

Entwicklung eines optischen markierungsfreien Ionenkanalsensor-Arrays

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplomchemikerin Cordelia Zimmerer

geboren am 25.10.1973 in Dresden

Gutachter: Prof. Dr. R. Salzer
Prof. Dr. K.-F. Arndt
Prof. Dr. G. Gauglitz

Eingereicht am: 21.05.2007

Tag der Verteidigung: 15.10.2007

Danksagung

Die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit erfolgte durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 287 „Reaktive Polymere in nichthomogenen Systemen, in Schmelzen und an Grenzflächen“.

Mein Dank gilt ganz besonders Herrn Prof. Dr. Salzer, der nicht nur das Vertrauen in mich setzte, diese Arbeit anzufertigen, sondern der die ungestüme jugendliche Sicht um erfahrene Gelassenheit bereicherte. Die wunderbarsten Diskussionen waren neben fachlichen insbesondere die weltpolitischen.

Herrn Dr. Gerald Steiner gebührt Dank für die fachliche Einführung in die spektroskopischen Methoden, insbesondere die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie und die Programmierarbeiten zur Auswertung der Messungen. Alle Fragen, auch entfernteste, die in physikalischen oder gerätetechnischen Zusammenhang zu bringen waren, lagen bei ihm in den begeistertsten und trickreichsten Händen. Viele Kontakte zu anderen Instituten konnten durch seine Vermittlung geknüpft werden. Unsere kreative wissenschaftliche Zusammenarbeit ließ mich um viele wichtige Erfahrungen reicher werden.

Kann man von einer männlichen Laborfee sprechen, wenn er unzählige große und kleine Wünsche erfüllt? Herrn Haufe sei für Alles gedankt. Eine detaillierte Aufzählung der Zuarbeiten, in deren Genuss ich kommen durfte, würde sicher mehrere Seiten füllen. Deshalb beginne ich beim Ausleihen der Laborgeräte, dem Bedampfen der Substratmaterialien, dem Polieren verschiedenster optischer Oberflächen und lasse das Ende der Aufzählung offen...

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Valdas Sablinskas aus dem Institut für Allgemeine Physik und Spektroskopie der Universität Vilnius in Litauen, der den Aufbau des SPR-Imaging-Messplatzes entscheidend vorantrieb. Jemand sagte einmal über Valdas: „Schick ihn mit einer Blechbüchse in den Wald und er kommt mit einem Auto wieder heraus...“ Stimmt!

Dr. Pham vom Forschungszentrum Rossendorf unterstützte mich bei den AFM- und Kontaktwinkelmessungen und den Untersuchungen zur Eignung der Ionenstrahlimplantation für die Mikrostrukturierung der Polymerfilme. Vielen Dank für die unkomplizierte produktive Zusammenarbeit!

Am Institut für Polymerforschung wurden die ellipsometrischen Messungen von Herrn Dr. Eichhorn durchgeführt. Dr. Braun verbrachte viele Stunden mit der Strukturierung der PMMA-Filme mittels Elektronenstrahlolithographie. Vielen Dank für die Einführung in die Thematik der Erzeugung und Charakterisierung der mikrostrukturierten Polymere!

Für die Kooperation und den konspirativen Laborzugang danke ich Herrn Kallweit von JENOPTIK. Vielleicht gelingt bei den Lasermodellen der nächsten Generation auch unbeabsichtigt eine stabile Reduktion der Industrieleistung auf das bescheidene wissenschaftliche Forscherniveau.

Bei Tilo Krause und Hannes Helmboldt aus dem Institut für Organische Chemie möchte ich mich für die Unterstützung der synthetischen Arbeiten zur Reinigung des Kronenethers und bei Dr. K. Gloe für die fachlichen Diskussionen zur Komplexierung von Ionen in Lösung bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch ohne namentliche Erwähnung bei allen anderen Kollegen des Instituts für Analytische Chemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen „kleinen technischen“ Unterstützungen.

Neben dem vielen beruflichen Dank schulde ich diesen insbesondere auch meiner Familie, vor allem den Lieben, die meine Kinder behütet haben, wenn ich bis Nachts im Labor stand. Und bei Florentines, Tejas und Jolans Geduld mit den Erwachsenen, insbesondere ihrer manchmal „schlabberwurstigen“ Mama.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit veröffentlichte Beiträge in Zeitschriften, Patente und Preise:

Publikationen

C. Zimmerer, G. Steiner, H.-G. Braun, R. Salzer, Ionenkanal-Array, Bioforum [26], 2003, 215-217

G. Steiner, C. Zimmerer, S. Friedrich, H.-G. Braun, R. Salzer; Optical Biosensor with Ion Channel Array, Screening [4], 2003, 32-33

C. Zimmerer, H.-G. Braun, M. Kitsche, G. Steiner, S. Friedrich, R. Salzer; Optical Biosensor Array based on Natural Ion Channels; Proc. SPIE, Vol. 5047, Smart Nondestructive Evaluation and Health Monitoring of Structural and Biological Systems II , 2003, 403-409

C. Zimmerer, G. Steiner, M. Kitsche, H. G. Braun, R. Salzer, Microstructured Polymer Films for Ion Channel Sensor Arrays, Macromol. Symp. 2003, Polymer Discussion Dresden

C. Zimmerer, G. Steiner, H.-G. Braun, M. T. Pham, R. Salzer; .Biochips auf Basis von Ionenkanälen, Chemie in Dresden, Sonderheft Bunsentagung 2004, 70-73

R. Salzer, G. Steiner, C. Krafft, C. Zimmerer, S. Tunç; Health monitoring of biomaterials from molecular fingerprints, Proc. SPIE, Vol. 5394, Health Monitoring and Smart Nondestructive Evaluation of Structural and Biological Systems III, 2004, 255-262

R. Salzer, C. Zimmerer, M. Kitsche, G. Steiner, H.-G. Braun, Molecular Imaging of Microstructured Polymer Surfaces, Prog. Colloid Polymer Science [132], 2006, 7-15

C. Zimmerer, G. Steiner, R. Salzer, Characterization of Metal-supported Poly(methyl methacrylate) Microstructures by FTIR imaging spectroscopy, Langmuir [22], 2006, 4125-4130

Patente

G. Steiner, C. Zimmerer, R. Salzer; Verfahren zur Strukturierung dünner Schichten mittels optischer Lithographie und Anordnung zur Durchführung der optischen Lithographie, 2003, IPC Hkl G03F 7/20 Akz 103 26 223.7; Offenlegung 20.01.2005

G. Steiner, C. Zimmerer, R. Salzer; Ionenkanal-Sensorarray, 2003, Deutsches Patent- und Markenamt, Akz.: 103 61 927.5; Offenlegung 14.07.2005

C. Zimmerer, G. Steiner, R. Salzer; Verfahren zur Herstellung von Lipidmembranen, 2006, Deutsches Patent- und Markenamt, Akz.: 10 2006 039 588.3-45; Anmeldung: Patent angemeldet 16.08.2006

Preise

Optical Biosensor with Ion Channel Array, 1. Preis "Herausragende Nachwuchswissenschaftlerin" verliehen vom Springer Verlag, *Euroanalysis-XII European Conference on Analytical Chemistry*, Dortmund, Deutschland 08.-13.09.2002

Spots on Ion Channel Sensor Arrays, 1. Preis "Innovation in Scientific Work" verliehen vom Presidium of Euroanalysis Conferences, *Euroanalysis-XIII European Conference on Analytical Chemistry*, Salamanca, Spanien 5.-10.09.2004

Inhalt

<i>Abbildungen</i>	6
<i>Tabellen</i>	8
<i>Abkürzungen</i>	9
1 Einleitung	11
1.1 Zielstellung der Arbeit	11
1.2 Gewinnung von Ionenkanälen und Übertragung in Lipidschichten	11
1.3 Analytik der Funktionsfähigkeit von Ionenkanälen	13
1.4 Ionenkanal-Sensoren	15
2 Optische Array-Detektion	18
2.1 Oberflächenplasmonenresonanz	18
2.2 SPR-Imaging	20
2.3 Array-Detektion	21
3 Aufbau des Ionenkanalsensor-Arrays	23
3.1 Simulation der Einzelkanalmessung	23
3.2 Architektur der Polymerschicht	28
3.3 Zeitliche Abhängigkeit der Ionenverteilung innerhalb der Pore	30
3.4 Simulation der Array-Messung	31
4 Erzeugung und Charakterisierung der Mikrostruktur	36
4.1 Mikrostrukturierung	39
4.1.1 Strahlungsabbau der PMMA-Makromoleküle	41
4.1.2 Elektronenstrahl-Lithographie	42
4.1.3 Ionenstrahl-Ätzen mit Ag ⁺ -Ionen	44
4.1.4 UV-Lithographie	45
4.2 Charakterisierung der Mikrostrukturen	47
4.2.1 Topologische Charakterisierung	47
4.2.2 Spektroskopische Charakterisierung mittels FTIR-Imaging	49
4.3 Optimierung des UV-Lithographieprozesses	52
4.3.1 Entwicklung und Nachätzen der Mikroporen	56
4.3.2 Polymerreste in den Mikroporen	62
4.3.3 Adhäsionsblocker	66
4.3.4 Kontraststeigerung im SPR-Bild	70
4.3.5 Verkleinerung der Mikrostrukturen	74

4.4	Verbesserung der Sensitivität der Mikroporen	76
4.4.1	Selektive Bindung von Metallionen	76
4.4.2	Synthese von 2-(Benzylsulfid)-18-Krone-6 und Adsorption auf Gold	78
4.4.3	Anbindung des Mercaptomethyl-Kronenethers in Polymerporen	80
4.4.4	Komplexbildung des adsorbierten Mercaptomethyl-Kronenethers	82
5	<i>Lipiddoppelschichten auf der Polymermatrix</i>	87
5.1	Lipidmembran-Modelle auf porösen Trägern	87
5.2	Auswahl der porenüberspannenden Lipiddoppelschicht	89
5.3	Lipidverträglichkeit der PMMA-Stege	90
5.3.1	Oberflächenmodifizierung von PMMA	92
5.3.2	Lipidverträglichkeit von Biopolymeren	94
5.4	Präparation und Charakterisierung der p-LDS	96
5.4.1	Aufstempeln der porenüberspannenden Lipiddoppelschicht	97
5.4.2	Nachweis der porenüberspannenden Lipiddoppelschicht	98
5.4.3	Haltbarkeit der porenüberspannenden Lipiddoppelschicht	101
6	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	104
7	<i>Anhang</i>	107
8	<i>Material und Methoden</i>	115
	<i>Literatur und Quellen</i>	123

Abbildungen

Abb. 1:	Durch den Einbau eines Ionenkanals induzierte Effekte in der LDS	12
Abb. 2:	Schematischer Methodenvergleich zur Ionenkanalanalytik	15
Abb. 3:	Lipid-Vesikel-Array	16
Abb. 4:	Anregung von Oberflächenplasmonen in der KRETSCHMANN-Konfiguration	19
Abb. 5:	Aufbau des SPR-Imaging-Messplatzes	22
Abb. 6:	Relative Verschiebung des Resonanzwinkels in Abhängigkeit zur Konzentration einer NaCl- und KCl-Lösung	25
Abb. 7:	Änderung der Metallionenkonzentration innerhalb der Pore nach einem Schaltzyklus eines nAChR in Abhängigkeit vom Durchmesser der Pore	26
Abb. 8:	Zeitliche Änderung der relativen Verschiebung des Resonanzwinkels durch Änderung der KCl-Konzentration und Spülen mit Reinstwasser	27
Abb. 9:	Berechnete relative Intensität der Oberflächenplasmonen an einer Grenzschicht	29
Abb. 10:	Volumenelement einer zylindrischen Pore und Berechnung der Einstellzeit	30
Abb. 11:	(A) SPR-Bild von wassergefüllten Mikroporen, (B) mit 5mM KCl-Lösung gefüllt und (C) Differenzbild	33
Abb. 12:	Normierte Intensität der Pixel im SPR-Bild	34
Abb. 13:	Verhältnis der mittleren Reflektivität Pore/ Matrix als Funktion der K^+ -Konzentration	35
Abb. 14:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer PE-Kernspurmembra	36
Abb. 15:	Reflektometrisch bestimmte PMMA-Schichtdicken	38
Abb. 16:	Ausgewählte Mikrostrukturierungstechniken mit Strukturdimension	40
Abb. 17:	Reaktionsschema zur initialen Radikalbildung	41
Abb. 18:	Sekundäres Reaktionsschema mit Bruch der Hauptkette	42
Abb. 19:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Teststrukturen mittels EBL	43
Abb. 20:	Auflichtmikroskopische Aufnahme eines belichteten Poren-Bereiches und FTIR-3D-Bild im Bereich 1680cm^{-1} bis 1760cm^{-1} .	44
Abb. 21:	UV-Spektrum eines PMMA-Filmes und Darstellung der relativen Emissionsspektren verschiedener Lichtquellen im UV-Bereich	45
Abb. 22:	Prozess-Schritte zur Herstellung der Sensor-Array-Oberfläche durch UV-Lithographie	46
Abb. 23:	Abbildungstreue am Beispiel einer hexagonalen Pore	47
Abb. 24:	Auflicht-Mikroskopische Aufnahme einer hexagonalen Mikrostruktur und SEM-Bild	48
Abb. 25:	SPR-Bild einer hexagonalen Mikrostruktur	49
Abb. 26:	FTIR-Spektrum von PMMA auf Gold	51
Abb. 27:	Integrale Extinktion im Bereich der Carbonyl-Schwingung mit Profilschnitt und E_R -Wert der Zentroid-Spektren	51
Abb. 28:	FTIR-Imaging Messungen von Mikrostrukturen mit Xenon- und mit D_2 -Lampe	53
Abb. 29:	Abhängigkeit des prozentualen Verhältnisses der E_R -Werte des Poren-Zentroid-Spektrums zum E_R -Wert des Zentroid-Spektrums des Stegs von der Strahlungsdosis	54
Abb. 30:	Mehrschichtsystem mit reflektometrisch bestimmten Schichtdicken und Resistprofil	56
Abb. 31:	Prozentuales Verhältnis der E_R -Werte von Poren-Zentroid-Spektrum zu Zentroid-Spektrum der Stege nach Entwicklung in verschiedenen Entwicklersystemen	58
Abb. 32:	Abhängigkeit der E_R -Werte in den Poren von der Entwicklungszeit in MIBK:ISO	59
Abb. 33:	E_R -Werte (C=O-Bande) der Zentroid-Spektren	60
Abb. 34:	Resist-Abtrag durch Ätzen im Luft-Plasma	61
Abb. 35:	AFM-Bild und Oberflächenprofil des Porenbodens in einer PMMA-Mikropore	63
Abb. 36:	3D-AFM-Bild einer PMMA-Mikrostruktur mit $20\mu\text{m}$ breiten Poren	64
Abb. 37:	SEM-Aufnahme einer aufgedampften Gold-Schicht	64

<i>Abb. 38: Lage des Maximums der C=O-Bande einer PMMA-Mikrostruktur im FTIR-Bild</i>	65
<i>Abb. 39: Bindungskonformationen der Estergruppierung von PMMA auf Gold</i>	66
<i>Abb. 40: Schicht-System mit Adhäsions-Blocker und Entwicklung der Blockerschicht</i>	66
<i>Abb. 41: Auflichtmikroskopische Aufnahme der PMMA-Matrix nach den Entwicklungen I und II unter Verwendung von PEG als Adhäsionsblocker</i>	68
<i>Abb. 42: SEM-Aufnahmen der Mikrostrukturen unter Verwendung von Agarose als Adhäsionsblocker nach Entwicklung I und nach Entwicklung II</i>	69
<i>Abb. 43: Vergleich der optischen Schichtdicken nach Entwicklung I und nach Entwicklung II</i>	70
<i>Abb. 44: SPR-Bilder und Verteilung der Weisswerte im Bereich hexagonaler Poren von PMMA-Matrizes</i>	71
<i>Abb. 45: SPR-Bilder von PMMA-Matrizes unter dem Einsatz verschiedener Adhäsionsblocker</i>	73
<i>Abb. 46: SPR-Bild einer Mikrostruktur mit einem Porendurchmesser von 3µm und Histogramm</i>	74
<i>Abb. 47: AFM-Aufnahme einer 3µm Porenstruktur und Profilschnitt</i>	75
<i>Abb. 48: Chelatbildner zur Komplexierung von Alkali- und Erdalkali-Ionen</i>	77
<i>Abb. 49: Aufbau der Sensoroberfläche mit adsorbierter 2-(Benzylsulfid)-18-Krone-6</i>	78
<i>Abb. 50: FT-IRRAS Messung des adsorbierten Mercaptomethyl-Kronenethers</i>	79
<i>Abb. 51: Einfluss von Ethanol im Bereich der PMMA-Matrix auf die Bandenlage der ν_{as} C-O-C</i>	81
<i>Abb. 52: ν_{as} C-O-C-Bande von adsorbiertem Mercaptomethyl-Kronenether im Porenbereich</i>	81
<i>Abb. 53: Valenzschwingungsbereich der CH-Banden von adsorbiertem Mercaptomethyl-Kronenether im Porenbereich</i>	82
<i>Abb. 54: Relative Verschiebung des Resonanzwinkels der SP-Kurven durch wässrige NaCl-, KCl- und CaCl₂-Lösungen auf der freien bzw. modifizierten Goldschicht</i>	84
<i>Abb. 55: Schematische Darstellung von Membran-Modellen zur Erzeugung porenüberspannender Lipiddoppelschichten</i>	88
<i>Abb. 56: Strukturformel des Fluoreszenzmarkers Marina Blue® DHPE</i>	90
<i>Abb. 57: Fluoreszenzaufnahme des markierten Lipids auf PMMA</i>	91
<i>Abb. 58: Kontaktwinkelmessungen auf trockenen bzw. gequollenen Oberflächen</i>	92
<i>Abb. 59: Fluoreszenzaufnahmen der Lipidschicht in Pufferlösung auf PMMA</i>	93
<i>Abb. 60: Strukturformel von Chitosan</i>	94
<i>Abb. 61: Kontaktwinkelmessungen auf trockenen bzw. gequollenen Biopolymeroberflächen</i>	94
<i>Abb. 62: Fluoreszenzaufnahme von markiertem Lipid auf Glas, Agarose und Chitosan</i>	95
<i>Abb. 63: Aufstempeln der Lipidschicht und Ausdünnen zu einer p-LDS</i>	97
<i>Abb. 64: Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe - Marina Blue® DHPE und Fluorescein</i>	99
<i>Abb. 65: Fluoresceinmarkierte Pufferlösung in verschlossenen Mikroporen</i>	99
<i>Abb. 66: Fluoreszenzaufnahme von markiertem Lipid und markiertem Puffer innerhalb der Mikroporen</i>	100
<i>Abb. 67: Fluoreszenzaufnahmen nach Trennung der Fluoreszenzkomponenten</i>	101
<i>Abb. 68: Fluoreszenzaufnahmen nach einer Minute Spülen</i>	101
<i>Abb. 69: 50%-Stabilität der p-LDS in Abhängigkeit vom Porendurchmesser</i>	102

Tabellen

<i>Tabelle 1:</i>	<i>Berechnete Ausbreitungslänge der SP-Welle für verschiedene Dielektrika</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 2:</i>	<i>Gruppierung und Kurzbeschreibung ausgewählter Mikrostrukturierungstechniken</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 3:</i>	<i>Bandenzuordnung für das FTIR-Spektrum von PMMA</i>	<i>50</i>
<i>Tabelle 4:</i>	<i>Entwicklersysteme für belichtetes PMMA</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 5:</i>	<i>Adsorption von PMMA auf verschiedenen Metallen</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 6:</i>	<i>Testverbindungen für eine Adhäsionsblockerschicht</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 7:</i>	<i>Membran-Modelle und deren biologisch relevante Eigenschaften</i>	<i>89</i>
<i>Tabelle 8:</i>	<i>Vergleich der Auftragechniken auf dem mikrostrukturierten Sensor-Array</i>	<i>98</i>

Abkürzungen

AFM	(engl.) Atomic Force Microscopy - Atomfeldkraftmikroskopie
ATR	(engl.) Attenuated Total Reflection – Abgeschwächte Totalreflexion
BEE	2-Butoxy-2-Ethoxyethanol
BLM	(engl.) Black Lipid Membrane
Chol	Cholesterol
EBL	(engl.) Electron Beam Lithography – Elektronenstrahl-Lithographie
EC	Ethylencarbonat
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie
FCS	(engl.) Fluorescence Correlation Spectroscopy – Fluoreszenz-korrelationspektroskopie
FT-IR	Fourier-Transformation-Infrarot
FT-IRRAS	Fourier-Transformation-Infrarot-Reflexions-Absorptionsspektroskopie
IBL	Ion Beam Lithography - Ionenstrahlolithographie
IR-	Infrarot-
ISO	Isopropanol
LDS	Lipiddoppelschicht
MEK	Methylethylketon
MIBK	Methylisobutylketon
MW	Molekulargewicht
nAChR	Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
PC	Polycarbonat
PCh	Phosphatidylcholin
p-LDS	porenüberspannende Lipiddoppelschicht
PM-IRRAS	Phasenmodulierte Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
PMMA	Poly(methyl)methacrylat
RT	Raumtemperatur (20°C)
SA	(engl.) Self assembly
SAM	(engl.) Self assembly Monolayer
sBLM	(engl.) supported bilayer lipid membrane
SEM	(engl.) Scanning Electron Microscopy - Rasterelektronenmikroskopie
SF	Schweres Flintglas
SPR	(engl.) Surface Plasmon Resonance - Oberflächenplasmonenresonanz
tBLM	(engl.) tethered Bilayer Lipid Membrane
TEM	(engl.) Tunnel Electron Microscopy
tp-LDS	chemisch gebundene porenüberspannende Lipiddoppelschicht
UV	ultraviolett
VIS	(engl.) visible - sichtbar
XPS	(engl.) X-ray Photoemission Spectroscopy

1 Einleitung

Membranproteine zeigen eine gemeinsame Eigenschaft: Ihre Molekülstruktur ist teilweise in eine Lipiddoppelschicht (LDS), die Lipidmembran, eingebettet. Sie sind an Grenzflächen lokalisiert und damit an der Kommunikation zwischen beiden Seiten der LDS beteiligt. Rezeptoren, Poren und Ionenkanäle sind Signal-Transducer [1].

Ionenkanäle sind in viele wesentliche Prozesse in der Zelle involviert. Durch die Aktivierung der Ionenkanäle können entweder Reize weitergeleitet werden oder es kann die Kommunikation zwischen Zellen stattfinden [2]. Ionenkanäle können transmembrane und intrazelluläre Signalprozesse der Zelle initiieren [3] bzw. intrazelluläre Signalkaskaden auslösen [4]. Darüber hinaus sind Ionenkanäle nicht nur in der Zellmembran lokalisiert, sondern kommen auch in den Membranen anderer Zellorganellen, z.B. den Mitochondrien oder den Chloroplasten vor. Durch Aktivierung öffnen sich diese Proteine zu Kanälen und stellen eine direkte Verbindung des extrazellulären mit dem intrazellulären Raum her. Es fließen je nach Art des Ionenkanals entweder positiv oder negativ geladene Ionen durch den geöffneten Kanal.

