit im Arbeitskreis und wünsche Ihr alles Gute und eine vollständige Genesung.

Frau Elke Waschk und Herrn Rigobert Donner danke ich für Ihre unkomplizierte Hilfsbereitschaft und das sehr gute Arbeitsklima.

Weiterhin möchte ich mich bei der Feinmechanik und der Elektronikwerkstatt für ihre sehr guten Arbeiten bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Frommknecht und Herrn Kröschel für Ihre intensive Unterstützung meiner Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen meinen „Vertiefern“ für die durchgeführten Messungen bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Bei meinem Bruder Lars und meiner Schwägerin Sabine möchte ich mich für Ihre persönliche Unterstützung bedanken. Darüber hinaus gilt meinem Bruder meine ganz besondere Anerkennung für seine fachlichen Hilfestellungen während meiner gesamten Laufbahn als Chemiker.

Meiner Freundin Kristina gilt mein herzlicher Dank dafür, dass sie aus mir einen glücklichen Menschen macht.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich dafür bedanken, dass sie mir immer die Freiheit gelassen haben mein Leben selbst zu gestalten und dafür, dass sie meinen Lebensweg zu jeder Zeit liebevoll begleitet und unterstützt haben.