Die Aktivierung der Ionenkanäle erfolgt spannungsgesteuert durch Änderung des elektrischen Potentials über der Zellmembran, durch mechanischen Stress oder sie wird chemisch stimuliert, z.B. ligandgesteuert. Bei chemischer Stimulation binden Moleküle, die Liganden, an den Ionenkanal und aktivieren die Öffnung des Kanals.

Die Aktivierung der ligandgesteuerten Ionenkanäle erfolgt zunächst durch hochselektive Bindung zu einem oder auch mehreren Liganden. In einem zweiten Schritt öffnet sich die Kanalpore eine bestimmte Zeit lang, um sich danach wieder zu schließen. Während der Öffnungsphase strömen Ionen aufgrund ihres Potenzialgefälles und der Selektivität des Membranproteins durch den Kanal. Nur wenn alle Teilschritte erfolgen, ist die volle Funktionsfähigkeit des Ionenkanals gewährleistet. Insgesamt werden durch die Bindung der Ligandmoleküle an das Kanalprotein Ionenströme mit bis zu 1.000.000 Ionen pro Sekunde ausgelöst. Die ligandgesteuerten Ionenkanäle weisen daher einen sehr großen Verstärkungsfaktor auf und können einfach und sicher aktiviert werden [3].

Ihre biochemische Relevanz macht Ionenkanäle zu wichtigen Zielobjekten. Medizinische Untersuchungen finden immer neue Involvierung von Ionenkanälen bei Krankheiten des Zentralnervensystems (z.B. Parkinson, Alzheimer, Epilepsie), an der Verbindungsstelle von Nervenzelle mit Muskelzelle (z.B. Myasthenia Gravis, Maligne Hyperthermie) und bei kardialen Arrhythmien (z.B. Long QT Syndrom, Brugada Syndrom) bestätigt [5]. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass nicht nur infektiöse Krankheitserreger an Membranproteinen angreifen, sondern auch die Tumorzellmigration, die Tumorzellinvasion und Metastasierung von einem β_2 -adrenergen Rezeptor und dessen Neurotransmitter beeinflusst werden [6].

Hauptinteressenten an der Ionenkanalforschung stellen somit die Pharmaindustrie und die Medizin dar. Zum Einen werden die tatsächlichen Angriffsorte von Pharmaka untersucht, sogenanntes Pharmascreeing. Zum Anderen können klinische Diagnosen erstellt werden. Des Weiteren werden neue Zielmoleküle für die Erforschung neuer Pharmaka getestet.

Ein weiterer wichtiger Forschungsbereich versucht Ionenkanäle in Biosensoren zu integrieren, um Toxine zu identifizieren und in geringsten Dosen nachzuweisen (Toxinscreening), wobei ein fließender Übergang zu Sektoren wie Überwachung und Sicherheit, auch militärische, Lebensmittelanalytik und Qualitätskontrolle beobachtet wird. Natürliche Ionenkanäle stoßen auf hohes Interesse im Bereich der Nanoforschung und Nanobiotechnologie, da sie hocheffektive molekulare Schalter darstellen.

1.1 Zielstellung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll ein Biosensor-Array entwickelt werden, das den Nachweis der biologischen Funktionsfähigkeit von Ionenkanälen am Beispiel des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors (nAChR) erbringen kann. Der ligandgesteuerte Ionenkanal wird auf Grund seiner Robustheit in extrazellulärer Umgebung und seiner Verfügbarkeit ausgewählt [7].

Der Ionenkanalsensor soll nach einem markierungs- und zerstörungsfreien Prinzip arbeiten. Ein für diese Arbeit entscheidendes Ziel besteht in der Kopplung eines Polymers an eine optische Transducerschicht und der Erzeugung einer Mikrostruktur in der Polymerschicht. Die Mikrostruktur enthält die Detektionsvolumina und gestattet durch die Flächenauflösung im Array parallele Einzelkanalmessungen. Das Sensor-Array muss unter physiologischen Bedingungen stabil sein und reproduzierbar ausgelesen werden können.

Die Arbeiten am Ionenkanalsensor-Array werden vom Aufbau eines Oberflächenplasmonenresonanz-Imaging-Messplatzes zur Detektion der Funktionsfähigkeit der Ionenkanäle und der Entwicklung von geeigneten Auswertungsmethoden begleitet.

Der nAChR behält seine vollständige Funktionsfähigkeit als membrandurchspannendes Protein nur in einer biomimetischen Lipidschicht. Um die Ionenkanäle auf dem Sensor-Array mit seinen Mikroporen zu platzieren, ist deshalb die Verschmelzung der künstlichen Sensor-Arrayoberfläche mit einer Lipidschicht notwendig. Bisher beschriebene Verfahren, wie das Aufschmelzen von Vesikeln [8], die Langmuir-Blodgett-Technik [9] und ihre Varianten oder das Zwei-Kammer-Verfahren [10], eignen sich nicht zum Aufspannen der LDS über den Poren der Polymermatrix. Es ist daher ein Verfahren zu entwickeln, mit dem die Erzeugung einer stabilen LDS über den Mikroporen gelingt. Die Haltbarkeit der LDS und Defekte im Lipid werden zu entscheidenden Kriterien für die Durchsetzung des Ionenkanalsensor-Arrays in der praktischen Anwendung und sollen bestimmt werden.

1.2 Gewinnung von Ionenkanälen und Übertragung in Lipidschichten

Die Gewinnung von Ionenkanälen erfolgt aus biologischem Material. Der nAChR wird aus dem elektrischen Organ des atlantischen Zitterrochens *Torpedo marmorata* gewonnen. Die Isolierung und Aufreinigung wird nach einer Standardmethode [11] durchgeführt und ergibt native Membranvesikel mit einem Proteingehalt von 50-100µg/ml. Die Vorbehandlung sollte nicht zum Aktivitätsverlust des Proteins führen [12].

Bei bisherigen Untersuchungen an Ionenkanälen hat sich gezeigt, dass sie nur in einer intakten Lipidmembranumgebung aktiviert werden können. In gelöstem Zustand deproteinieren Ionenkanäle, so dass zwar unter Umständen noch ein Anbinden des Liganden beobachtet wird, jedoch kein Öffnen des Kanals wie unter physiologischen Bedingungen stattfindet [13].

Ionenkanal und Lipid zeigen starke Wechselwirkung zueinander. Daraus ergibt sich, dass die Zusammensetzung des Lipids, insbesondere die Mikrodomänenbildung, entscheidend die Funktionsfähigkeit des Proteins beeinflusst [14, 15]. Die Funktionsfähigkeit des nAChR bleibt in komplexen Lipidgemischen erhalten. Der Ionenkanal organisiert sich die unmittelbare Lipidumgebung selbst [16] und verändert deren Dynamik [17, 18]. Voraussetzungen dafür sind die Fluidität des Lipids und die Mobilität des Ionenkanals. Abb. 1 zeigt schematisch, wie die Lipidschicht vom Ionenkanal beeinflusst wird. In A) wird gezeigt, dass ein Ionenkanal sich die unmittelbare Lipidumgebung durch Sortierung von Lipidmolekülen optimal gestaltet. In B) ist die Länge des membranspannenden Proteins kleiner als die Dicke der LDS. Das Protein staucht Lipidmoleküle. Der entgegengesetzte Effekt der Streckung tritt auf, wenn das Protein, wie in C) einen größeren lipophilen Bereich als die Membrandicke aufweist.

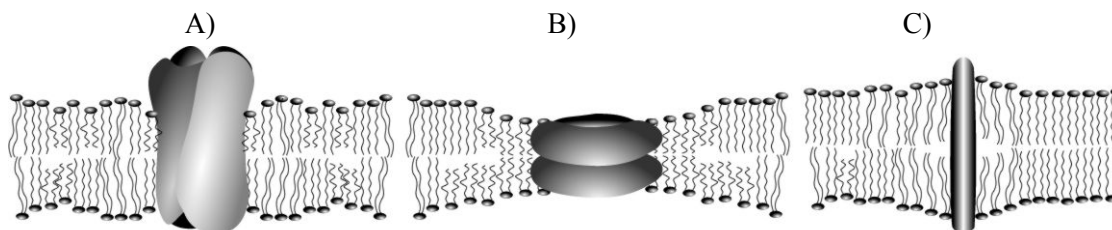


Abb. 1: Durch den Einbau eines Ionenkanals induzierte Effekte in der LDS: A) Sortierung B) Stauchung und C) Streckung der Lipidmoleküle.

Zusätzlich kann der Ionenkanal auf Veränderungen in der LDS mit einer Verkippung bezüglich der Lipidebene, mit Autoassoziation, mit einer Konformationsänderung im Gerüst, einer Änderung der Seitenkettenorientierung oder der Abwanderung in andere Lipidomänen reagieren [17, 19, 20]. Erhöhte Stabilität der Lipidschicht durch verminderte Fluidität ist aus Sicht des Ionenkanals nicht anzustreben.

Für die Übertragung von Ionenkanälen in eine geträgerte künstliche LDS wurden zwei Strategien beschrieben:

- Der gereinigte Ionenkanal lag solubilisiert vor. Er besaß noch immer einen Lipidgürtel, der den hydrophoben Molekülteil des Proteins umgibt. Der solubilisierte Ionenkanal wurde direkt auf die Lipidschicht übertragen [21]. Wichtige Faktoren für einen erfolgreichen Einbau waren die Konzentration und die Stabilität des Ionenkanals im Detergenz [22].
- Proteoliposomen wurden mit der Lipidschicht fusioniert. Dazu konnten entweder native Membranvesikel, die das Kanalprotein enthalten, eingesetzt werden [23] oder das Protein wurde in künstliche Lipidvesikel integriert [24]. Der Vorteil dieses Einbaus liegt darin, dass detergentenfreie Übertragung stattfindet [25]. Weiterhin ist der Funktionsverlust vom Protein geringer [26] und die Anzahl von Ionenkanälen pro Vesikel kann gezielt eingestellt werden [21]. Die Fusion der Proteoliposomen mit der LDS ist gut zu steuern und somit auch die Beladungsdichte mit dem Ionenkanal [12, 27].

Aus den Vorteilen der Fusionsmethode von Proteoliposomen ergibt sich, dass der nAChR mit dieser Methode kontrolliert und schonend in die LDS integriert werden kann.

Die Funktionsfähigkeit des nAChR und das Anströmen mit Ligandmolekülen setzt eine Einbaurichtung des Ionenkanals in einem Sensor voraus, bei der die Ligand-Bindungsstellen mit ligandhaltiger Lösung angeströmt werden kann. Die Einbaurichtung in der LDS entspricht bei Proteoliposomenfusion der Einbaurichtung im Vesikel und ist zufällig [21]. Um die Effizienz einer zufälligen Ausrichtung beim Einbau in die LDS zu erhöhen, wurden diejenigen Proteoliposomen affinitätschromatographisch abgetrennt, bei denen der Ionenkanal die gewünschte Ausrichtung besitzt [28, 29]. Diese separierten Vesikel werden mit der LDS fusioniert.

1.3 Analytik der Funktionsfähigkeit von Ionenkanälen

Mit markierten Liganden lassen sich Bindungsaffinitäten zwischen Ligand und Ionenkanal bestimmen. Die vollständige Funktionsfähigkeit des Kanalproteins kann jedoch nur vermutet werden [4]. So ist nicht auszuschließen, dass die eingesetzten Marker Konformationsänderungen im Protein hervorrufen oder zu veränderten Wechselwirkungen mit Liganden führen. Ein weiterer Nachteil liegt darin, dass nur Liganden mit hoher Affinität zum Kanalprotein sicher bestimmt werden können.

Das Verfahren der Oberflächenplasmonenresonanz- (engl.: surface plasmon resonance – SPR) Spektroskopie ermöglicht eine Detektion der Anbindung markierungsfreier Liganden an den Ionenkanal. Sie wird insbesondere als massensensitive Methode angewendet, um Wechselwirkungen von oberflächengebundenen Molekülen mit Analyten zu beobachten [4]. Damit weist sie gegenüber den fluoreszenzmarkierten Methoden eine wesentlich höhere physiologische Relevanz der Ergebnisse auf und ist in der Lage, einzelne Ionenkanalereignisse zu detektieren [30]. Eine miniaturisierte Variante ist in der Arbeit von SLAVIK et al. [31] ausgeführt. Die Funktionsfähigkeit des Proteins ist nicht nachgewiesen worden.

Zu den direkten Techniken zur Messung des Ionenstromes zählen die Patch-Clamp-Technik, die radioaktiven In-/Eflux-Techniken und einige fluoreszenzbasierte Methoden.

- Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik besitzt einen sehr hohen Informationsgehalt und physiologische Relevanz der Messungen. Sie wurde 1984 von SAKMANN und NEHER entwickelt [32]. Im pA-Bereich lassen sich mit der elektrophysiologisch arbeitenden Patch-Clamp-Technik sensitiv das Öffnen der Ionenkanäle und das Durchfließen von Ionen messen.

Die Anbindung eines Liganden kann nicht direkt sichtbar gemacht werden. Jedoch wurden und werden bis dato die wichtigsten Grundlagen und Erkenntnisse zur Funktion der Ionenkanäle mit der Patch-Clamp-Technik gewonnen, da sie direkt und bis hinab zum Einzelkanal-Niveau den Ionenstrom durch den Ionenkanal erfassen kann. In den letzten Jahren wurden für zellbasierte Anwendungen automatisierte Mehrkanal-Patch-Clamp-Messungen [33], auch transportable Varianten [34] und Patch-Clamp Messungen auf Chips [35] entwickelt. Sie gestatten einen höheren Probendurchsatz und maximal 16 parallelisierte Messungen.

- Radioaktive In-/Eflux-Techniken

Diese Techniken nutzen radioaktive Isotope von Ionen (häufigste Anwendung findet das $^{86}\text{Rb}^+$ -Ion für K^+ -Kanäle bzw. unspezifische Kationenkanäle), die durch aktivierte Ionenkanäle strömen. Sie werden nach dem Transport durch die Lipidschicht gesammelt und detektiert. Der Probendurchsatz ist bei verminderter Störanfälligkeit wesentlich größer als bei der Patch-Clamp-Technik. Nachteilig ist, dass die zeitliche Auflösung einer Messung im Sekunden- bis Minutenbereich liegt und die besonderen Richtlinien beim Umgang mit radioaktivem Material berücksichtigt werden müssen. Verschiedene radioaktive Isotope müssen für unterschiedliche Kanalselektivitäten eingesetzt werden. Es werden viele Ionenkanäle benötigt, um bei der Messung ein ausreichend hohes Signal/Rausch-Verhältnis zu erhalten.

- Fluoreszenzbasierte Methoden

Die wichtigsten beiden indirekten Methoden zur Messung von Ionenströmen durch Ionenkanäle nutzen die Änderung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit vom Membranpotenzial oder von der Ionenkonzentration. Der Fluoreszenzfarbstoff ist dabei in der Zellmembran bzw. im Cytosol der Zelle lokalisiert.

Bei der ersten Methode kommt es zu einer potenzialabhängigen Akkumulation/Umverteilung des Fluoreszenzfarbstoffes in der Lipidmembran, da das Potenzial über der Zellmembran durch das Durchströmen der Ionen verändert wird [36]. Die Änderung des Fluoreszenzsignals tritt jedoch erst Minuten nach der Änderung des Membranpotenzials auf. Die Nachweisgrenze liegt aufgrund der vielen Präparationsschritte im Vergleich zur Patch-Clamp-Technik um eine logarithmische Größenpotenz höher [37].

Mit ionenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen können intrazelluläre Ionenkonzentrationen detektiert werden. Am weitesten verbreitet sind die Ca^{2+} -sensitiven Indikatorfarbstoffe, die ihr Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit der Ca^{2+} -Ionenkonzentration ändern. Auch für andere Ionen gibt es inzwischen leistungsstarke Indikatorfarbstoffe [38].

Mit beiden Verfahren lassen sich Änderungen der Ionenkonzentration in der Zelle aufgrund des Öffnens der Ionenkanäle, der Bewegung der Ionen durch die Lipidmembran und der jeweiligen Folgereaktion des Fluoreszenzfarbstoffs nachweisen. Es lassen sich keine Aktivitäten im Einzelkanalbereich detektieren.

Bereits im Jahr 2001 wurde von den Abbott Laboratories eine Zell-Array-Technologie ($\mu\text{ARCS}^{\text{TM}}$) vorgestellt, mit welcher 10 000 Zellen pro Mikrotiterplatte mit potenzialgesteuerter Fluoreszenzänderung bestimmt werden können [39]. Weitere Bemühungen gehen in Richtung mikrofluider-chipbasierter Fluoreszenzmessungen an Zellen [40] und Einzelzellarrays auf Faserbündeln [41].

In Abb. 2 sind die oben genannten 6 Verfahren hinsichtlich des Probendurchsatzes (Probenzahl pro Zeiteinheit, Person und Messinstrument), des Informationsgehaltes und bezüglich ihrer Nachweisgrenze und des zukünftigen Entwicklungspotenzials dargestellt [33-41]. Unter Informationsgehalt der Methode sollen hier die verschiedenen Ergebnisse verstanden werden, die aus einer Messung einer einzelnen Probe gewonnen werden können, also beispielsweise kinetische Aussagen wie zeitliche Auflösung, Aussagen zu Gleichgewichtszuständen wie bei Fluores-

zenzmessungen mit mehreren Wellenlängen, der Detektion der Fluoreszenzintensität, Polarisation und Lebenszeit.

Informationsgehalt der Methode

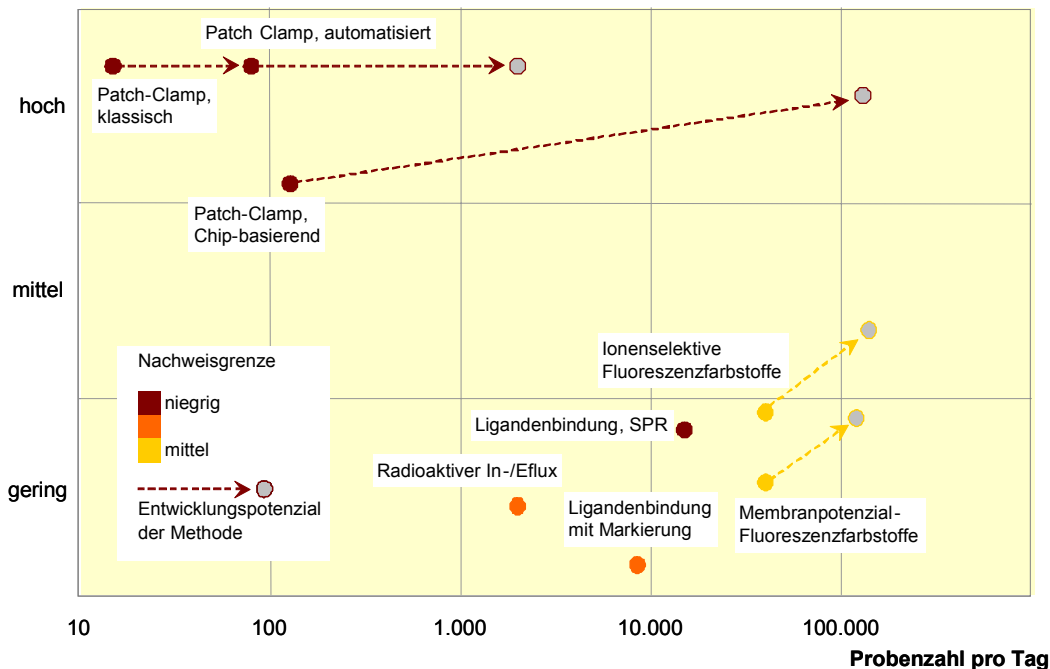


Abb. 2: Schematischer Methodenvergleich zur Ionenkanalanalytik bezüglich des Informationsgehaltes der jeweiligen Methode, des Probendurchsatzes und der Nachweisgrenze.

Die elektrophysiologischen Verfahren bilden hierbei eine Gruppe mit besonders hohem Informationsgehalt und niedriger Nachweisgrenze, da sich Einzelzellen bzw. Einzelkanalereignisse auslesen lassen. Die physiologische Relevanz der Ergebnisse ist hoch. Allerdings können pro Tag nur geringe Probenzahlen gemessen werden. Eine Alternative stellen Versuche zur Miniaturisierung dar, die erste parallele Bestimmungen der Proben ermöglichen.

Die In-/Eflux-Verfahren werden zunehmend von den elektrophysiologischen Verfahren mit hohem Probendurchsatz ersetzt. Ebenso wird für die Liganden-Bindungs-Methoden kaum eine Verbesserung erwartet [42]. Fluoreszenzbasierte Verfahren ermöglichen einen hohen Probendurchsatz, jedoch reicht der Informationsgehalt an elektrophysiologische Methoden nicht heran.

Die zukünftige Forderung an ein Verfahren besteht darin, bei hohem Informationsgehalt einen hohen Probendurchsatz pro Zeiteinheit zu gewährleisten. Weitere wichtige Kriterien sind die physiologische Relevanz der Ergebnisse, die Gesamtkosten, Robustheit, Spezifität und Flexibilität.

1.4 Ionenkanal-Sensoren

Für die Sensorentwicklung mit natürlichen Membranproteinen besitzen die ligandgesteuerten Ionenkanäle die größte Bedeutung. Sie sind in der Lage, Liganden spezifisch zu erkennen (hohe Selektivität) und aufgrund ihrer verstärkenden Wirkung (hohe Sensitivität), kann bereits ein einziges anbindendes Molekül zu einem analytisch messbaren Signal führen.

Der hohe Probendurchsatz, den die Forschungs- und Screeningaufgaben erfordern, kann von keiner der oben aufgeführten analytischen Methoden bewältigt werden. Die Entwicklung von Proben-Arrays ist unumgänglich. Gefordert werden derzeit Miniaturisierungen auf einem Chip zur simultanen Detektion der Interaktion einer Ionenkanalart mit zehntausenden Analytmolekülen bzw. zehntausenden verschiedenen Ionenkanälen mit einer Analytmolekülart [42].

Die extrazelluläre Untersuchung von Ionenkanälen kann erfolgen, indem das Kanalprotein in eine freistehende Lipidmembran (black lipid membrane - BLM) integriert wird. Die BLM weist geringe zeitliche Stabilität auf. Die Ionenkanäle müssen also in ihrer lipoiden Umgebung durch eine feste Oberfläche stabilisiert werden. Künstliche LDS sollen physikalische und chemische Schlüsseleigenschaften der Zellmembran, wie die Zusammensetzung des Lipids, das Fluiditätsverhalten, die Resistenz für nichtspezifische Proteinadsorption widerspiegeln und eine hohe Robustheit aufweisen. Hierfür werden prinzipiell drei unterschiedliche Varianten in der Literatur beschrieben:

- Direkte chemische Anbindung

Eine Entwicklungsrichtung der Ionenkanal-Sensoren geht dahin, dass der Ionenkanal direkt auf der Sensoroberfläche angebunden wird [43]. Es wird häufig der Verlust der Funktionsfähigkeit des Ionenkanals beobachtet, der bei direktem Kontakt mit einer festen Oberfläche denaturiert bzw. dessen räumliche Proteinstruktur durch die chemische Kopplung zu stark verändert wird [44]. In den letzten Jahren sind hierzu kaum noch Ergebnisse veröffentlicht worden.

- Anordnung von Vesikeln mit integriertem Ionenkanal

Eine andere Methode verwendet Lipid-Vesikel, um den Ionenkanal aufzunehmen [45, 46]. Die Vesikel werden im Arrayformat angeordnet. Entweder werden sie in die hydrophile Oberfläche des Sensors direkt eingebettet [47] oder mit Hilfe von Oligonukleotiden chemisch angebunden (Abb. 3). BOXER beschreibt in [48, 49] die Herstellung von mobilen fluoreszenzmarkierten Vesikeln in einer zweidimensionalen Anordnung, in welche integrale Membranproteine eingebettet werden könnten.

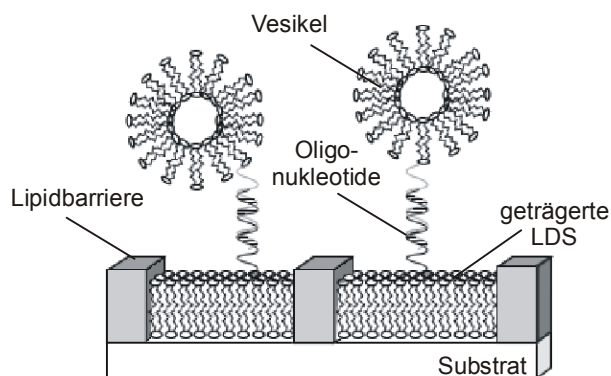


Abb. 3: Lipid-Vesikel-Array nach [48]. Die gebundenen Vesikel sind innerhalb der Lipidbarrieren mobil.

- **Geträgerte Lipidschichten**

Die bisher beschriebenen Methoden sind oftmals mit einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit des Ionenkanals verbunden. Insbesondere die starke Verminderung der Fluidität in der LDS ist für den Funktionsverlust verantwortlich [50]. Die Fluidität bleibt erhalten, wenn zwischen dem Substrat und der Lipidschicht eine dünne (5-10nm) Wasserschicht vorhanden ist, die die Beweglichkeit der Lipidmoleküle nur wenig einschränkt. Angelehnt an Protein-on-a-Chip-Verfahren werden deshalb Lipidspots direkt auf hydrophile Substrate aufgedruckt [51, 52].

Um eine Anordnung von getrennten LDS-Bereichen zu erhalten, werden Lipidbarrieren auf die Sensoroberfläche aufgebracht [53, 54]. Geeignete Materialien für die Barriere-Schicht sind beispielsweise Metalloxide bzw. Metalle. Mikrostrukturierte Bereiche innerhalb der LDS können auch erzeugt werden, indem Photopolymerisation von Diacetylen-Lipidmolekülen innerhalb der LDS durchgeführt wird [55]. Die Belichtung führt zu Photovernetzung. Unbelichtete Bereiche bleiben löslich und können anschließend durch ein anderes fluides Lipid ersetzt werden. Die Reichweite der Oberflächenwirkung des Substrates beeinflusst auch hier die Eigenschaften der integrierten Kanalproteine. Die physiologische Bedeutung der Ergebnisse ist gering, da die Integration der Membranproteine mit der LDS erschwert, die laterale Mobilität stark eingeschränkt ist und die Ionenkanäle verschlossen sind [51].

Zur Verwendung von Ionenkanälen bei der Sensorentwicklung wurden bisher viele Arbeiten veröffentlicht (einen Überblick bieten die Artikel von KEUSGEN [56] oder UMEZAWA [57]). Nur wenige Arbeiten bieten wirklich die Möglichkeit, parallele Messungen in Form eines Arrays durchzuführen. Allen gemeinsam ist die Stabilisierung der Lipidmembran durch eine feste Oberfläche, die meist das Kanalprotein stark beeinflusst. Auch zeigen die Anordnungen Inhomogenitäten in der Lipidschicht und viele Defektstellen. Vergleichend mit der relativ einfachen Verwendung von ganzen Zellen, die zu einem Array angeordnet werden, muss noch berücksichtigt werden, dass die Isolierung, Gewinnung und Aufreinigung der Ionenkanäle sehr komplex ist und die Stabilität der LDS nicht an die Robustheit ganzer Zellen heranreicht. Deshalb werden zellbasierte Systeme auch zukünftig eingesetzt [56], obwohl das Messergebnis bei Zellen komplex und daher schwierig zu interpretieren ist.

Die Detektion der vollständigen Funktionsfähigkeit des Ionenkanals kann derzeit nur durch die Kopplung elektrophysiologischer und optischer Verfahren erreicht werden [4]. Für die Parallelisierung der Messungen durch Verwendung eines Arrays sind optische Detektionsverfahren einzusetzen. Basierend auf optischen Fasern oder Wellenleitergeräten [58] wird ein Fluoreszenzsignal im Array detektiert oder die markierungsfreie SPR-Spektroskopie eingesetzt. Sie gilt als die viel versprechendste Methode hinsichtlich der zukünftig stark ansteigenden Probenzahlen, ihres geringen Probenbedarfs und ihrer hohen Sensitivität [56].

2 Optische Array-Detektion

Die bisher eingesetzten optischen Methoden detektieren entweder die Bindung des Liganden an den Ionenkanal oder eine Konzentrationsänderung innerhalb der Zelle, beispielsweise über das Membranpotenzial. Die Aktivierung des Ionenkanals wird bei beiden Strategien nicht direkt gemessen. Eine Detektion von Ionen, die durch den Ionenkanal hindurchströmen, nachdem ein Ligand am Kanal bindet, konnte noch nicht mit optischen markierungsfreien Methoden gezeigt werden.

Als massensensitive und zerstörungsfreie Methode wird das SPR-Imaging ausgewählt, um die Funktionsfähigkeit von Ionenkanälen zu zeigen. Die zugrunde liegenden biochemischen Prozesse am Kanalprotein gestatten es, eine Bindung des Liganden für die Aktivierung vorauszusetzen, wenn die Änderung des Dielektrizitätswertes als Folge einer Konzentrationsänderung von Ionen nach der Aktivierung des Ionenkanals gemessen wird.

Als schnelles und parallelisierbares optisches Verfahren eignet es sich zur Array-Detektion.

2.1 Oberflächenplasmonenresonanz

Die SPR kann als eine optische, oberflächensensitive Methode eingesetzt werden. Ein besonderer Vorteil der SPR ist, dass sie ohne zusätzliche molekulare Marker auskommt und deshalb als markierungsfreie Detektionsmethode vielfältige Anwendungen erfahren hat [59, 60]. Markierungsfrei zu arbeiten bedeutet zum einen, die zeitaufwendige Marker-Vorbehandlung der Verbindungen einzusparen und zum anderen, hochsensible Proteine nicht in ihrem nativen Zustand zu verändern.

Ein weiterer entscheidender Vorteil der Messung mit SPR gegenüber anderen optischen, markierungsfreien Methoden besteht in ihrer einfachen Durchführung. Erforderlich sind nur wenige optische Komponenten und die Auswertung der Messsignale ist vergleichsweise einfach [61, 62].

Eine detaillierte Beschreibung der theoretischen Zusammenhänge ist in [63] enthalten. Im folgenden wird lediglich auf die für den späteren Einsatz im Ionenkanalsensor-Array besonders wichtigen Kenngrößen näher eingegangen. Abb. 4 zeigt schematisch die Ausbreitung einer Oberflächenplasmonenwelle (SP-Welle) auf der Oberfläche einer dünnen Metallschicht.

Trifft Licht auf die Metallschicht, so können die Photonen ihre Energie auf die freien Elektronen übertragen. Die Elektronen schwingen mit der Frequenz und in der Richtung des elektrischen Vektors der einfallenden Lichtwelle. Da die Metallschicht sehr dünn ist, polarisieren die Elektronen durch ihre Schwingung die Metalloberfläche. Durch die gekoppelte Schwingung der Elektronen entsteht eine neue elektromagnetische Welle, die sich in dem Dielektrikum ausbreitet, das an die Metallschicht angrenzt. Diese Welle wird als Oberflächenplasmon bezeichnet. Die SP-Welle lässt sich vollständig mit der Maxwell'schen Theorie elektromagnetischer Wellen [64] und den Fresnel'schen Gleichungen beschreiben [65, 66].

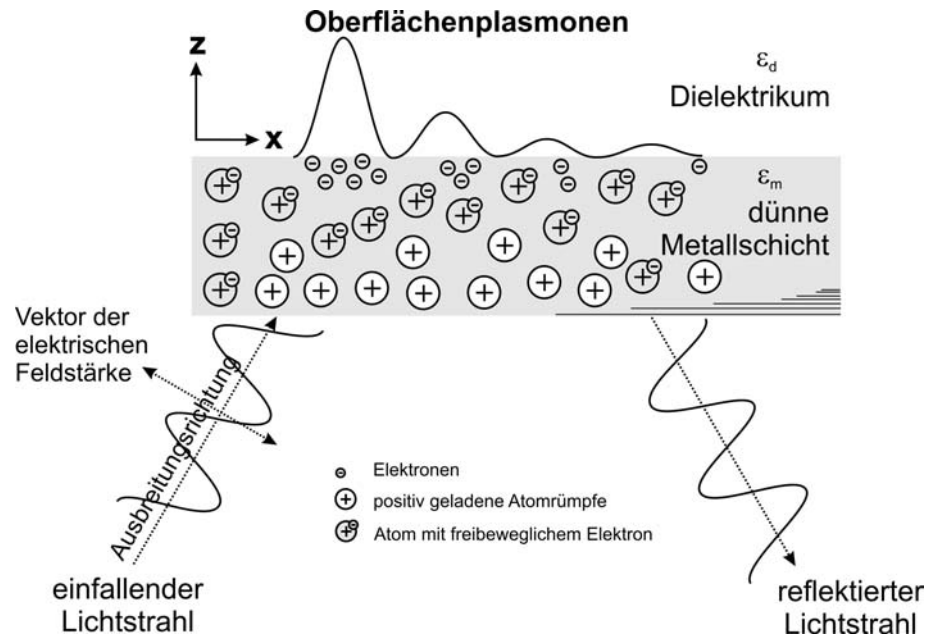


Abb. 4: Anregung von Oberflächenplasmonen durch Licht in der KRETSCHMANN-Konfiguration.

Grundsätzlich kann die SP-Welle nur dann angeregt werden, wenn die Ausbreitungsrichtung des Lichtes parallel zur Oberflächennormalen der Metallschicht verläuft und der Vektor der elektrischen Feldstärke senkrecht zur Oberflächennormalen steht. Jedoch führt der Einfall aus einem niedrigbrechenden Medium (zum Beispiel Luft) nicht zur Anregung der SP-Welle. Als einfache Lösung des Problems hat sich die Anregung der SP-Welle durch Totalreflexion von Licht, wie in Abb. 4 gezeigt, in einem Prisma erwiesen. Die Energieübertragung erfolgt durch das evaneszente Feld des totalreflektierten Lichtes. Die Kopplung kann in der OTTO-Konfiguration oder der nach KRETSCHMANN [67] erfolgen. Bei der sogenannten KRETSCHMANN-Konfiguration erfolgt die Kopplung direkt von einem Prisma in die dünne Metallschicht. Für die Ausbreitung in x-Richtung gilt die Beziehung [68, 69]:

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \tag{Formel 1}$$

k_x ist der Wellenvektor, ω die Kreisfrequenz des einfallenden Lichtes, c die Lichtgeschwindigkeit in Vakuum, ϵ_m die komplexe dielektrische Funktion des Metalls und ϵ_d die komplexe dielektrische Funktion des Dielektrikums.

Für den Wellenvektor in z-Richtung gilt der Ausdruck:

$$k_z = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d - \frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \tag{Formel 2}$$

Der Wellenvektor in z-Richtung wird rein imaginär, wenn gilt

$$\sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \geq \sqrt{\epsilon_d} \tag{Formel 3}$$

Dies bedeutet, dass keine Ausbreitung von Lichtenergie in z-Richtung erfolgt. Da k_x einen Realteil besitzt, breitet sich die Energie der elektromagnetischen Welle ausschließlich entlang der Grenzschicht in x-Richtung aus. Die SP-Welle ist eine strahlungslose Welle entlang der Metalloberfläche. Da k_x auch einen Imaginärteil besitzt, erfolgt eine Dämpfung der Plasmonenwelle. Entlang der x-Richtung nimmt die Intensität der Plasmonenwelle exponentiell ab. In der Praxis rechnet man mit der Ausbreitungslänge, die in Wirklichkeit die Länge für den Abfall der Intensität auf den Wert $1/e$ beschreibt. Für die Ausbreitungslänge L_x folgt die Beziehung [63]:

$$L_x = |2k_x|^{-1} \quad \text{Formel 4}$$

Analog hierzu ergibt sich der Abfall der Feldstärke der SP-Welle in z-Richtung, also für die Entfernung senkrecht zur Metalloberfläche [70]. Als Eindringtiefe der SP-Welle bezeichnet man die Länge L_z aus dem rein imaginären Wellenvektor k_z .

$$L_z = |k_z|^{-1} \quad \text{Formel 5}$$

Die Ausbreitung der SP-Welle wird wesentlich von den Eigenschaften des Dielektrikums bestimmt. Ändern sich die optischen Eigenschaften des Dielektrikums, so kommt es auch zu einer Veränderung der Anregung. Die Veränderung der Plasmonenanregung ist im reflektierten Licht leicht anhand der Verschiebung des Intensitätsminimums erkennbar. Für die Bestimmung der SPR misst man die Intensität des reflektierten Lichtes entweder winkelabhängig oder wellenlängenabhängig.

2.2 SPR-Imaging

Das SPR-Imaging lässt sich als eine Weiterentwicklung der nicht flächenaufgelösten Messung beschreiben. Grundsätzlich beruht auch das SPR-Imaging auf der Anregung und Ausbreitung von Plasmonenwellen in dünnen Metallfilmen. Um ein SPR-Bild aufzunehmen, muss die Anregung der SP-Welle mit einem monochromatischen, parallelen Lichtstrahl erfolgen [63]. Für die Aufnahme eines Bildes ist ein Array-Detektor erforderlich. Pro Pixel wird lediglich ein Intensitätswert des reflektierten Lichtes registriert. Da Einfallswinkel und Wellenlänge konstant sind, führt eine Verschiebung der SPR zu einer Veränderung der reflektierten Intensität. Unter Berücksichtigung der Ausbreitungslänge der SP-Welle ist die Verschiebung lokal begrenzt und tritt nur dort auf, wo auch Änderungen der optischen Eigenschaften eingetreten sind. Die Ausbreitungslänge begrenzt die laterale Auflösung des SPR-Bildes. Von dem Array-Detektor wird nun das SPR-Bild mit dem entsprechenden Muster des Hell-Dunkel-Kontrastes detektiert.

Mit SPR-Imaging können Unterschiede im Brechungsindex von weniger als 0,0001 oder Schichtdickenänderungen von ca. 1nm erfasst werden [36, 71, 72]. Somit können nicht nur Bindungsereignisse zwischen Biomolekülen auf einer Sensoroberfläche, sondern auch Domänen oder Änderungen in molekularen Monoschichten, wie in der Literatur beschrieben, mit einer lateralen Auflösung von wenigen Mikrometern erfasst werden [73].

Eingesetzt wird das SPR-Imaging vor allem bei der Untersuchung von Oberflächen und Grenzflächenphänomenen, insbesondere bei der Katalyse-, Korrosions-, Adhäsions- und Lubrikations-

forschung [74]. Jüngere Anwendungsgebiete findet das SPR-Imaging vorrangig in Screeningmethoden mit hohen Anforderungen an den Probendurchsatz, wie Multiplexsensoren und Hochleistungsarrays. In Affinitätssensor-Arrays können flächenaufgelöst die Wechselwirkungen bei der DNA- und RNA-Hybridisierung [70, 75] und auch zwischen Peptiden oder Proteinen abgebildet werden [76, 77]. Gleichfalls werden Wechselwirkungen zwischen Antibody-Antigen oder Enzym/Substrat(en) untersucht [71, 72]. Auch die Anbindung von Biomolekülen auf Oberflächen kann mit dem SPR-Imaging verfolgt und quantifiziert werden. Aufgrund der Eindringtiefe der SP-Welle in die Analytschicht von mehr als 100 nm müssen die Moleküle nicht direkt an der Metalloberfläche angebonden werden, sondern können auch über eine self-assembly (SA) Schicht immobilisiert werden [78].

Das SPR-Imaging erweitert beim Einsatz im Ionenkanalsensor-Array das Methodenspektrum der Zellforscher und Molekularphysiologen und eröffnet neue Strategien der Vielfach- und quantitativen Funktionsanalyse der Proteinaktivität, konformellen Dynamik und Proteinwechselwirkungen [79].

2.3 Array-Detektion

Die SPR lässt sich durch eine Vielzahl von Parametern optimal an die analytische Fragestellung anpassen. Die Auswahl einer Metallschicht, des geeigneten Prismenmaterials, dessen Form und einer leistungsstarken Lichtquelle sind notwendig. Eine zentrale Stellung nimmt immer die dünne Metallschicht ein. Um Oberflächenplasmonen anzuregen, muss der Betrag des Realteils der dielektrischen Funktion größer sein als der imaginäre Anteil [80]. Metalle, die diese Bedingung erfüllen, sind beispielsweise Edelmetalle. Je höher der betragsmäßige Unterschied beider Anteile ist, desto besser ist die Güte der SPR [65]. Die Güte resultiert sowohl aus der Schärfe der Resonanzkurve als auch aus dem maximalen Kontrastunterschied des reflektierten Lichtes in Abhängigkeit vom Einfallswinkel bzw. der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts [73].

Beim Einsatz in einem Biosensor muss die Metallschicht Kontaktbeständigkeit in wässrigen Salz- und Puffermedien aufweisen. Die Untersuchungen zur Kontaktbeständigkeit von frisch hergestellten Kupfer-, Silber- und Goldoberflächen auf Glasprismen zeigen unter physiologischen Bedingungen in Ringer-Pufferlösung, dass lediglich die Goldoberfläche eine ausreichende Stabilität zeigt. Die unedleren Metalle oxidieren an der Oberfläche. Es kann nur eine stark verschobene SPR bzw. kompletter Signalverlust beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb ausschließlich mit Goldschichten gearbeitet.

Auch die Qualität (Mikrorisse, Unebenheiten, Clusterstrukturen) und Dicke der Goldschicht beeinflusst direkt die Qualität der SPR. Die Schichtpräparation zeigt deutlichen Einfluss auf die Güte der SPR. Eine Verbesserung durch geringe Clustergröße lässt sich durch langsame Abscheidung bei geringen Temperaturen erzeugen. Je homogener die Goldschicht, desto besser die Güte der SPR. Die Untersuchung zum Einfluss der Goldschichtdicke ergibt eine schmale SPR-Funktion mit hohem Intensitätsabfall für 45nm bis 50nm. Der Schichtdickeneinfluss wird ermittelt, da in der Literatur die Präparationsmethoden und Bedingungen sehr stark differieren [74, 81, 82]. Eine empfohlene haftvermittelnde Chromschicht wird nicht zwischen Glasprisma und Goldschicht aufgebracht, da das Edelmetall selbst genügend hohe Haftfestigkeit auf den Substraten besitzt. Zudem migriert das Chrom irreversibel ins Glas und verkürzt die Einsatzdauer der Prismen insbesondere bei häufiger neuer Schichtpräparation. Die Chromschicht bewirkt weiterhin die unerwünschte Verbreiterung und Dämpfung der SPR-Funktion.

Die optischen Eigenschaften des Prismas beeinflussen die Lage des Intensitätsminimums der Resonanzkurve, dem Resonanzwinkel [73]. Um Reflexionsverluste des Lichtes beim Ein- und Austritt aus dem Prisma möglichst gering zu halten, sollte das Licht rechtwinkelig auf das Prisma auftreffen. Voruntersuchungen zeigen, dass hochbrechende Glasprismen, von SF 6 bis SF 10, mit einem Winkel von 60° eingesetzt werden können.

Als Lichtquelle wird ein stabilisierter He/Ne-Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda=632,8\text{nm}$ verwendet, da die kurze Wellenlänge eine geringe laterale Auflösung ermöglicht und eine hohe Stabilität bei einer Strahldivergenz von $\leq 1,4\text{mrad}$ besitzt. Zudem ist die Justierung mit Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich einfacher.

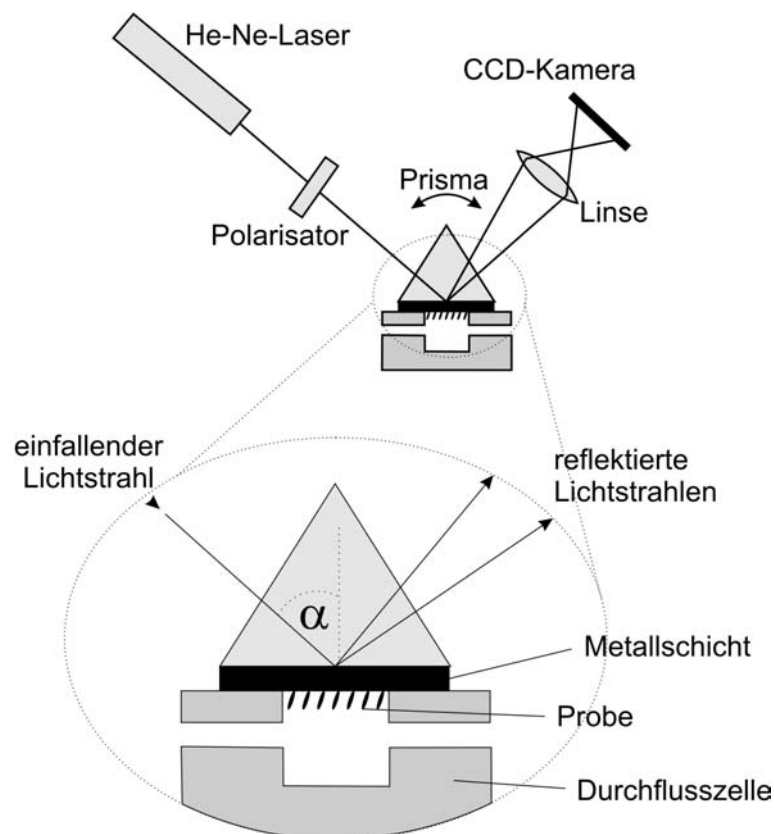


Abb. 5: Aufbau des SPR-Imaging-Messplatzes in Kretschmann-Konfiguration und Detaildarstellung des drehbaren Prismas mit Metallschicht und Probe.

Den verwendeten Geräteaufbau zeigt Abb. 5. Die Messung erfolgt auf der probenabgewandten Seite der Metallschicht. Dadurch sind ein gleichzeitiges Manipulieren und Charakterisieren der Probe möglich. Die Messung unter Durchflussbedingungen stellt keine besonderen Bedingungen an die Art des Probenmediums [36]. So können sowohl Zelllysate, Serum oder Puffer als Medium verwendet werden. Der Einfallswinkel kann durch das Drehen des Prismas mit der Durchflusszelle auf den entsprechenden Analyten justiert werden. Mit Hilfe der Linse wird das reflektierte Licht als vergrößertes Bild auf dem Chip einer CCD-Kamera abgebildet. Die Mikroporen des Polymerarrays können damit separat detektiert werden.

3 Aufbau des Ionenkanalsensor-Arrays

Der Aufbau des Ionenkanalsensor-Arrays soll vor allem berücksichtigen, dass das Kanalprotein in seiner natürlichen LDS-Umgebung - der Lipidmembran - untersucht wird. Hierdurch ergibt sich die hohe biologische Relevanz des Biosensors. Um nicht ganze Zellen vermessen zu müssen, wird ein Membranfragment in Form einer planaren LDS über einer Mikropore aufgespannt [83], die in eine Polymerfolie geätzt ist und ein beidseitiges Kontaktieren der biologischen Kompartimente mit physiologischer Pufferlösung gestattet. Die Funktionsfähigkeit des Ionenkanals bleibt bei dieser Anordnung erhalten, nicht zuletzt durch das Unterbinden der denaturierenden Wirkung einer festen Oberfläche bei Kontakt mit dem Kanalprotein.

Die Lipidschicht wird über den Mikroporen plaziert und schließt diese ab. Ein Stoffaustausch mit der Pufferlösung innerhalb der Mikropore kann nur noch durch die Aktivierung des Ionenkanals erfolgen. Die Wechselwirkung der künstlichen Sensoroberfläche mit der Lipidschicht entscheidet über die Stabilität der porenüberspannenden LDS.

Die Aktivierung des integrierten Ionenkanals durch Liganden löst einen Metallionenstrom in die Mikropore aus.

Die Detektion der Konzentrationsänderung in der Mikropore erfolgt über ein optisches Verfahren, das auf die Änderung des Dielektrizitätswertes in der Pufferlösung anspricht. Für das markierungsfreie optische Verfahren des SPR-Imagings muss eine Edelmetallschicht mit der Mikropore verbunden werden. Die Mikropore wird nun durch die Metallschicht zum geschlossenen System. Eingeströmte Ionen können das Detektionsvolumen nicht verlassen. Durch Integration eines einzelnen Ionenkanals pro Pore können damit Einzelkanalereignisse detektiert werden.

Das SPR-Imaging und die Anordnung mehrerer Mikroporen innerhalb einer Polymermatrix gestatten parallele Detektion mehrerer Einzelkanalereignisse. Der Ionenkanalsensor erhält Array-Format.

Aus der vorab anzustellenden Modellierung des Messsystems und der Simulation der Ionenkanalöffnung ergeben sich prinzipielle Erkenntnisse zur Leistungsfähigkeit des Sensors und für die Architektur der Polymermatrix.

3.1 Simulation der Einzelkanalmessung

Die Simulation der Aktivierung eines Ionenkanals am Beispiel des nAChR soll folgende Fragen klären:

- Zu welcher Änderung der Metallionenkonzentration führt die Aktivierung eines Ionenkanals innerhalb der Mikropore?
- Welche Anforderungen werden an die Detektion mit SPR-Imaging gestellt?
- Welche Parameter beeinflussen das Messergebnis?

Metallionen strömen durch das Kanalprotein in das Porenvolumen hinein und erzeugen dort eine Konzentrationsänderung in der Porenlösung. Die Änderung der Ionenkonzentration hängt hauptsächlich von der Ionenkanalanzahl pro Pore, ihrer Schaltzyklenzahl und der Öffnungsscharakteristik des Ionenkanals ab. Ebenfalls entscheidend ist die Größe des Porenvolumens, in welches die Ionen einströmen.

Im folgenden soll der Grenzfall betrachtet werden, bei dem ein nAChR pro Pore vorliegt und einmal aktiviert wird.

Die Berechnung der Anzahl der durchströmenden Ionen und die damit verbundene Konzentrationsänderung erfolgt für eine zylindrische Pore. Vereinfachend wird angenommen, dass nur einfach geladene Metallionen der gleichen Art durch den kationenselektiven nAChR strömen.

Aus Messungen in natürlichen Zellen ist bekannt, dass der nAChR insbesondere für Na^+ - und K^+ -Ionen eine hohe Leitfähigkeit besitzt. Auch zweiwertige Ionen, wie Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen, können durch den Ionenkanal strömen. Ihr Anteil am Gesamtstrom bei der Aktivierung des Ionenkanals ist jedoch gering [84]. Sie bleiben deshalb bei der Simulation einer Einzelkanalmessung unberücksichtigt.

Die durchschnittliche Leitfähigkeit G und mittlere Öffnungsdauer t des Ionenkanals wurden durch Patch-Clamp-Messungen mit 41 pS und 2 ms nach [85] bestimmt. Mit Hilfe der Avogadro Konstante N_A berechnet sich die Anzahl der durchströmenden Ionen aus deren Stoffmenge n_{Me^+} zu durchschnittlich $5,2 \cdot 10^5$ pro Aktivierung.

$$C_{\text{Me}^+} = \frac{n_{\text{Me}^+}}{V_P} = \frac{4Gt}{N_A e \pi h d^2} \quad \text{Formel 6}$$

In der Formel 6 gibt C_{Me^+} die Konzentration der Metallionen an, die ins Porenvolumen V_P eingeströmt sind. Mit h als Höhe der Polymerschicht und d dem Durchmesser der Pore wird das zylindrische Porenvolumen berechnet. Die Konstante e gibt die Elementarladung an.

Wird ein Porenvolumen von ca. $1 \mu\text{m}^3$ angenommen, ergibt sich die Konzentrationsänderung C_{Me^+} von rund 1mM an einfach positiv geladenen Metallionen. Je größer das Volumen der Poren gewählt wird, desto kleiner ist die resultierende Konzentrationsänderung der Metallionen.

Das minimale Volumen der Mikroporen wird durch das verwendete Mikrostrukturierungsverfahren bestimmt und das maximale durch die Nachweisgrenze des Detektionsverfahrens.

Die Änderung der Ionenkonzentration führt zur Änderung des Brechungsindex in der Pore. Wird die 1mM Konzentrationsänderung, die durch die Aktivierung des Ionenkanals erzeugt wird, mit Hilfe einer Salzlösung simuliert und die Änderung des Brechungsindex gemessen, kann die Verschiebung des Resonanzwinkels der Oberflächenplasmonen berechnet werden. Die Berechnung der SPR-Funktion einer KCl-Lösung (1mM, $n=1,3340$) und Wasser ($n=1,337$) im System SF6-Glas/Au/Dielektrikum ergibt eine theoretische Verschiebung des Resonanzwinkels von $0,03^\circ$ aus der experimentell mit dem ABBE-Refraktometer bestimmten Änderung des Brechungsindex (Anhang, Tabelle 9).

Die Bestimmung der theoretischen Nachweisgrenze des SPR-Detektionsverfahrens für wässrige K^+ - und Na^+ -Salzlösungen erfolgt im Modellversuch mit sinkender Konzentration. Da sowohl K^+ - als auch Na^+ -Ionen durch den nAChR strömen können, wird jene Ionenart zur weiteren Entwicklung des Sensor-Arrays ausgewählt, die sensitiver von der SPR-Messung erfasst wird.

Die Verschiebung des Resonanzwinkels der SP-Welle der beiden Konzentrationsreihen mit einer maximalen Konzentrationsänderung von 100mM zeigt Abb. 6. Der Terminus der relativen Verschiebung wird als Winkeldifferenz der jeweiligen SPR-Minima bezogen auf das SPR-Minimum von Reinstwasser verwendet.

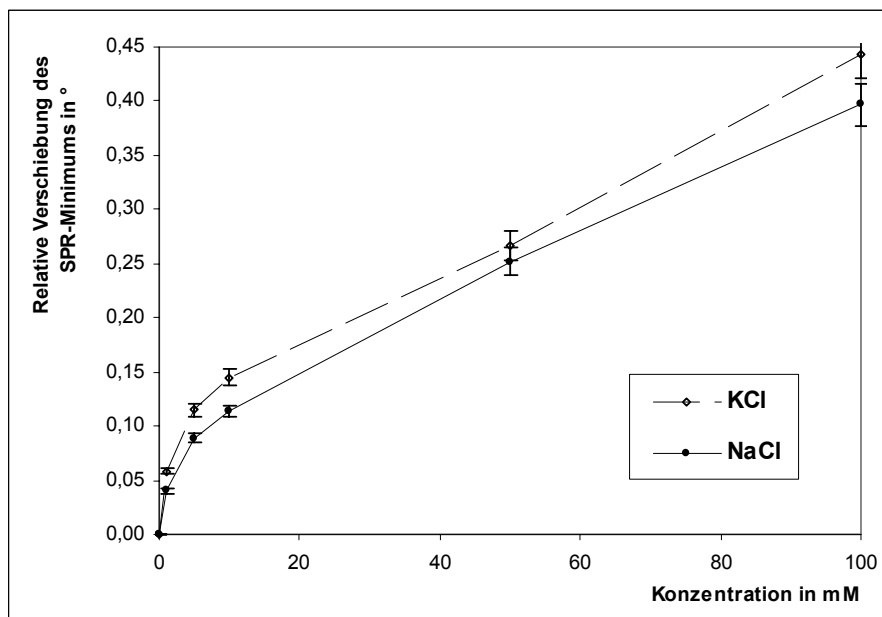


Abb. 6: Relative Verschiebung des Resonanzwinkels in Abhängigkeit zur Konzentration einer NaCl- und KCl-Lösung auf Gold.

Bei Salzkonzentrationen unter 10mM verschiebt sich der Resonanzwinkel der SP-Welle stärker als im fast linearen Kurvenbereich ab 10mM. Die Lösungen beider Ionenarten zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf. Allerdings weisen die KCl-Lösungen eine stärkere Verschiebung des Resonanzwinkels als die NaCl-Lösungen auf. Hieraus ergibt sich, dass die Detektion von K^+ -Ionen mit höherer Sensitivität erfolgen kann. Die relativen Verschiebungen des Resonanzwinkels für KCl-Lösungen von $\sim 0,003^\circ/\text{mM}$ im linearen Kurvenbereich ab 10mM ist größer als die voraus berechnete von $\sim 0,001^\circ/\text{mM}$, die sich aus den experimentell bestimmten Brechungsindexänderungen ermitteln lässt.

Dass sich experimentell höhere Werte bestimmen lassen als mit den Fresnel'schen Gleichungen berechnet, liegt möglicherweise daran, dass sich auf der Goldoberfläche eine Nernst'sche Doppelschicht ausbildet, die an der Oberfläche zu lokal höheren Änderungen der Dielektrizitätszahl führt als in der Salzlösung [90].

Wird die Konzentration einer wässrigen Salzlösung erhöht, steigt sowohl die Anzahl der Metallionen als auch die der Anionen. Zur Änderung des Brechungsindex tragen im Modellversuch beide Ionenarten bei. Da durch den kationenselektiven nAChR keine Anionen strömen, wird die Änderung des Brechungsindex nur von den durchgeströmten Metallionen hervorgeru-

fen. Die Änderung im gemessenen Brechungsindex müsste um den Beitrag der Anionen korrigiert werden. Da dieser Beitrag nicht bekannt ist, kann die Sensitivität der SPR-Messung nur näherungsweise vorhergesagt werden.

Zusammenfassend ergibt sich, dass eine hohe Sensitivität der SPR-Messung auftritt, wenn die ursprüngliche Ionenkonzentration in der Pore möglichst gering ist und unter 10mM liegt. Beim Einsatz natürlicher Kanalproteine muss allerdings die Denaturierung in Abhängigkeit der Mediumzusammensetzung berücksichtigt werden. Um den nAChR in nativem Zustand zu belassen, kann nicht mit Reinstwasser als Probenmedium gearbeitet werden, sondern es werden physiologische Salzkonzentrationen, wie im Ringer-Puffer oder in physiologischer Kochsalzlösung, empfohlen [86, 87].

Auch das Volumen der Polymerpore beeinflusst die Konzentrationsänderung der Metallionen und damit die Nachweisgrenze. Es können zum einen die Filmdicke des Polymers, der Porendurchmesser und die Form variiert werden. Die Filmdicke des Polymers hängt von den Parametern des Spin-coating-Prozesses ab und kann vom Nanometer- bis in den oberen Mikrometerbereich erzeugt werden. Die Konzentrationsänderung im Porenvolumen ist umgekehrt proportional zur Dicke des Polymerfilmes. Mit sinkender Schichtdicke der Polymerfilme steigt der Aufwand für die Herstellung homogener Schichten schnell an, da beispielsweise die Qualität durch Schmutzpartikel stark vermindert wird (Reinstraumbedingungen).

Der Durchmesser der Poren hängt maßgeblich von der Leistungsfähigkeit des Mikrostrukturierungsverfahrens ab. Er zeigt quadratischen Einfluss auf das Porenvolumen und beeinflusst darüber hinaus die Stabilität der Lipidmembranen, die über den Poren aufgespannt werden sollen.

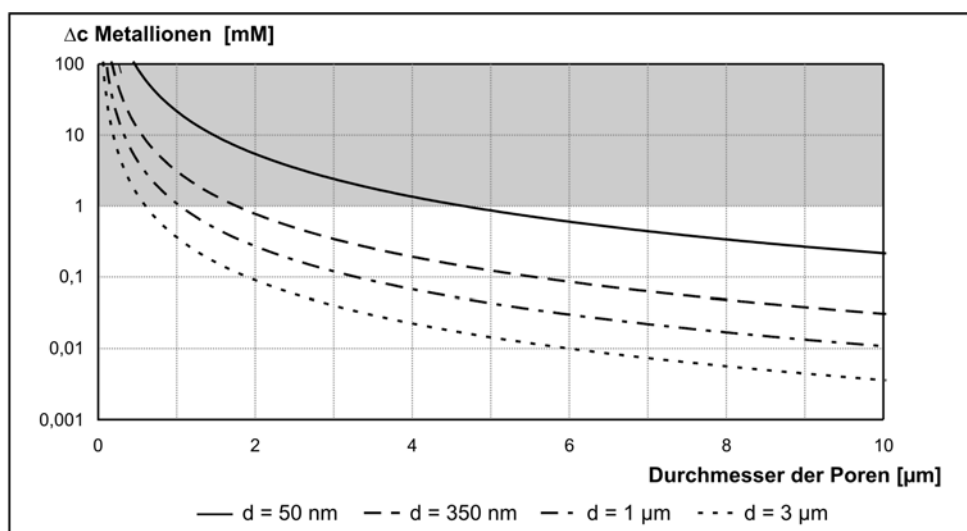


Abb. 7: Änderung der Metallionenkonzentration innerhalb der Pore nach einem Schaltzyklus eines nAChR in Abhängigkeit vom Durchmesser der Pore. Die Kurven sind für verschiedene Filmdicken d des Polymers berechnet worden. Grau unterlegt ist der Konzentrationsbereich, der mit SPR-Imaging detektierbar ist.

Aus Abb. 7 geht hervor, dass mit steigender Schichtdicke des Polymers die erzeugte Änderung der Ionen in der Mikropore sinkt. Die Poren werden dabei als Zylinder betrachtet. Grau unterlegt ist der nachweisbare Konzentrationsbereich der Ionen. Wird die Schichtdicke des Polymers

bei gleicher Porengrundfläche abgesenkt, steigt die Sensitivität des Detektionsverfahrens, da sich das Porenvolumen verringert. Damit lässt sich durch gezielte Wahl der Schichtdicke ohne Sensitivitätsverlust der Porendurchmesser variieren. Je größer die Schichtdicke des Polymers, desto geringer muss die Porengrundfläche gewählt werden. Abb. 7 zeigt, dass bei einer Schichtdicke von 350 nm ein Porendurchmesser von höchstens $2\mu\text{m}$ eingesetzt werden kann.

Das nachfolgende Experiment zeigt, ob die Salzlösung auf der Metalloberfläche zu einer irreversiblen Änderung führt oder ob sich die Sensoroberfläche regenerieren lässt. Die zeitliche Änderung des SPR-Signals ist in Abhängigkeit von der Konzentration einer wässrigen KCl-Lösung und anschließendem Spülen mit Wasser dargestellt (Abb. 8).

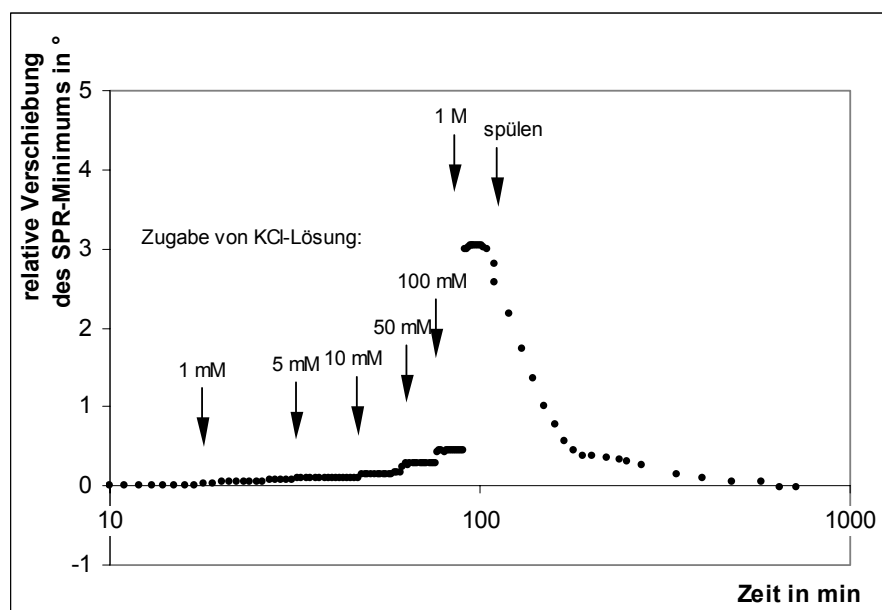


Abb. 8: Zeitliche Änderung der relativen Verschiebung des Resonanzwinkels durch Änderung der KCl-Konzentration und Spülen mit Reinstwasser.

Durch das Spülen kann das Ausgangssignal wieder erreicht werden. Die Metalloberfläche unterliegt also keiner irreversiblen Veränderung durch den Kontakt mit der Salzlösung. Folglich ist eine Regenerierung des Sensor-Arrays und damit eine Mehrfachnutzung möglich.

Die Modellversuche und -berechnungen zeigen, dass eine Änderung der Ionenkonzentration mit SPR erfasst werden kann. Die Sensitivität der Messung liegt dabei im Bereich der Einzelkanalmessung eines nAChR. Mit Konzentrationsänderungen von K^+ -Ionen lässt sich eine vergleichsweise höhere Sensitivität der Messung erhalten als mit Na^+ -Ionen. Anhand der Porengeometrie lässt sich die erzeugte Konzentrationsänderung in der Mikropore und damit die Sensitivität des Sensor-Arrays gezielt einstellen.

Die Verwendung des Sensor-Arrays muss nicht auf einen einmaligen Einsatz beschränkt bleiben.

3.2 Architektur der Polymerschicht

Die laterale Auflösung der SPR-Messung und die Nachweisgrenze sind von der Dimensionierung der Porengrundfläche, der Stegweite, also dem Abstand zweier Poren voneinander, und der Schichtdicke der Polymerschicht abhängig. Die Porengrundfläche wird größer als die laterale Auflösung gewählt. Je kleiner das Porenvolumen ist, desto höher ist die Sensitivität der Detektionsmethode.

Näherungsweise entspricht die Ausbreitungslänge L_x der Auflösung des SPR-Imagings. In Ausbreitungsrichtung x parallel zur Metalloberfläche zeigen Oberflächenplasmonen exponentiellen Intensitätsabfall. Die Ausbreitungslänge wird von den optischen Parametern der Probe, der Metallschicht und dem Prisma beeinflusst [64].

Als Polymer wird das Standardresist Poly(methyl)methacrylat (PMMA) eingesetzt (die Begründung dieser Wahl enthält Kapitel 4). Die Ausbreitungslänge im Schichtsystem Glas/Metall/PMMA wird über Formel 1 berechnet. Tabelle 1 führt die berechneten Ausbreitungslängen auf einer Silber- bzw. Goldschicht auf. Die Dämpfung der Oberflächenplasmonen ist bei der Verwendung von Silber geringer, deshalb breiten sich die Oberflächenplasmonen hier weiter aus als für das entsprechende System mit eingesetzter Goldschicht. Die laterale Auflösung ist bei der Verwendung von Silber damit geringer als bei der Verwendung von Gold unter sonst identischem Transduceraufbau. Die bessere laterale Auflösung gestattet es, kleinere Poren mit höherer Flächendichte zu detektieren.

Die Ausbreitungslänge der SP-Welle für eine PMMA-Schicht auf Gold beträgt $1,5\mu\text{m}$. Wird als Dielektrikum stattdessen eine Wasserschicht angenommen, erhält man eine Ausbreitungslänge von $2,6\mu\text{m}$. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass der Porendurchmesser größer als die Ausbreitungslänge gewählt und damit wenigstens $2,6\mu\text{m}$ betragen wird.

Tabelle 1: Berechnete Ausbreitungslänge der SP-Welle für verschiedene Dielektrika für die Metallschichten Gold und Silber bei einer Wellenlänge von 632nm , einer Metallschichtdicke von 50nm und einer homogenen, unendlich dick angenommenen Schicht des Dielektrikums.

Dielektrizitätszahl für Silber ϵ_{Ag} $-18,31+0,51i$ Dielektrizitätszahl für Gold ϵ_{Au} $-8,93+1,08i$ [65]		Ausbreitungslänge L_x (μm)	
		Silber	Gold
Dielektrikum			
Luft ($n=1,000$)		42,5	7,0
Wasser ($n=1,333$)		16,7	2,6
PMMA ($n=1,540$)		10,2	1,5

Die SP-Welle besitzt in den PMMA-Stegen eine geringere Ausbreitungslänge als in den Poren. Die Stegweite muss mindestens der Ausbreitungslänge der SP-Welle im PMMA entsprechen (Formel 4) und damit eine minimale Länge von $1,5\mu\text{m}$ besitzen. Die Minimierung der Porendurchmesser und Stegweiten unter Beachtung der lateralen Auflösung führt zu einer maximalen Flächendichte im Ionenkanalsensor-Array, die wiederum die Grundlage für die Wirtschaftlichkeit des Sensor-Array-Einsatzes bildet.

Die maximale elektromagnetische Feldstärke besitzt die SP-Welle direkt an der Metalloberfläche. Die Intensität fällt im Dielektrikum in dessen Richtung exponentiell ab (Abb. 9). Als Ein-

dringtiefe L_z in Richtung z wird die Distanz von der Metalloberfläche bezeichnet, bei der die maximale Intensität der Oberflächenplasmonen auf $1/e$ gesunken ist (Formel 5). Damit ergibt sich die höchste Sensitivität der SPR auf Änderungen im Dielektrikum direkt an der Metalloberfläche [74].

Bei der Erfassung der Konzentrationsänderung der Metallionen im Porenvolumen ist der Einfluss anderer Dielektrika unerwünscht. Der geforderte Grad der Miniaturisierung macht die quantitative Kenntnis der Eindringtiefe der SP-Welle im Dielektrikum notwendig.

Die Eindringtiefe der SP-Welle in Richtung Dielektrikum wird über die Fresnel'schen Formeln berechnet. Sie sollte kleiner oder gleich der Polymerschichtdicke sein, da sonst die Information im detektierten Signal nicht aus dem Porenvolumen, sondern teilweise aus der Lipidschicht, vom Kanalprotein oder den Spüllösungen in der Durchflusszelle stammt. Die Berechnung der Eindringtiefe L_z wurde nach Formel 5 durchgeführt. Es ergibt sich eine Eindringtiefe der Oberflächenplasmonen in wässriger Lösung über der Goldschicht von 150nm. Für PMMA berechnet sich eine geringere Eindringtiefe von 110nm. Die minimale Schichtdicke des Polymers muss größer als die Eindringtiefe der Oberflächenplasmonen sein und somit mindestens 150nm betragen.

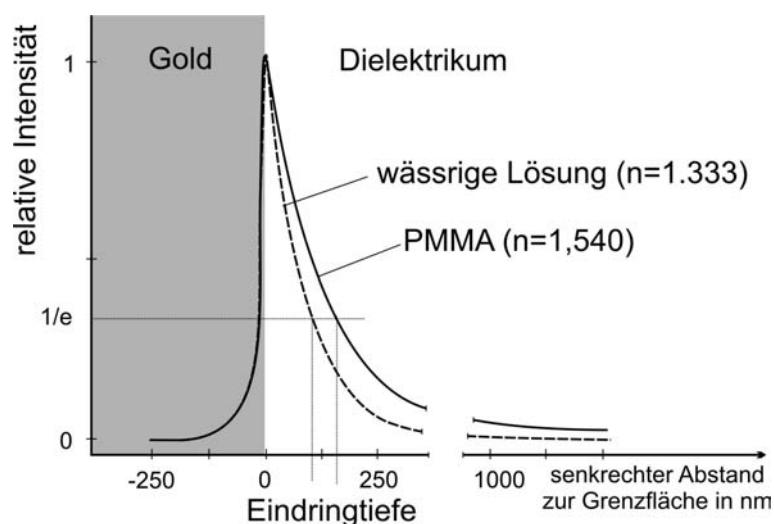


Abb. 9: Berechnete relative Intensität der Oberflächenplasmonen an der Grenzschicht von Metall zum Dielektrikum.

Zusammenfassend ergeben sich nun für die Dimensionierung die Architektur der Polymermatrix Angaben für geeignete Porendurchmesser, Stegweite und die Polymerschichtdicke:

Der zu wählende Porendurchmesser hängt über die Ionenkonzentrationsänderung sowohl von der Polymerschichtdicke, von der Leistungsfähigkeit des Mikrostrukturierungsverfahrens als auch von der Sensitivität des SPR-Imagings ab. Der Porendurchmesser wird möglichst klein gewählt, aber größer als die Ausbreitungslänge der SP-Welle von $2,6\mu\text{m}$, um keinen Signalanteil aus der polymeren Porenwand zu detektieren.

Aus den Modellberechnungen ergibt sich ein Bereich für die Variation der Polymerschichtdicke von mindestens 150nm bis maximal 290nm. Je größer die Schichtdicke des Polymers im Bereich gewählt wird, desto geringer muss der Porendurchmesser der Mikroporen gewählt werden. Unter Berücksichtigung der Ausbreitungslänge der SP-Welle bewirkt ein minimaler Poren-

durchmesser von $2,6\mu\text{m}$ bei zylinderförmigen Poren mit einer Polymerschichtdicke von maximal 290nm ein Signal innerhalb der geforderten Sensitivität. Die Steweite zwischen zwei benachbarten Poren in der Polymermatrix muss wenigstens $1,5\mu\text{m}$ betragen, um ein Übersprechen der SP-Wellen der benachbarten Poren zu vermeiden. Bei minimaler Steweite wird die Dichte der Detektionsvolumina pro Sensor-Array maximal.

3.3 Zeitliche Abhängigkeit der Ionenverteilung innerhalb der Pore

Innerhalb der Poren können sich die eingeströmten Ionen nur noch durch Diffusionsprozesse verteilen. Weil die Diffusion in der Regel ein langsamer Prozess ist, gilt die Einstellzeit als ein wichtiger Parameter. Sie gibt die Zeitdauer an, die vergeht, bis sich ein stationärer Zustand der Ionenkonzentration im Erfassungsvolumen eingestellt hat. Unter der Annahme einer zylindrischen Pore entspricht die Diffusionsstrecke bis zur Goldoberfläche maximal der Eindringtiefe der SP-Welle bzw. der gewählten Polymerschichtdicke.

Modelle für verschiedene Spezialfälle der Diffusion sind aus der heterogenen Katalyse bekannt [88]. Neben dem Modell der molekularen Diffusion wird die Normaldiffusion ausgeschlossen, da Porositäten und Labyrinthfaktoren in den geometrisch einfachen Poren des Ionenkanalsensor-Arrays keine Rolle spielen. Andererseits kann bei Poren, deren Durchmesser kleiner ist als die mittlere freie Weglänge der Ionen, der Diffusionsprozess erheblich beeinträchtigt werden [89]. Die Ionen kollidieren in diesem Fall (Knudsen-Diffusion) häufiger mit den Wänden der Pore als mit anderen Teilchen der Lösung. Da unter Normalbedingungen die Teilchen in Flüssigkeiten im Gegensatz zum Gasraum stets erheblich kleinere mittlere freie Weglängen besitzen, kann die Knudsen-Diffusion bei Porendurchmessern im Mikrometerbereich ausgeschlossen werden.

Es wird von einer ungestörten Diffusion der Ionen ausgegangen. Als Grundlage zur Berechnung der Einstellzeit wurde das 2. Fick'sche Diffusionsgesetz verwendet. Es stellt eine Differenzialgleichung zweiter Ordnung bezüglich des Raumes und erster Ordnung bezüglich der Zeit dar.

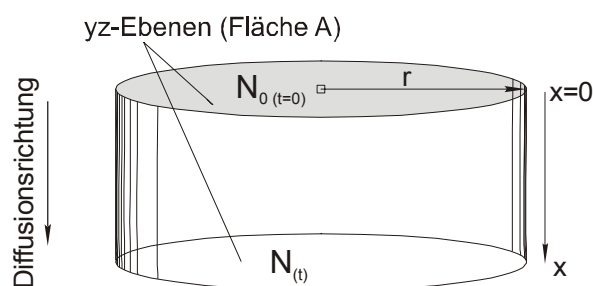


Abb. 10: Volumenelement einer zylindrischen Pore und Parameter für die Berechnung der Einstellzeit. Porenradius r beträgt $1,5\mu\text{m}$, Porentiefe x $0,35\mu\text{m}$, Anzahl der durch den Ionenkanal geströmten Ionen N_0 $5,118 \cdot 10^5$, Anzahl der Ionen im Volumenelement unter stationären Konzentrationsbedingungen N $1,462 \cdot 10^4$, Diffusionskoeffizient für K^+ -Ionen bei 298K , 101kPa in Wasser D_K $1,33 \cdot 10^{-9}\text{m}^2/\text{s}$.

Um zu einer Lösung zu gelangen, müssen zwei räumliche Randbedingungen und ein zeitlicher Anfangswert festgelegt werden. In Abb. 10 sind die Modellpore dargestellt und die verwendeten Parameter aufgelistet.

Für die Berechnung gelten folgende Bedingungen:

Bei $t=0$ halten sich alle Ionen (N_0) in der yz -Ebene mit der Fläche A bei $x=0$ auf. Die Konzentration ist überall endlich. Es sind stets N_0 Ionen im System vorhanden. Unter diesen Bedingungen lautet die Lösung der Diffusionsgleichung [90]:

$$N = \left(\frac{N_0}{A(\pi Dt)^{0,5}} \right) e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad \text{Formel 7}$$

In Formel 7 sind D der Diffusionskoeffizient, x der Abstand der Ionen von der yz -Ebene bei $x=0$, t die für das Erreichen stationärer Konzentrationsbedingungen benötigte Zeit, N_0 die Anzahl der Ionen zum Zeitpunkt $t=0$ und N die Anzahl der Ionen in der yz -Ebene bei x enthalten. Die Einstellzeit wird rekursiv über eine Zeitreihe ermittelt. Dafür wird t solange eingestellt, bis für die gegebene Anzahl der Ionen (N) ein identischer Wert auf der veränderlichen Seite der Gleichung erreicht wird.

Für die in der Abb. 10 angegebenen Werte lässt sich für die K^+ -Ionen eine Einstellzeit von $2,7\mu\text{s}$ berechnen.

Um den Einfluss der Vereinfachungen im genannten Diffusionsmodell abzuschätzen, wird die Einstellzeit mittels Monte Carlo Simulation für 1000 Ionen berechnet. Bei diesem Modellansatz kann berücksichtigt werden, dass die Ionen in einem quasi punktförmigen Volumen unterhalb des Ionenkanals in die Pore einströmen und thermische Eigenbewegungen ausführen. Nach $3\mu\text{s}$ hat sich bei dieser Modellberechnung ein stationärer Zustand bezüglich der Ionenkonzentration eingestellt.

Beide Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung. Aus der kurzen Einstellzeit lässt sich schlussfolgern, dass die Diffusion der Ionen innerhalb der Poren sehr schnell gegenüber dem Zeitbedarf für das Detektionsverfahren und dem Auslesen des Sensor-Arrays ist.

Beim Einsatz des Ionenkanalsensor-Arrays sollten auch die aus der Mikrofluidik bekannten Schwierigkeiten bei kleinen Strömungs- und Reaktionsvolumina berücksichtigt werden [91]:

- Ungleichmäßige, schlechte Oberflächenbenetzung
- Unerwünschte Wandabsorptionen
- Störungen durch Gasblasen.

Untersuchungsergebnisse hierzu sind in den nachfolgenden Kapiteln der vorliegenden Arbeit berücksichtigt worden.

3.4 Simulation der Array-Messung

Bisher werden SPR-basierte Methoden in der Ionenkanalanalytik zur Messung der Ligandenbindung am Kanalprotein eingesetzt. Das neue Sensorprinzip soll am Beispiel des nAChR nicht die Bindung, sondern die vollständige Aktivierung, also das Öffnen der Kanalpore und das Hindurchströmen von Ionen als Folge der Bindung des Liganden, detektieren. Der Einsatz als Sensor-Array fordert eine einfache, robuste Messmethode.

Beim SPR-Imaging wird die Änderung des Bild-Kontrastes bestimmt. Somit kann im einfachsten Fall eine Differenzmessung durchgeführt werden. Das bedeutet, dass einerseits zum gleichen Zeitpunkt zwei verschiedene Orte auf der Probe gemessen werden oder andererseits zu zwei verschiedenen Zeiten die gleiche Probenstelle analysiert wird.

Im erstgenannten Fall wird das SPR-Bild nach der Erhöhung der Ionenkonzentration in den Mikroporen der Polymermatrix (zur Erzeugung der Mikroporen s. Kapitel 4) durch die Aktivierung des Kanalproteins aufgenommen. Eine Mikropore dient als Referenzprobe. Die Ionenkonzentration soll in der Referenzpore konstant bleiben. Die Aktivierung der integrierten Ionenkanäle erzeugt in den Mikroporen eine Konzentrationsänderung von Metallionen. Aus der Änderung der Pixelintensität der jeweiligen Pore zur Pixelintensität der Referenzpore wird ein Kontrastunterschied ermittelt. Fehler, die durch unkontrollierte Änderung der Messbedingungen zwischen mehreren Aufnahmen von SPR-Bildern auftreten, besitzen keinen Einfluss auf die Qualität der Messung.

Das Verfahren ist sehr schnell. Eine unterschiedliche Beladung der Mikroporen im Sensor-Array ist bei diesem Verfahren notwendig, da die Referenzpore keinen Ionenkanal enthalten darf. Die Entwicklung eines hierfür notwendigen mikrofluidischen Steuer- und Dosiersystems gehört nicht zum Umfang der vorliegenden Arbeit.

In einem weiteren Verfahren wird die Aktivierung des nAChR durch die Differenzbildung der SPR-Bilder nach der Aktivierung des Ionenkanals B) und vor der Aktivierung A) gebildet. Die Konzentrationsänderung der eingeströmten Metallionen wird aus dem Kontrastunterschied der jeweiligen Pore bestimmt. Es werden somit mindestens zwei SPR-Bilder des Sensor-Arrays aufgenommen. Die Messzeit dieses Verfahrens ist damit im Vergleich zum ersten Verfahren höher.

Zur Entwicklung des Detektions- und Auswerteverfahrens werden zunächst keine Kanalproteine eingesetzt. Vielmehr wird die Aktivierung des nAChR mit Hilfe von wässrigen Salzlösungen, die in die Mikroporen einströmen, simuliert. Dafür wird ein Gradient von K^+ -Ionen eingesetzt, da die Leitfähigkeit des nAChR für dieses Kation sehr hoch ist [11]. Zur Messung werden die Poren mit Wasser gefüllt. Der Einfallswinkel wird bei der Messung so eingestellt, dass ein maximaler Kontrast zwischen den wassergefüllten Poren und dem PMMA auftritt (Abb. 11A). Anschließend wird eine 5mM KCl-Lösung in die Mikroporen eingespült und erneut gemessen (Abb. 11B). Die relative Pixelintensität von 0 wird im SPR-Bild schwarz und die maximale von 255 weiss dargestellt. Abb. 11C) zeigt die Differenz aus beiden Messungen. Die hexagonalen Mikroporen besitzen einen Abstand von $25\mu\text{m}$ zwischen den parallelen Seitenflächen. Das Differenzbild C) zeigt den Stegbereich der PMMA-Matrix mit einer relativen Intensität von 0. Die Poren treten deutlich hervor. Die Erhöhung der Konzentration mit KCl-Lösung um 5mM führt zu einer visuell gut detektierbaren Kontrastverstärkung.

Bei der Messung muss berücksichtigt werden, dass durch mechanische Einwirkung auf den Messplatz eine Bilddrift auftritt und dass Temperaturschwankungen die Dielektrizitätswerte beeinflussen. Die Bild-Verschiebung in x- und y-Richtung von jeweils 3 Pixeln wird manuell korrigiert. Die Temperatur wird während der Messungen nicht zusätzlich geregelt. Eine klimatisierte RT von $20,0^\circ\text{C}$ und vor Messbeginn entsprechend eingestellte Lösungstemperaturen werden als ausreichend konstant angesehen.

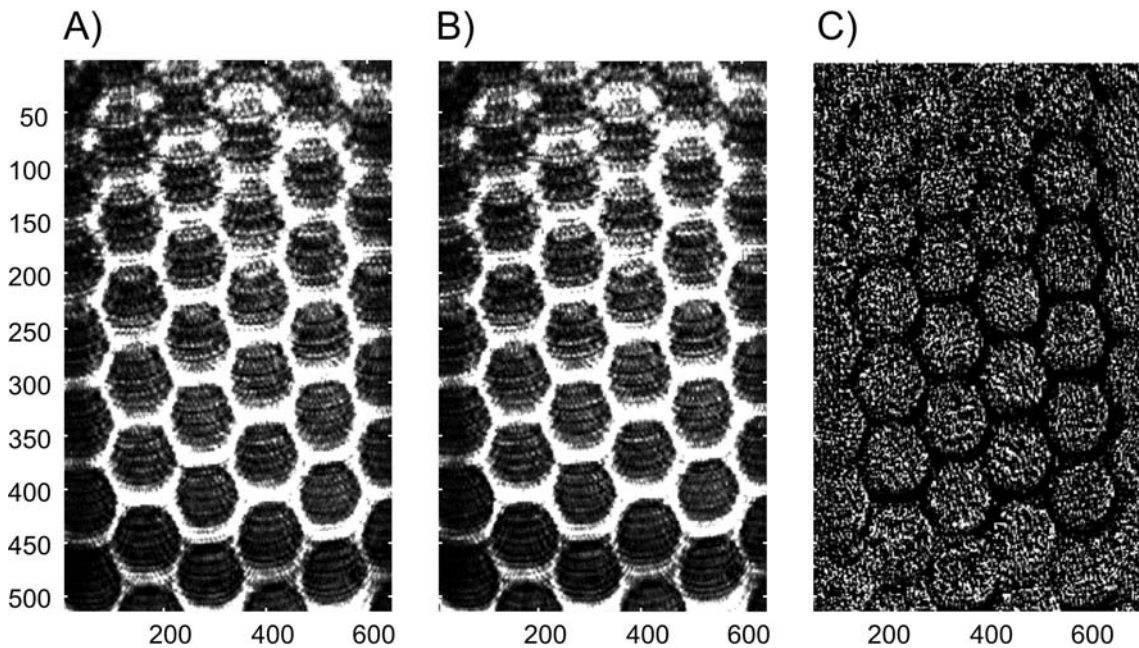


Abb. 11: A) SPR-Bild von wassergefüllten Mikroporen, B) mit 5mM KCl-Lösung gefüllt und C) Differenzbild B – A.

Um mit der Messung die Funktionsfähigkeit des Ionenkanals zu simulieren, wird vorausgesetzt, dass die im Kapitel 3.1 genannte Wirkung der Konzentrationsänderung einer Salzlösung auf die Konzentrationsänderung von Metallionen durch Aktivierung des Ionenkanals übertragbar ist. Die Änderung des SPR-Bildkontrastes ist dann ein Maß für die Änderung der durchgeströmten Metallionen in der Mikropore. Wichtig bei diesem Verfahren ist, unvollständig entwickelte Porenvolumen zu berücksichtigen, da die eingeströmten Ionen auf das Volumen bezogen werden und es sonst zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Bei der Simulation der Aktivierung des nAChR durch die vorab eingestellte Konzentration der eingeströmten Salzlösung ist die Volumenkorrektur nicht notwendig.

Um die gemessene Änderung der Dielektrizitätszahl als eine Aktivierung des Ionenkanals zu beschreiben, muss der Zusammenhang zwischen Dielektrizitätszahl und Metallionen-Konzentration bekannt sein. In der vorliegenden Untersuchung wird mindestens eine Aktivierung des nAChR erwartet. Zur Vereinfachung wird mit einer Modell-Lösung gearbeitet, die K^+ -Ionen in wässrigen Lösungen enthalten. Die Konzentrationsänderungen der wässrigen Lösungen von KCl betragen jeweils 0,5mM, 1mM, 2mM, 4mM, 8mM und 10mM. Für jede Konzentration wird ein SPR-Bild aufgenommen, nachdem sich stationäre Verhältnisse in der Durchflusszelle eingestellt haben.

Wie hoch die Kontraständerung ist, hängt vom Einfallswinkel des eingestrahlten Lichtes bei der SPR-Messung ab. Die Justierung des Winkels auf den maximalen Kontrast zwischen wassergefüllten Poren und dem PMMA der Stege erfolgt visuell, bevor die Salzlösung in die Mikroporen einströmt. Die Reflektivität der PMMA-Matrix wird auf 1 und die minimale Reflektivität im Porenbereich auf 0 normiert.

Die Auswertemethodik wird anhand eines ausgewählten Bereichs von 6 Mikroporen entwickelt. Abb. 12 zeigt das SPR-Bild des ausgewählten Bildbereichs einer Polymermatrix (Erzeugung der Matrix s. Kapitel 4).

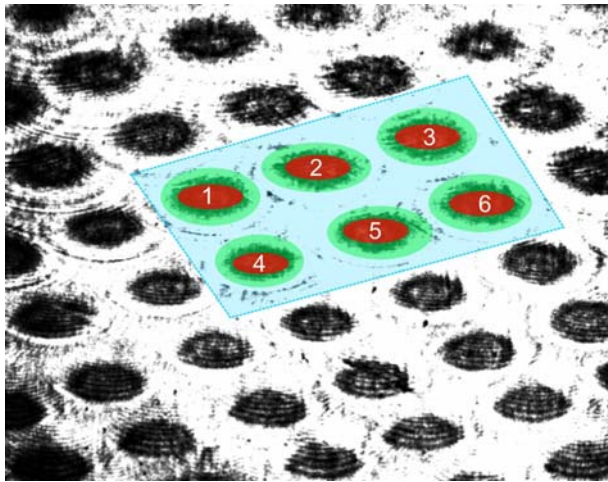


Abb. 12: Normierte Intensität der Pixel im SPR-Bild mit ausgewähltem Bereich zur Auswertung (blau) und Zuordnung der Pixel im ausgewählten Bereich.

Die Sensitivität der einzelnen Poren ist verschieden hoch, da Restmaterial am Porengrund zurückbleibt (Kapitel 4.2 und 4.3). Die Histogramme der Pixelintensitäten der jeweiligen Pore ermöglichen die Auswahl eines repräsentativen Pixelbereiches mit annähernd gleich hoher Sensitivität für alle 6 Poren (Anhang 7.9). Im

ausgewählten Bereich wird eine örtliche Zuordnung der Pixel zur PMMA-Matrix (blau), den Poren (rot) und einem Übergangsbereich (grün) getroffen. Die örtliche Zuordnung ist auch zur Korrektur der Bilddrift, z.B. durch Erschütterungen während der Messung, notwendig und wird manuell durchgeführt. Dem Matrix-Bereich werden nur Pixel mit einer relativen Intensität von 230 bis 255 zugeordnet. Pixel aus dem Übergangsbereich werden in die Auswertung nicht einbezogen.

Die Kontraständerung wird in Abb. 13 anhand der Verhältnissbildung der mittleren Intensitäten von Poren zu PMMA-Matrix als Funktion der K^+ -Konzentration dargestellt. Die Verhältnissbildung reduziert den Einfluss von Streulicht und wird anstatt der Absolutwerte der Intensitäten zur Auswertung herangezogen. Die Intensität wird über die 6 Poren des ausgewählten Bereiches gemittelt, da in alle Poren die gleiche Lösung eingespült wird. Die Verhältnisse zeigen eine Messunsicherheit im Bereich von $1,04 \cdot 10^{-2}$ bis $2,16 \cdot 10^{-2}$. Die Differenzbildung zu wassergefüllten Poren wird nicht durchgeführt, um die starke Kontraständerung im Bereich niedriger Konzentrationen zu betonen. Mit steigender K^+ -Konzentration sinkt die mittlere Reflektivität der Poren und der Kontrast im SPR-Bild zwischen Porenregion und PMMA-Matrix steigt an.

Für Mikroporen mit einem Durchmesser von $3\mu\text{m}$ bei einer Gesamtschichtdicke des Sensor-Arrays von rund 300nm (s. Kapitel 4.3.5) entspricht die Konzentrationsänderung einer KCl -Lösung von 1mM einer Einzelkanalaktivität des nAChR. Die in Abb. 13 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass anhand des SPR-Imaging-Kontrastes ein Einzelkanalereignis des nAChR detektierbar ist.

Aus der Messung der Kontraständerung in Abhängigkeit zur Salz-Konzentration lässt sich ableiten, dass bei einem Einfallswinkel gemessen wird, der sich auf dem ansteigenden Kurvenabschnitt der SPR-Funktion befindet. Da der Verlauf der SPR-Funktion nicht symmetrisch ist, kann die Änderung des Kontrastes im SPR-Experiment maximiert werden, wenn ein Einfallswinkel gewählt wird, der auf dem fallenden Kurvenabschnitt der SPR-Funktion liegt. Dazu wä-

re zukünftig eine Justierungseinheit für die Einstellung und Messung des Einfallswinkel des Lichtes notwendig. Auch die Korrektur der Bildausleuchtung und eine Vereinheitlichung des Versuchsaufbaus reduziert die Messunsicherheit bei der Messung weiter.

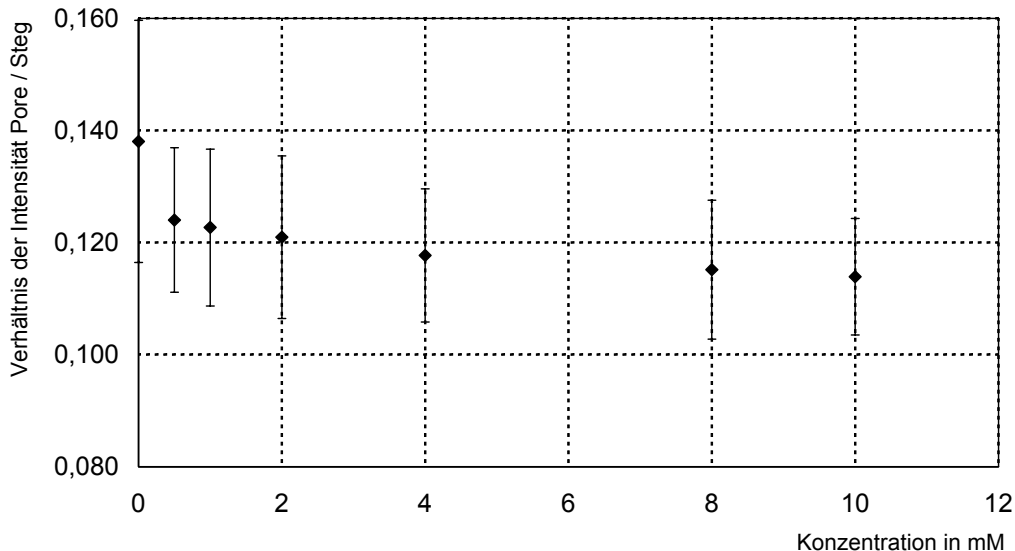


Abb. 13: Verhältnis der mittleren Reflektivität Pore/PMMA-Matrix als Funktion der K^+ -Konzentration mit Messunsicherheit.

Zu einer hohen Sensitivität des SPR-Imagings trägt auch die Auswahl einer Ionenart bei, deren Änderung der Dielektrizitätszahl pro Konzentrationseinheit möglichst hoch ist. Beispielsweise ist der nAChR neben K^+ -Ionen auch für Na^+ -, Cs^+ -, Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen durchlässig [84].

Der Einsatz von Ionenkanälen im Sensor-Array setzt Mikroporen gleicher Sensitivität voraus. Abweichungen in der Sensitivität und im Porenvolumen müssen aufwändig korrigiert werden. Eine reproduzierbare Herstellung der Mikroporen verringert den Aufwand nachträglicher Korrekturen.

4 Erzeugung und Charakterisierung der Mikrostruktur

Die Integration von funktionsfähigen Ionenkanälen in eine Lipidmembran, die in Poren einer Polymermatrix aufgespannt wurde, ist in [11] veröffentlicht. Als Polymermatrix wurden Kernspurmembranen mit unterschiedlichen Porendurchmessern untersucht. Die Ergebnisse der Patch-Clamp-Messungen bewiesen porengrößenabhängigen Erfolg beim Aufspannen der Lipidmembran für hydrophobe Polymermembranmaterialien.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wird untersucht, ob durch Oberflächenmodifizierung der Polymermatrix und Kopplung mit der Metalloberfläche des optischen Transducers über einen SA-Prozess eine stabile Verbindung hergestellt werden kann [92]. Die Oberflächen der als Polymermatrix verwendeten Kernspurmembranen zeigen jedoch eine Oberflächenrauigkeit, die die Anbindung über den SA-Prozess nur in geringen Bereichen zulässt.

Durch ein Bestreichen mit Nitrobenzen oder Tetrachlorethan findet ein Anlösen der Oberfläche auf einer der Membranseiten statt. Dies führt zu gut haftenden Schichten durch ein Aufkleben der Kernspurmembranen. Allerdings kann kein SPR-Bild der Mikrostrukturen detektiert werden. Wahrscheinlich bleibt die Mikrostruktur an der metallzugewandten Seite nicht erhalten. Eine stabile und homogene Anbindung der vorgeätzten Polymerfolien konnte damit ebenfalls nicht erzielt werden.

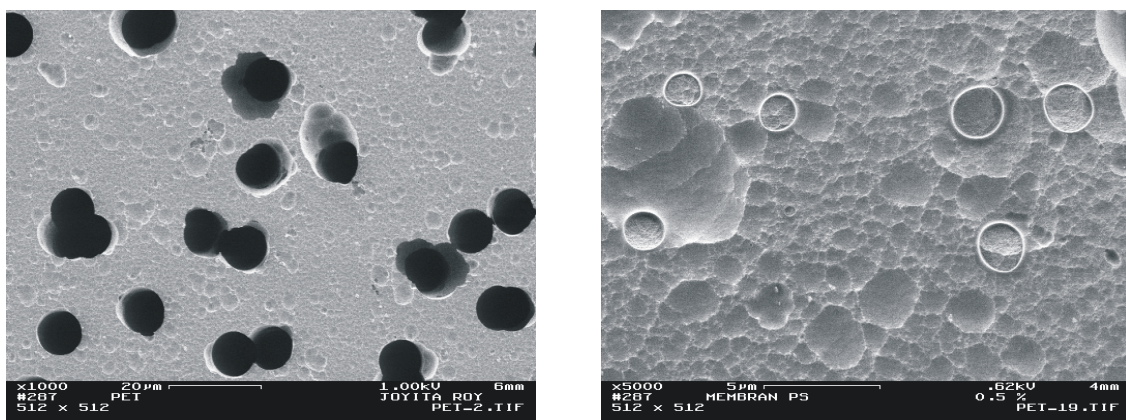


Abb. 14: (Links) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer PE-Kernspurmembran. (Rechts) Detailabbildung zeigt die Oberflächenrauigkeit der Polymermembran, die im Mikrometerbereich liegt.

Eine weitere Variante zur Erzeugung der Mikroporen-Architektur des Sensor-Arrays besteht in der Bedampfung einer geätzten Oberflächenstruktur mit dem gewünschten Metall. Dazu werden aufgeklebte Kernspurmembranen mit Gold bedampft und anschließend dem Detektionsverfahren unterzogen. Es wurde keine Oberflächen-Plasmonen-Resonanz beobachtet.

Deshalb wird ein sequenzieller Schichtaufbau (optisches Substrat, Aufdampfen der Metallschicht, Beschichtung mit dem Polymer) und anschließende Mikrostrukturierung der aufgetragenen Polymerschicht eingesetzt.

Die resultierende Polymermatrix als Grenzschicht zwischen biologischen und nichtbiologischen Komponenten muss verschiedene Bedingungen und Funktionen erfüllen, um im Ionenkanalensensor-Array eingesetzt zu werden.

Die Polymermatrix

- ▷ muss eine gute Anbindung an das aufgedampfte Metall des optischen Transducers zeigen. Diese Eigenschaft ist wichtig, um die Poren der Polymermatrix dicht abzuschließen, so dass die Polymermatrix nicht unterspült wird und es zum Vermischen mehrerer Porenlösungen kommt. Hinzu kommt, dass sich das Polymer mit herkömmlichen lithographischen Verfahren mikrostrukturieren lassen muss;
- ▷ muss Poren mit einer Dimension im unteren Mikrometerbereich enthalten, die bis zum Metall des optischen Transducers durchstrukturiert sind;
- ▷ muss hohe mechanische Stabilität aufweisen, wobei die Stabilität für den zukünftigen Einsatz als Biosensor, aber auch für die Haltbarkeit der Lipidmembran entscheidend ist;
- ▷ muss durch ihre Oberflächenbeschaffenheit und chemische Zusammensetzung eine gute Haftung mit dem Lipid ermöglichen, da eine geschlossene Lipidschicht für die Funktion des Sensor-Arrays notwendig ist;
- ▷ darf die Funktionsfähigkeit des integrierten Ionenkanals nicht beeinträchtigen;
- ▷ soll ein Umspülen des Ionenkanals mit wässriger Ionenlösung an beiden Seiten der Lipidmembran zulassen. Dies stellt ebenfalls eine wichtige Bedingung der Funktionsfähigkeit des Ionenkanals dar.

Für die Erzeugung der Polymermatrix mit Mikroporen wird das Polymethylmethacrylat (PMMA) ausgewählt. Dieses in lithographischen Verfahren, insbesondere der Elektronenstrahl-Lithographie, benutzte Standard-Resist zeichnet sich durch seine chemische und mechanische Stabilität aus. Zudem besitzt es hohe Biokompatibilität, was durch seinen langjährigen Einsatz in Augenimplantaten [93] und Kontaktlinsen [94, 95] belegt ist. PMMA zeigt hervorragende Filmeigenschaften, leichte Handhabung, kaum Alterung und ist unempfindlich gegen Strahlung im sichtbaren Wellenlängenbereich. Aus diesem Grund wird PMMA vorgezogen, auch wenn eine Vielzahl von Materialien sowohl biologischen als auch synthetischen Ursprungs als Membranbildner bekannt sind.

Im Spin-coating-Prozess wird die PMMA-Lösung auf das planare Substrat im Überschuss aufgetropft. Durch hohe Rotationsgeschwindigkeiten des Substrates im Spin-coater wird die aufgetragene Polymerlösung durch die wirkende Zentrifugalkraft auf dem Substrat verteilt. Gleichzeitig wird das leicht verdampfbare Lösemittel des Polymers verdampft, und es bleibt ein homogener, auf dem Substrat haftender Film zurück. Die resultierende Schichtdicke d ist von verschiedenen Parametern abhängig.

Die mathematische Herleitung des Zusammenhanges zwischen den Material- bzw. Prozessparametern und der resultierenden Schichtdicke ist in [96, 97] dargestellt. Erst wenn die Drehzahl einen kritischen Wert überschritten hat, ergeben sich Schichtdicken mit geringer Streuung (statische Beschichtung). Bei Unterschreitung der kritischen Drehzahl kommt es zur Bildung von starken Randwülsten und inhomogenen Schichten. Die beiden empirischen Ansätze geben den praktischen Sachverhalt jedoch nur näherungsweise wieder, da beim Spin-coating gleichzei-

tig sehr komplexe Vorgänge stattfinden [98, 99]. Faktoren, die zu abweichenden experimentellen Daten im Vergleich zu den theoretischen aus [96-99] führen, sind:

- Die Verdampfung des Lösemittels erfolgt nur von der Oberfläche des Films, was zu vertikalen Viskositätsänderungen in der Schicht führt.
- Leichter flüchtige Lösemittelkomponenten verdampfen schneller, es kommt zur Anreicherung der schwerer flüchtigen Lösemittel an der Filmoberfläche und damit ebenfalls zur Änderung der Lösungsviskosität.
- Nicht alle Lösungen zeigen linearen Zusammenhang zwischen der Viskosität und der Scherrate (Newton'sche Lösungen), die sich mit dem Abstand r von der Drehachse verändert.

Letztlich lassen sich die Schichtdicken beim Spin-coating-Prozess nur ungenügend vorausberechnen, sondern müssen jeweils experimentell bestimmt werden. Randwülste werden an den Kanten des Substrates gebildet, da die Lösung einheitlich nach außen bewegt wird und dort Tröpfchen bilden muss. Dies hängt sowohl von der Oberflächenspannung und der Viskosität der Polymerlösung, als auch von der Winkelgeschwindigkeit beim Schleuderprozess sowie der Form des Substrates ab.

Für mikrolithographische Anwendungen schließt sich im Allgemeinen an den Spin-coating-Prozess ein Tempern der aufgeschleuderten Filme an [100], um Lösemittelreste aus dem Film zu entfernen. Dadurch werden Spannungen im Film minimiert und die Filmdicke verringert sich für PMMA-Schichten um rund 10%.

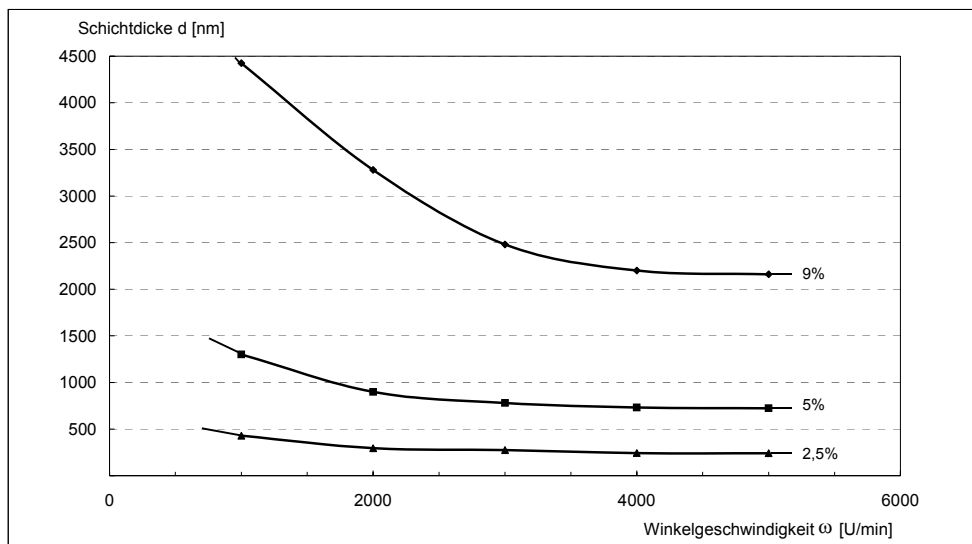


Abb. 15: Reflektometrisch bestimmte PMMA-Schichtdicken auf einem goldbeschichteten ($d_{Au}=50\text{nm}$) Glasprisma in Abhängigkeit von der Winkelgeschwindigkeit und der Konzentration der eingesetzten PMMA-Lösung in Chlorbenzen.

Die Schichtdickenbestimmung der PMMA-Schichten erfolgt reflektometrisch. Das gemessene Reflexionsspektrum von Weißlicht wird mit einem simulierten Spektrum verglichen und dient entweder zur Ermittlung der Schichtdicke oder des Brechungsindex der Analytschicht. Da der Brechungsindex für PMMA bekannt ist, kann die Schichtdicke aus dem Reflexionsspektrum bestimmt werden.

4.1 Mikrostrukturierung

Derzeit werden eine Reihe von Mikrostrukturierungstechniken an planaren Substraten eingesetzt, deren Entwicklung vorwiegend durch die allgemeinen Miniaturisierungswünsche und Anforderungen aus der Mikroelektronik, Mikrofluidik, Mikromechanik, Mikrooptik sowie den Sensor-, Aktor- und mikroelektromechanischen System-Entwicklungen (MEMS) voran getrieben wird [101, 102]. Wachsendes Anwendungspotenzial besitzt insbesondere die Lab-on-Chip-Herstellung [103].

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind Mikrostrukturierungstechniken in Gruppen zusammengefasst, die vor allem auf der Durchführung der jeweiligen Techniken beruhen, und es wird eine kurze Beschreibung der Technik gegeben. Die mit der jeweiligen Technik erzielbare minimale Breite und Höhe der Strukturen sind in der Übersicht in Abb. 16 dargestellt.

Tabelle 2: Gruppierung und Kurzbeschreibung ausgewählter Mikrostrukturierungstechniken.

Technik	Gruppe	Abkürzung	Beschreibung	Literatur
Mikrokontaktdrucken (Microcontact printing)	soft-lithographische Techniken	μ -CP	mit einem elastomeren Stempel werden Moleküle auf das Substrat übertragen	[104]
Mikroformen in Kapillaren (Microinjection moulding in capillarie)		MIMIC	durch Kapillarkräfte wird die zu polymerisierende Lösung in die Stempel-hohlräume eingezogen, nach Polymerisation den Stempel abheben	[105, 106]
Mikrotransferformen (Microtransfer moulding)		μ -TM	mit einem elastomeren Stempel werden Polymervorläufer auf das Substrat übertragen und ausgehärtet	[107, 108]
Imprinting	Verformung	-	Thermoplastische Materialeigenschaften zur Verformung unter Temperatur und Druck genutzt	[109, 110]
Atomkraftfeld-Mikroskopie-Lithographie		AFM-Lithographie	mechanische Kraft einer AFM-Spitze im direkten Schreibprozess genutzt	[111]
Dip-Pen-Lithographie	druck- und SA-basierte Techniken	-	Flüssigkeit auf Oberfläche abgesetzt, nach Lösemittelverdampfung verbleibt feste Struktur	[112]
Grafting-from-Verfahren		-	Kombination aus μ -CP mit SA-Substanzen und einem weiterem Aufwachsen von Molekülen auf der SA-Schicht	[113]
Elektronenstrahl-Lithographie (Electron beam lithography)	strahlungs-basierte Techniken	EBL	elektronenstrahlungsinduzierte Veränderung der Lösungseigenschaften im Resist, selektives Lösen führt zur Struktur	[114, 115]
Ionenstrahl-Lithographie (Ion beam lithography)		IBL	Ionenstrahlungsinduzierte Veränderung der Lösungseigenschaften im Resist, selektives Lösen führt zur Struktur	[116, 101]
Lithographie im ultravioletten Wellenlängenbereich		UVL	Nutzung ultravioletter Strahlung zur Veränderung der Lösungseigenschaften	[101, 102]
Photolithographie		-	Veränderung der Lösungseigenschaften durch sichtbare Strahlung	[117, 112]
Röntgenstrahl-Lithographie		XRL	Veränderung der Lösungseigenschaften durch Röntgenstrahlung	[118, 117]

Die Dimension der Mikrostrukturen von wenigen Mikrometern Breite bei einer Strukturhöhe von rund 300nm in der Polymermatrix kann prinzipiell mit den dargestellten Techniken erzeugt werden. Der erfolgreichen Anwendung einer Technik ist im Bereich der minimalen Strukturbreite meist durch physikalische Gesetzmäßigkeiten eine Grenze gesetzt. Bei maximalen Strukturbreiten existieren keine absoluten Grenzen. Mit dem Übersteigen des angegebenen Bereichs der Strukturbreite wird die Technik zunehmend zeitunrentabel und kostenineffektiv. Die maximale Strukturhöhe hängt sowohl von physikalischen Parametern, als auch vom Entwicklungsstand des Verfahrens ab [119].

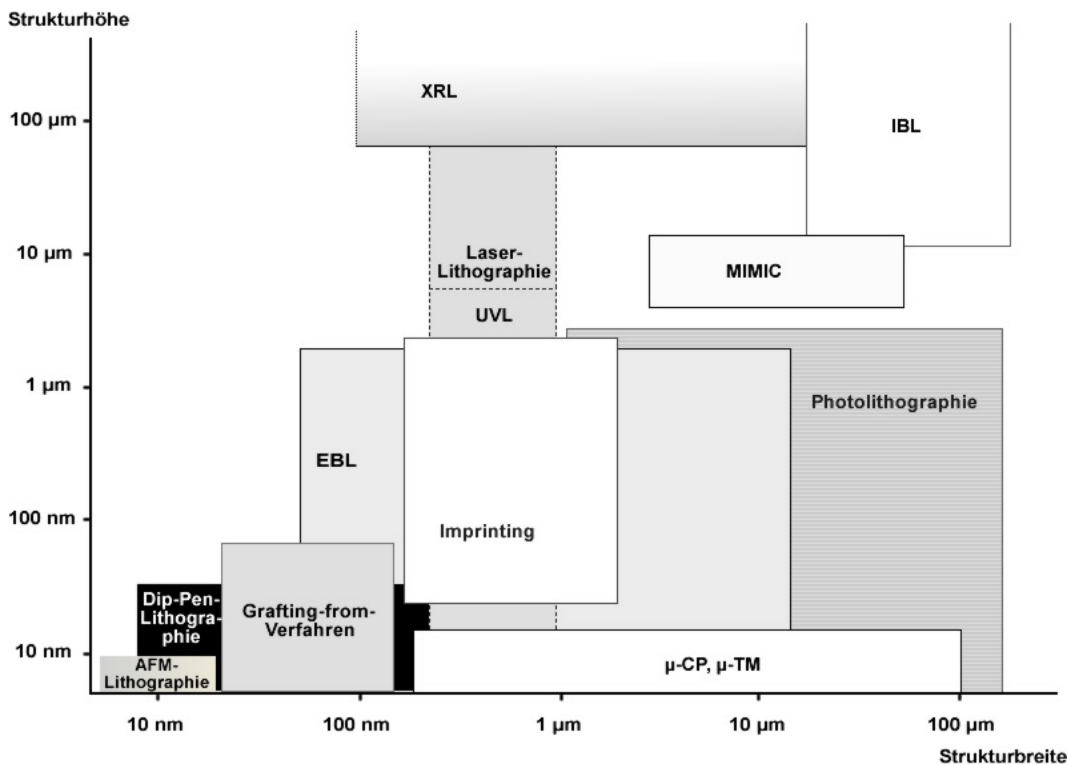


Abb. 16: Übersicht ausgewählter Mikrostrukturierungstechniken mit Strukturdimension

Zur Herstellung der Mikroporen in der Polymermatrix mit der vorgegebenen Strukturdimension werden die soft-lithographischen Techniken nicht eingesetzt, weil einerseits bei Strukturbreiten im unteren Mikrometerbereich raue Abrisskanten und Defekte durch das Entfernen des elastomeren Stempels auftreten können und zum anderen gedruckte Strukturen nicht die gewünschte Strukturhöhe von 300nm erreichen.

Techniken, die eine Verformung des Polymers durch Druck bzw. Temperatur bewirken, müssen für die Herstellung der Mikroporen in der Polymermatrix ausgeschlossen werden, da innerhalb der Strukturen verfahrensbedingt immer eine Restmaterialschiicht verbleibt [110].

Die Dip-Pen-Lithographie oder SA-basierte Techniken entfallen ebenfalls, da SA-Moleküle auf Oberflächen die Tendenz zum Spreiten aufweisen und die Strukturhöhen meist den unteren Nanometerbereich nicht überschreiten.

Strahlungsbasierte Techniken werden zur Herstellung der Polymermatrix angewendet, weil:

- ▷ für strahlungsbasierte Techniken der Strukturgrößenbereich der Mikroporen im optimalen Arbeitsbereich der Techniken liegt.
- ▷ die Elektronenstrahl- und Ionenstrahl-Lithographie Vertreter für Mikrostrukturierungstechniken mittels Teilchenstrahlung sind, die sich im direkten Schreibprozess bzw. auch mittels Maskenbelichtung flexibel einsetzen lassen.
- ▷ eine schnelle Prototypenherstellung gewährleistet wird.
- ▷ die Defekthäufigkeit in der erzeugten Mikrostruktur unterhalb derer liegt, die bei den soft-lithographischen Techniken beobachtet wird.
- ▷ keine prinzipielle Beschränkung für das Substratmaterial vorliegt.
- ▷ die Belichtung mit ultravioletter Strahlung mit Hilfe einer Maske parallel durchgeführt werden kann und der Geräteaufwand hierbei vergleichsweise gering ist, da nicht im Vakuum belichtet werden muss.

4.1.1 Strahlungsabbau der PMMA-Makromoleküle

PMMA ist ein positives Resist, das u.a. durch Elektronen-, Ionen- und UV-Strahlung strukturiert werden kann [120]. Durch die Strahlung wird das polymere Kettengerüst gebrochen. Fragmente niedrigeren Molekulargewichtes entstehen, die mit einem Lösemittel, dem Entwickler, selektiv herausgelöst werden können und eine positive Oberflächenstruktur zurücklassen.

Der Abbau der PMMA-Makromoleküle durch den Einfluss elektromagnetischer Strahlung ist sehr komplex, da im Polymer viele Verunreinigungen, Additive und irreguläre Bindungen die Strahlung absorbieren können [121]. Zudem beeinflussen weitere Faktoren den Abbau-Prozess: das Molekulargewicht des Polymers und dessen Verteilung, der Verfahrensprozess, die Temperatur während des Abbauprozesses, mechanische Spannungen während der Filmherstellung, die Dichte und Oberflächenstruktur des Polymerfilms aber auch die Orientierung und Mobilität der Polymerketten. Reaktionsschemata können deshalb nur einen Teil der tatsächlichen Reaktions- und Produktvielfalt widerspiegeln (Abb. 17 und Abb. 18).

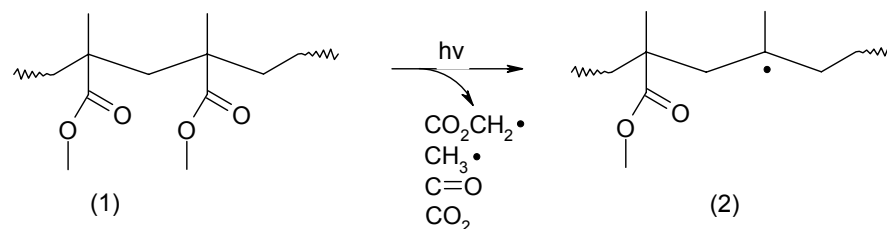


Abb. 17: Reaktionsschema zur initialen Radikalbildung

Bisherige Untersuchungen zum Abbaumechanismus gehen von zwei Hauptreaktionen aus [103]. Dabei wird in einem Reaktionsschritt (Abb. 17) durch Strahlung die Bindung zur Seitenkette homolytisch gespalten. Produkte sind jeweils unterschiedlich reaktive Radikale. Das Seitenkettenradikal mit der Estergruppierung zerfällt hauptsächlich in gasförmige Endprodukte wie CO und CH₂O. Daneben entstehen CO₂, CH₄ und CH₃OH. Eine Vielzahl verschiedener

Spezies resultiert aus der Folgereaktion der jeweiligen Radikale untereinander oder mit der Hauptkette.

Folgereaktionen des Hauptkettenradikals sind in Abb. 18 dargestellt. Die Produkte (3-7) stehen beispielhaft für die vielen Produkte [122], die beim strahlungsinduzierten Abbau des PMMA auftreten können [123, 124]. Das Hauptkettenradikal kann auch Reaktionen zwischen den Polymerketten eingehen. Dazu zählt die Quervernetzung oder Verzweigung der Polymerkette, die Rekombination und die Disproportionierung der Radikale. Neben diesen Reaktionen kann das Hauptkettenradikal auch mit anderen chemischen Verbindungen wie dem Luftsauerstoff wechselwirken. Es entstehen Reaktionsprodukte, die zusätzlichen Sauerstoff enthalten, wie β -Hydroxy-Ester (4) und Methylketone (5). Der Bruch der Polymerketten stellt den wichtigsten Prozess beim Abbau-Mechanismus dar [125]. Eng mit dem Bruch der Hauptkette sind Bindungsumlagerungen verbunden [126]. Wird PMMA im Vakuum abgebaut, entstehen hauptsächlich Doppelbindungsprodukte (6) bzw. (7) und der Sauerstoffgehalt nimmt im Polymer mit zunehmender Strahlungseinwirkung ab [103].

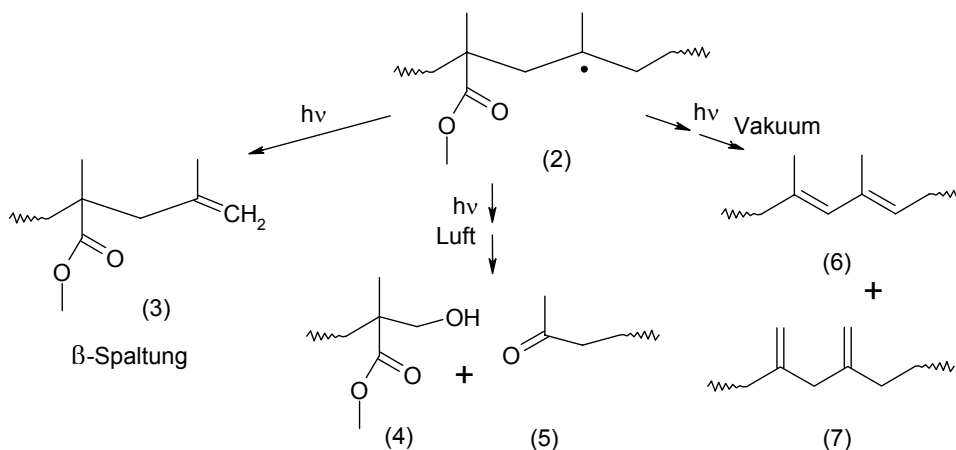


Abb. 18: Sekundäres Reaktionsschema mit Bruch der Hauptkette

Komplexer wird das Reaktionsschema, wenn PMMA mit einer 10fach höheren Dosis als zum Kettenbruch notwendigen Dosis bestrahlt wird. In diesem Dosisbereich kann PMMA auch als negativ Resist fungieren [127]. Es überwiegt die Vernetzung der Polymerketten und belichtete Bereiche werden zunehmend unlöslich [128].

4.1.2 Elektronenstrahl-Lithographie

Einen Einblick in die EBL vermitteln Grundlagenwerke zur Mikrolithographie [129, 130]. Die Prozesse, die während der Belichtung zu einer Verkleinerung des mittleren MWs führen, sind von den Wechselwirkungen der hochenergetischen Elektronen (10-50kV) mit dem Polymergerüst bestimmt. Die Kettenbruchreaktionen im PMMA werden zum einen von den direkt einfallenden vorwärts gestreuten, den rückgestreuten und den Sekundärelektronen mit Energien $\geq 5\text{eV}$ hervorgerufen [131, 132]. Trotz starken Abbremsens der Elektronen im PMMA ist deren Energie noch ausreichend hoch, um durch die Goldschicht hindurch und mehrere Mikrometer tief in das darunter liegende Glassubstrat einzudringen [133].

Beim Einsatz der EBL können Strukturgrößen erreicht werden, die wesentlich kleiner sind, als sie vom SPR-Detektionsverfahren für den Ionenkanalsensor gefordert werden. Im direkten Schreibprozess wird maskenlos mit fokussiertem Elektronenstrahl bei unterschiedlichen Parametern die PMMA-Schicht belichtet (Anhang 7.3).

Die Belichtungsparameter müssen für jede Probe angepasst werden. Die Dosis während der Belichtung gibt den zeitabhängigen Strahlstrom bezogen auf die belichtete Fläche ($\mu\text{As}/\text{cm}^2$) an. Sie ergibt sich aus dem Strahlstrom, der Verweilzeit und der Schrittweite des Elektronenstrahls auf der Probe. Relative Belichtungs Dosen werden häufig bei der Belichtungsoptimierung verwendet und sind Vielfache der absoluten. Optimale Belichtungsparameter werden angenommen, wenn die entwickelte Strukturgröße und Form den Vorgaben entspricht.

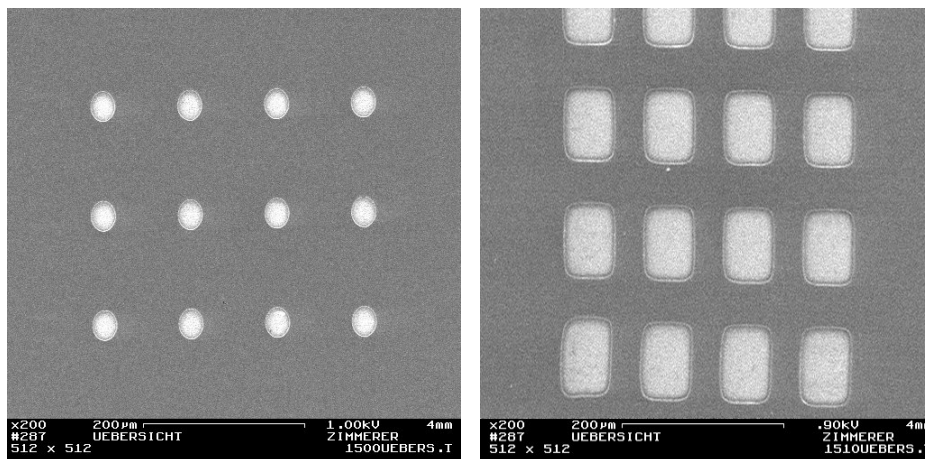


Abb. 19: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von erzeugten Teststrukturen in PMMA-Schichten mit 300nm Schichtdicke mittels EBL.

Die PMMA-Schicht zeigt während der Belichtung Aufladungseffekte. Davon wird der Elektronenstrahl abgelenkt. Um Fehler im Schreibprozess zu verhindern, können ohne zusätzliche elektrische Ableitung an der Goldschicht nur Proben mit Schichtdicken kleiner 500nm strukturiert werden. Mit Hilfe der rasterelektronischen Aufnahmen (engl. Scanning electron microscopy - SEM) der Mikrostrukturen (Abb. 19) werden Poren beobachtet, die bis zum Substrat durchstrukturiert erscheinen.

Die Charakterisierung der Mikroporen mit SPR-Imaging ergibt keine vollständige Entfernung von Resten aus den Poren. Bei einer Durchstrukturierung bis zum Substrat sollte ein hoher Bildkontrast zwischen Polymerstegen und Poren auftreten. Dieser wird nicht beobachtet.

Die Menge an verbleibendem Material in den Poren ist weder von der Größe der belichteten Struktur, noch von der ursprünglichen Schichtdicke des PMMA-Films im Bereich von 300nm bis 800nm abhängig. Es zeigt sich, dass eine Dosissteigerung auf das 20fache keine freien Poren erzeugen kann.

Es kann kein weiterer Materialabtrag in den Poren beobachtet werden, wenn ein Entwickler mit höherer Lösekraft eingesetzt wird bzw. mehrfach nachentwickelt wird (Anhang 7.3). Das selektive Lösen der belichteten Probenbereiche erfolgt zum einen nach einer Standardentwicklungs-

methode mit MIBK:ISO (1:3) für 30s, zum weiteren durch eine Nachentwicklung in MIBK:ISO (1:1) für weitere 2min und zusätzlich verlängerter Nachentwicklungszeit von 3min.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die EBL Poren der gewünschten Dimension in den PMMA-Schichten erzeugen kann, die Mikrostrukturen jedoch mit diesem Verfahren nicht vollständig bis zum metallischen Substrat entwickelt werden können.

4.1.3 Ionenstrahl-Ätzen mit Ag^+ -Ionen

Ein weiteres lithographisches Verfahren, das mit Teilchenstrahlung den Kettenbruch im Polymergerüst erzeugen kann, ist das Ionenstrahl-Ätzen oder Sputter-Ätzen. Anders als bei der EBL zeigen die wesentlich schwereren Ag^+ -Ionen einen hohen Sputter-Effekt [134, 135]. Der Abtrag des Polymers ist durch auftretende Kollisionskaskaden vom Substrat [136] und kollektive elektronische Anregung im PMMA abhängig [137]. Über die Dosis des Ionenstrahles lässt sich der Wirkungsgrad des Crackprozesses steuern. In der darunter liegenden Metallschicht werden die Ionen stark abgebremst. Mit Hilfe der Beschleunigungsspannung der Ag^+ -Ionen wird die Eindringtiefe der Ionen so angepasst, dass die Ag-Schicht auf dem Glassubstrat nicht durchgeschlagen wird, sondern dass die Ag^+ -Ionen in ihr stecken bleiben (Anhang 7.4). Deshalb wird die unterliegende Goldschicht durch eine 45nm dicke Ag-Schicht ersetzt, um einen Dotierungseffekte zu vermeiden.

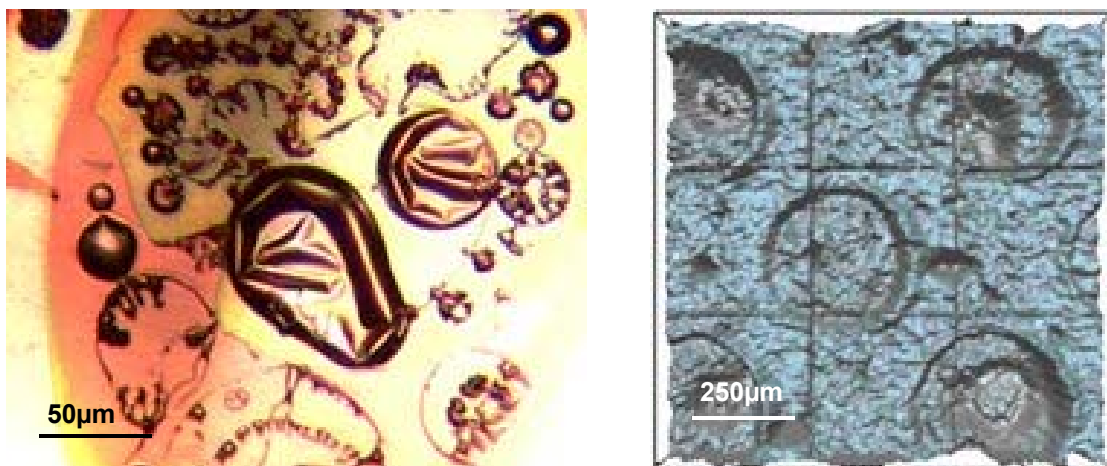


Abb. 20: (Links) Auflichtmikroskopische Aufnahme eines belichteten Poren-Bereiches bei 10facher Vergrößerung; (Rechts) FTIR-3D-Bild (bestehend aus 3x3 Einzelbildern) im Bereich 1680cm^{-1} bis 1760cm^{-1} .

Der Durchmesser des Ionenstrahles lässt sich minimal bis auf $10\mu\text{m}$ fokussieren. Zum einen ist ein direkter Schreibprozess möglich, zum anderen kann auch durch ein Maske belichtet werden. Für die Testuntersuchungen wird durch eine Maske belichtet.

Bereits ohne Entwicklungsprozess bildet sich durch den starken Sputter-Effekt die Mikrostruktur in der PMMA-Schicht ab. In der linken auflichtmikroskopischen Aufnahme der Abb. 20 wird ein belichteter, typischer Bereich wiedergegeben. Der Beschuss mit Ionen zeigt deutliche Effekte in der unter dem PMMA liegenden Silberschicht. Es kommt zur Blasenbildung innerhalb des Metalls und weiteren, wahrscheinlich thermisch ausgelösten Inhomogenitäten [138].

Mit Ionenstrahl-Lithographie bearbeitete Proben zeigen kein SPR-Signal mehr. Eine Erklärung hierfür liefert der Verklebeeffect der Metallschicht mit dem PMMA, welcher auch gezielt in der

Grenzflächenbearbeitung genutzt wird [139]. Dadurch verändern sich die dielektrischen Eigenschaften der Metallschicht so stark, dass keine kollektive Schwingung der Elektronen im Metall mehr möglich ist.

Aus dem FTIR-3D-Bild auf der rechten Seite der Abb. 20 geht weiterhin hervor, dass das Ionenstrahl-Ätzen unter den getesteten Prozessparametern für das Sensor-Schichtsystem ungeeignet ist. In der PMMA-Schicht steigt die Oberflächenrauigkeit, sowohl in belichteten als auch in unbelichteten Bereichen sehr stark an, zudem treten Dichteanomalien auf [140]. Vor allem die beobachteten Randüberwölbungen könnten die nachfolgend aufzubringende Lipidschicht destabilisieren.

Zusammenfassend hat der Einsatz der beiden teilchenstrahlungsbasierten Techniken gezeigt, dass keine Mikrostrukturen im PMMA-Film erzeugt werden können, die eine Detektion der Poren mit SPR-Imaging gestatten. Es wird eine dünne Restmaterialsicht am entwickelten Porenboden vermutet, die sich im metalloberflächennahen Volumen der Plasmonwelle befindet. Damit kann keine Detektion der Ionenkonzentration in der darüber befindlichen Lösung stattfinden.

4.1.4 UV-Lithographie

Der Belichtungsprozess mit UV-Strahlung wird durch die Aufnahme eines Photons von einer chromophoren Gruppe initiiert. Zur Ermittlung geeigneter Belichtungsparameter ist es notwendig, die Wellenlängensensitivität des PMMA zu ermitteln.

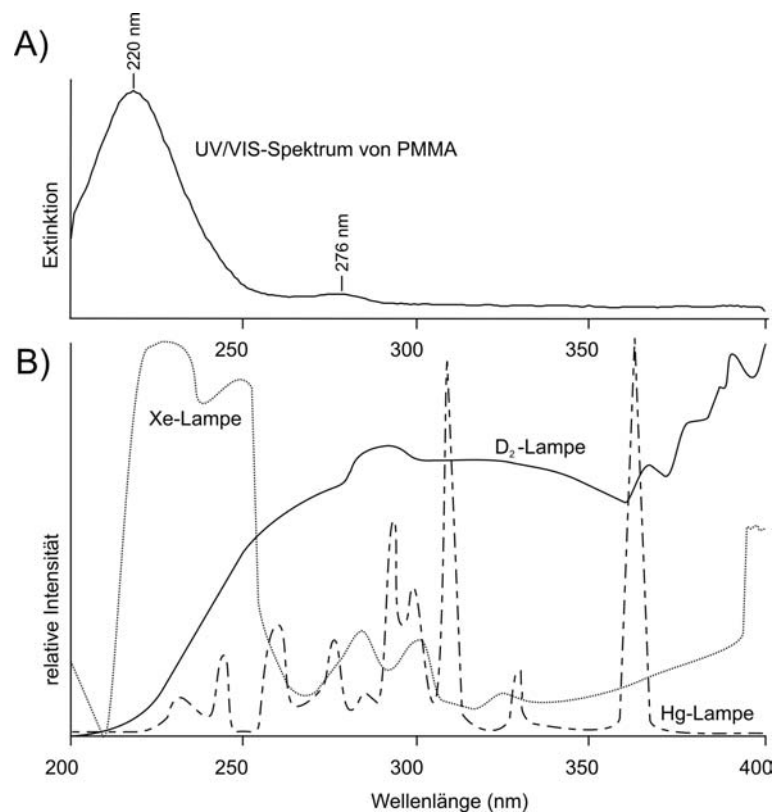


Abb. 21: A) UV-Spektrum eines PMMA-Filmes B) Darstellung der relativen Emissionsspektren verschiedener Lichtquellen im UV-Bereich nach [141] für die Xe-, [142] die D₂- und [143] die Hg-Lampe.

Das UV-VIS-Spektrum des PMMA zeigt ein Absorptionsmaximum bei 220nm (Abb. 21). Es lässt sich dem $n-\pi^*$ -Übergang der Carbonyl-Gruppe zuordnen und weist einen Absorptionskoeffizienten von $0,27-0,47\mu\text{m}^{-1}$ auf [119]. Dieser kleine Wert des Absorptionskoeffizienten und die relativ geringe Leistung von verfügbaren Lichtquellen in diesem Wellenlängenbereich machen PMMA für den Einsatz als UV-Resist in der Mikroelektronik unrentabel. In herkömmlichen Belichtungsapparaten wird meist mit der i-Linie (365nm) eines Hg-Dampf-Brenners die Photo-reaktion im Resist ausgelöst. Alternativ dazu können auch im sichtbaren Bereich die h-Linie (405nm) bzw. g-Linie (436 nm) verwendet werden. Im Bereich der UV-Absorption des PMMA bei 220nm ist die Emissionsleistung des Hg-Brenners jedoch zu gering. Sowohl die D₂- als auch Xe-Lampe (Emissionsspektren in Abb. 21) emittieren im Wellenlängenbereich von 200-260nm. Für die Belichtungsdauer und damit die Effektivität ist die Lichtleistung im Absorptionsbereich des PMMA entscheidend.

Eine Probelichtung ergab eine höhere Lichtleistung der D₂-Lampe, was sich aus der Tiefe der Belichtungsprofile bei gleicher Belichtungszeit bestimmen lässt (Kap. 4.3). Für die nachfolgenden Untersuchungen wird deshalb die D₂-Lampe eingesetzt. Die Ausgangsleistung beträgt 100W.

Der lithographische Prozess kann sich aus wenigen oder sehr vielen Teilschritten zusammensetzen [144]. Die Anforderungen an den lithographischen Prozess bei der Entwicklung des Ionenkanalsensor-Arrays können mit wenigen Prozessschritten erfüllt werden. Die Abb. 22 zeigt, welche Effekte die hier verwendeten Schritte für die Probe haben.

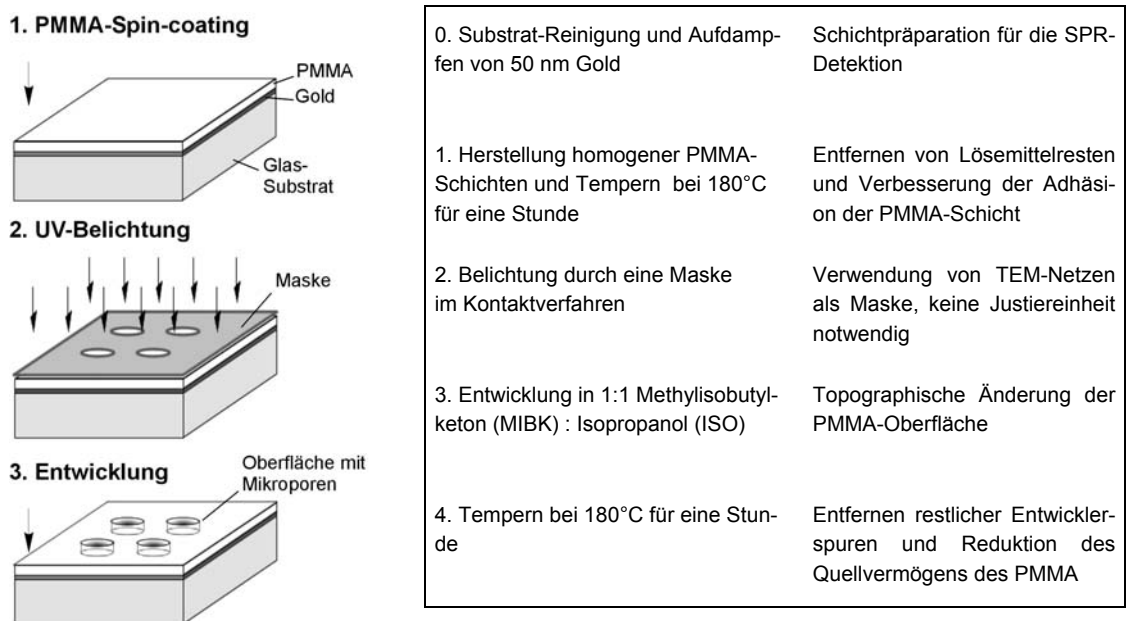


Abb. 22: Prozess-Schritte zur Herstellung der mikroporösen Sensor-Array-Oberfläche durch UV-Lithographie

Die kleinste Strukturdimension für Belichtungen mit dem Masken-Kontakt-Verfahren und damit die minimale, erreichbare Porenbreite der Mikrostrukturen b_{\min} hängt neben der Wellenlänge λ des Strahlers auch von der Filmdicke d des Resists ab. Aus der nachfolgenden Formel [132] berechnet sich für eine Belichtungswellenlänge von 220nm der Deuteriumlampe und einer Schichtdicke des PMMA von 500nm die minimale Strukturweite zu $\sim 350\text{nm}$.

$$b_{\min} = 3/2 \sqrt{\frac{\lambda * d}{2}}$$

Formel 8

Die minimale Strukturbreite liegt weit unterhalb der zu strukturierenden Porenbreite. Systematische Abbildungsfehler wie Nahfeld-Beugungsfehler spielen keine Rolle im verwendeten Belichtungssystem. Die technische Realisierung der Belichtung bedarf daher keiner aufwendigen Optimierung.

4.2 Charakterisierung der Mikrostrukturen

4.2.1 Topologische Charakterisierung

Die Beurteilung des lithographischen Prozesses zur Herstellung des Sensor-Arrays erfolgt über die Strukturgrößen der Mikroporen. Besonders wichtig ist die Tiefenstrukturierung. Die Poren in der Polymermatrix sollen vollständig bis zum Gold-Substrat ausgebildet sein.

Die Strukturbreite der Maske führt beim Kontaktbelichtungsverfahren bei hoher Abbildungstreue zu gleichgroßen Strukturen im Polymer (Abb. 23).

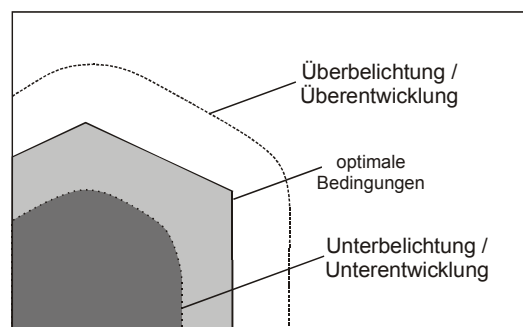


Abb. 23: Abbildungstreue am Beispiel einer hexagonalen Pore. Konturausschnitt der Mikrostruktur im Photoresist in Abhängigkeit von Belichtungs- und Entwicklungsparametern.

Ist der Belichtungsprozess nicht auf die Strukturdimension optimiert, kommt es zur Kantenrundung und veränderten maskenbezogenen Strukturbreiten. Die Abb. 23 zeigt für Abweichungen von den optimalen Parametern die erreichbare Kontur und Strukturbreite der Mikroporen.

Üblicherweise dienen Verfahren wie die Licht-Mikroskopie bzw. Elektronenrastermikroskopie (SEM) zur Charakterisierung der erzeugten Strukturen. Mit Hilfe der SEM-Abbildung kann zusätzlich ein Materialkontrast neben der Topologie der Probe abgebildet werden. Beide Verfahren lassen sich durch die Rasterkraftmikroskopie (AFM) unterstützen, die vor allem dreidimensionale Höhenprofile darstellt. Da die AFM-Spitze (Tip) die Topologie der Probenoberfläche abtastet, liefert sie relative Höhenwerte zu Filmeigenschaften, wie der Oberflächenrauigkeit, von Struktur- und Defekttiefen. Zur absoluten Filmdicke kann keine Aussage getroffen werden.

Im Kontaktbelichtungsverfahren erfolgt die Mikrostrukturierung eines 300nm dicken PMMA-Films nach den Prozessschritten in Abb. 22. Es wird über 10min mit einer D₂-Lampe belichtet. Die Entwicklungszeit in MIBK:ISO 1:1 beträgt 3min.

Das lichtmikroskopische Bild in Abb. 24 zeigt Interferenzringe. Sie werden beobachtet, weil die hexagonalen Poren durch ein inhomogenes Strahlprofil unterschiedlich tief strukturiert werden. Die Interferenzringe sind an den dunkleren Porenbodenbereichen der Pore 1 und jeder zu ihr übernächsten Pore zu erkennen.

Im SEM-Bild dagegen erscheint die zentrale Pore 1 hell. Die freigelegte Goldschicht liefert eine hohe Anzahl an rückgestreuten Elektronen und erscheint heller im Vergleich zum PMMA. Daraus lässt sich ein Materialkontrast ableiten. Ob die Pore tatsächlich vollständig von Restmaterial befreit ist, kann auch anhand des SEM-Bildes nicht bewiesen werden. Sehr dünne Polymer-schichten oder kleinere lokale Anreicherungen könnten durch die Beschleunigungsspannung der Elektronen von 1keV durchstrahlt werden.

In den benachbarten Mikroporen um die zentrale Pore 1 erkennt man anhand der dunklen Bereiche in den Hexagons, dass sie nur teilweise durchstrukturiert vorliegen. Es verbleibt Restmaterial am Porengrund, der in Richtung Pore 1 abnimmt.

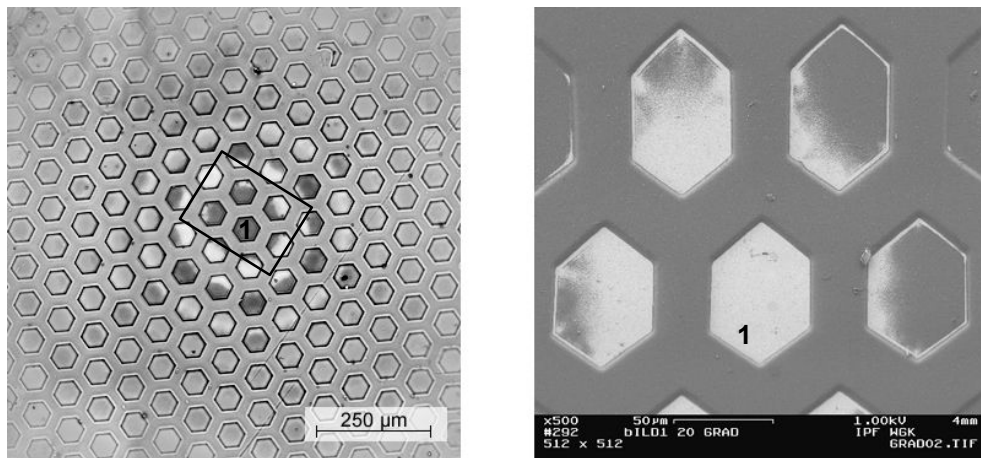


Abb. 24: (Links) Aufricht-Mikroskopische Aufnahme einer belichteten hexagonalen PMMA-Mikrostruktur (Rechts) SEM-Bild des markierten Porenbereiches.

Um die ungleichmäßige Strahlintensität über der Belichtungsfläche zu homogenisieren, kommt im weiterentwickelten Versuchsaufbau eine fünfadrige (je $400\mu\text{m}$ dicke) UV-durchlässige Quarzfaser (OPTOCON, Germany) zwischen Lichtquelle und Maske zum Einsatz. Hierdurch verlängern sich durch den Intensitätsabfall in der Faser die Belichtungszeiten je Probe. Es können jedoch fünf Proben parallel mit gleichmäßiger Strahlintensität belichtet werden. Die Belichtungszeit für PMMA-Filme im Schichtdickenbereich um 300nm erhöht sich auf 60min unter Beibehaltung der Entwicklungszeit von 3min in MIBK:ISO 1:1.

Das lichtmikroskopische und das SEM Verfahren zeigen nicht, ob die Strukturierung zu vollständig freigeräumten Poren führt. Zur Charakterisierung wird nun das SPR-Imaging hinzugezogen. Da das Verfahren zur Detektion im Sensor-Array eingesetzt werden soll, müssen sich Mikroporen und PMMA eindeutig voneinander unterscheiden lassen. Abb. 25 zeigt ein SPR-Bild der Probe. Die hexagonalen Poren mit einem Durchmesser von 40nm sind mit Ringer-Pufferlösung gefüllt. Der Resonanzwinkel wird auf maximalen SPR-Kontrast gestellt.

Es ergibt sich lediglich ein geringer Helligkeitskontrast zwischen PMMA- und Porenregion. Die hexagonale Form der Poren ist nicht zu erkennen.

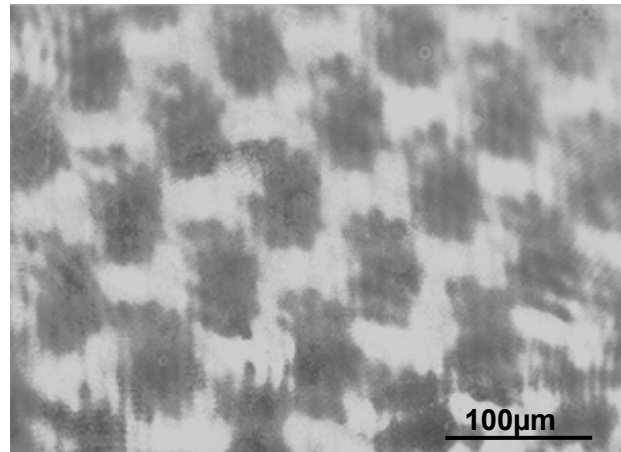


Abb. 25: SPR-Bild einer hexagonalen Mikrostruktur (PMMA-Filmdicke: 300nm, Strukturbreite 40nm) auf Gold ($d_{Au}=50nm$).

Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Charakterisierungsmethoden lässt sich aus dem jeweils erfassten Probenbereich herleiten. Die bildgebende Information im Licht- bzw. Elektronenmikroskop stammt vorrangig aus dem Bereich der strukturierten Polymerschicht und seiner Oberfläche. Das Profil der Matrix lässt sich mit beiden Methoden abbilden.

Dem entgegen stammen die bildgebenden Informationen im SPR-Bild nur aus der Schicht direkt an der Goldoberfläche. Deshalb führen im oberflächensensitiven SPR-Imaging geringste Spuren von Restmaterial am Porenboden zu einer starken Kontrastverschlechterung im SPR-Bild. Der geringe SPR-Bildkontrast lässt vermuten, dass in den Poren PMMA bzw. dessen Abbauprodukte verbleiben. Sie führen zu einer verminderten Sensitivität der Detektionsmethode im Ionenkanalsensor-Array.

Ziele anschließender Untersuchungen zur Mikrostrukturierung sind demnach nicht die strukturgetreue Abbildung der Maskengeometrie bzw. reproduzierbares oder homogenes Belichten über die gesamte Sensor-Array-Fläche, sondern das Ziel ist es, möglichst freie Poren zu generieren. Um eine Kontraststeigerung zu erzielen, muss eine Methode entwickelt werden, welche quantitative Aussagen zu der verbleibenden dünnen PMMA-Schicht in den Poren machen kann.

4.2.2 Spektroskopische Charakterisierung mittels FTIR-Imaging

Die Eigenschaften eines dünnen PMMA-Films lassen sich auf molekularem Niveau mittels Schwingungsspektroskopie erfassen. Das betrifft sowohl die Anbindung der polymeren Ketten auf Oberflächen als auch die Eigenschaften innerhalb des Polymers. Abb. 26 zeigt das FTIR-Spektrum einer 1 µm dicken PMMA-Schicht auf einer 50nm Goldschicht.

Das Spektrum wird in Reflexion mit dem IR-Mikroskop aufgenommen. Die Indexierung der Extinktion E_R verweist auf die Messungen in Reflexion. E_R ist als negativer dekadischer Logarithmus aus dem Verhältnis aus r , der reflektierten Intensität des IR-Lichtes der beschichteten Probe, und r_0 , der einer reinen Goldschicht, definiert:

$$E_R \equiv -\log(r/r_0)$$

Die Bandenzuordnung ist in Tabelle 3 aufgelistet. Die Banden in dem Bereich 1100cm^{-1} - 1300cm^{-1} lassen sich aufgrund der komplexen Schwingungen und Kopplungen nur bedingt zuordnen [145, 146]. Die Valenzschwingung der Carbonyl-Gruppe wurde vielfach zur Untersuchung des Polymers als auch zur Charakterisierung der Anbindung auf Oberflächen herangezogen [147, 148, 149, 150, 151]. Aus der Lage des Maximums, aus der Bandbreite und der Bandenform lassen sich intra- und intermolekulare Wechselwirkungen ableiten. Generell verschiebt sich das Maximum der Bande zu kleineren Wellenzahlen bei einer Bindung der C=O-Gruppe an Oberflächen oder infolge von Wasserstoffbrückenbindungen [152]. Die Verschiebung liegt zwischen 15 und 35cm^{-1} . Üblicherweise wird dabei zwischen freien und gebundenen C=O-Gruppen unterschieden [153].

Mit der FTIR-Spektroskopie können neben chemischer Informationen auch quantitative Aussagen zur optischen Schichtdicke des PMMA erhalten werden.

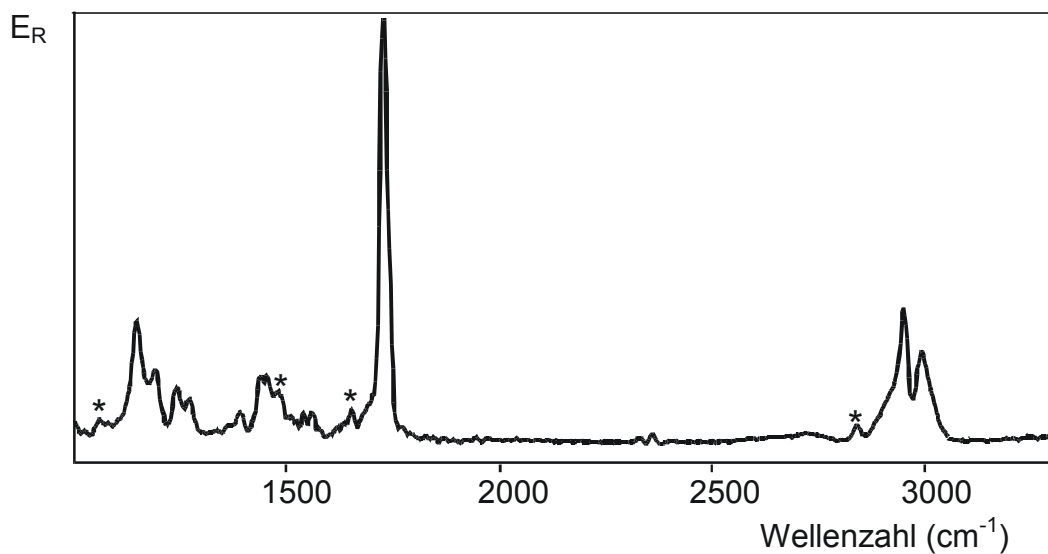


Abb. 26: FTIR-Spektrum einer $1\mu\text{m}$ dicken PMMA-Schicht auf Gold. Die mit * markierten Banden stammen von Resten des Lösemittels Chlorbenzol.

Tabelle 3: Bandenzuordnung für das FTIR-Spektrum von PMMA [154]

Wellenzahl (cm-1)	Zuordnung
1150 – 1190	Gerüstschwingungen, gekoppelt mit CH-Deformationsschwingung, $\nu(\text{C}(\text{C}=\text{O})-\text{O})$
1240 – 1270	$\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{C}-\text{O})$ gekoppelt mit $\nu(\text{C}-\text{O})$
1375	$\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3)$
1436	$\delta_{\text{s}}(\text{CH}_3-\text{O})$
1440 - 1450	$\delta(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH})$, $\nu(\text{CC})$
1465	$\delta_{\text{as}}(\text{CH}_3-\text{O})$
ca. 1730	$\nu(\text{C}=\text{O})$
2850 – 2995	$\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{H})$, $\nu_{\text{s}}(\text{C}-\text{H})$ der CH_2 -, CH_3 - bzw. CH_3-O -Gruppe

Im FTIR-Imaging-Modus kann die Abbildung der Probe vorgenommen werden, wobei jedes Pixel die Informationen des IR-Spektrums im Bereich von $1000\text{-}3500\text{cm}^{-1}$ am Ort x enthält. Im Imaging-Modus kann zusätzlich eine örtliche Zuordnung zum polymeren Steg- bzw. Porenbereich auf der Probe vorgenommen werden.

Die Imaging-Messungen werden in Reflexion durchgeführt. In den Hellfeldbildern (64×64 Pixel; 4096 Einzelspektren) wird die integrale Extinktion im spektralen Bereich von 1680cm^{-1} bis 1760cm^{-1} dargestellt. Es wird eine Fuzzy-k-means-Clusteranalyse mit vorgegebener Clusteranzahl durchgeführt. Die Zentroid-Spektren des jeweiligen Clusters dienen der quantitativen Bewertung der optischen PMMA-Schichtdicke. Als optische Schichtdicke wird die wirksame Schichtdicke bezüglich der Absorption bezeichnet. Die Clusterzuordnung spiegelt damit indirekt physikalische Schichtdickenunterschiede der Proben wider. Die Zentroid-Spektren werden basislinienkorrigiert und normiert.

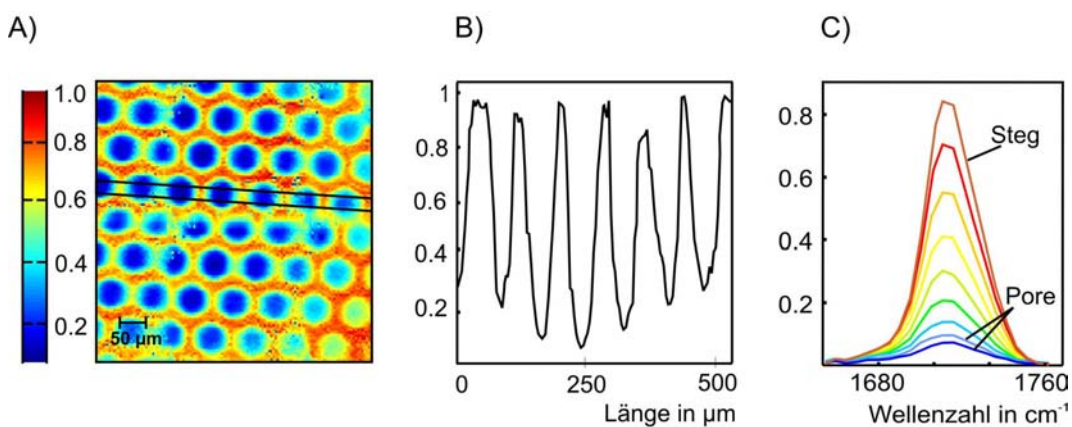


Abb. 27: A) Integrale Extinktion im Bereich der Carbonyl-Schwingung bei 1680cm^{-1} bis 1760cm^{-1} B) Profilschnitt des markierten Bereichs des Hellfeldbildes und C) E_R -Wert der Zentroid-Spektren nach Clusteranalyse mit 10 Clustern (Zentroid-Spektrum der Ausreißer nicht dargestellt).

Das Hellfeldbild einer 300nm dicken mikrostrukturierten PMMA-Schicht auf Gold (Abb. 27A) stellt die integrale Extinktion nach Normierung dar. Die Extinktion im Wellenlängenbereich der Carbonyl-Schwingung von 1680cm^{-1} bis 1740cm^{-1} wird durch die Farbdarstellung codiert. Die integrale Extinktion stellt einen Summenparameter dar, der die Menge polymerer Ketten pro Fläche angibt. Es kann allein aus der integralen Extinktion im Hellfeldbild nicht zwischen der Dichte des Polymers und der physikalischen Schichtdicke unterschieden werden. Die physikalische Restschichtdicke am Porenboden ist unter der Bedingung zu ermitteln, dass im Bereich der belichteten Strukturen von einer konstanten Dichteverteilung des PMMA mit einer unveränderten chemischen Zusammensetzung im Vergleich zum Stegmaterial ausgegangen wird.

Im Profilschnitt (Abb. 27B) ist zu erkennen, dass die Poren nicht komplett freigeräumt vorliegen. Die Poren zeigen keine vollständig entwickelte Struktur, da der Boden muldenförmig vertieft ist. Anhand der Tiefe der Mikrostrukturen im Profilschnitt lässt sich ebenfalls die Inhomogenität der Strahlintensität bei der Belichtung erkennen. Die Probe wurde ohne UV-Faser-Homogenisierung 10min lang belichtet und 3min lang entwickelt.

Die Auswertung der FTIR-Imaging-Messungen erfolgt durch Clusteranalyse mit 10 Clustern. Der zehnte Cluster enthält Ausreißerspektren (in Abb. 27C nicht dargestellt), deren Extinktionswerte oberhalb von 2,0 liegen, was zum Teil auf defekte Pixel des FPA-Detektors und auf Staubkörner auf der Probe zurückzuführen ist. Mit Hilfe der Zentroid-Spektren (Abb. 27C) erfolgt die Zuordnung zum Bereich der Poren und der PMMA-Stege.

Die beiden Zentroid-Spektren mit den geringsten E_R -Maximalwerten gehören zu Clustern im Bereich der Poren. Eine Detaildarstellung des Porenbereiches wird in Anhang 7.5 gegeben. Dazu wird der Bereich der Poren aus Abb. 27A) ausgeschnitten und erneut einer Clusteranalyse unterzogen. Die Darstellung der Clusterkarte in Anhang 7.5 zeigt keine homogene Clusterverteilung im Porenbereich. Die Restintensität der Carbonyl-Bande beweist damit, dass der Porenboden inhomogen mit Restmaterial bedeckt ist.

Wird ein belichteter, jedoch nicht entwickelter PMMA-Film mit einer Dicke von weniger als 50nm (Schichtdicke liegt unterhalb der Nachweisgrenze bei der reflektometrischen Schichtdickenmessung) in Ätzlösung (KI/I₂-Lösung [155]) gelegt, bleibt die Goldschicht auch nach Tagen noch intakt. Daher kann eine Diffusion des Ätzmittels durch die Polymerschicht ausgeschlossen werden. Versuche, die Goldschicht im Bereich der Poren wegzuzüßen, verliefen positiv. D.h. das Ätzmittel kann mit der Goldschicht am Porenboden in Kontakt treten. Daraus wird geschlussfolgert, dass an bestimmten Stellen die Goldschicht freizugänglich vorliegt.

Eine Bestimmung der tatsächlichen physikalischen Schichtdicke des Materialrestes in den Poren ist wegen möglicher Variationen des Extinktionskoeffizienten nicht möglich. Der Nachweis des verbleibenden Polymermaterials in den Poren mit FTIR-Imaging gestattet, die Methode zur Charakterisierung der Polymermatrix und zur Optimierung des lithographischen Prozesses erfolgreich einzusetzen.

4.3 Optimierung des UV-Lithographieprozesses

Die Optimierung des lithographischen Prozesses zielt auf die Verringerung der Restschichtdicke im Bereich der Poren.

In Abb. 28 sind die Querschnittsprofile der Mikrostrukturen für eine Belichtungszeit von 60min und einer Entwicklungszeit von 3min in MIBK:ISO 1:1 für die Xenon- und D₂-Lampe dargestellt (vgl. Abb. 21). Die Profilerzeugung erfolgt anhand der integralen E_R -Werte im Bereich 1680cm⁻¹ bis 1760cm⁻¹ der ν C=O-Schwingung.

Man erkennt in Profildarstellung, dass bei beiden Lichtquellen noch Material in den Poren zurückbleibt. Die Steghöhe in der PMMA-Matrix wird deutlich abgetragen. Allerdings zeigt sich bereits eine starke Überbelichtung des PMMA-Films mit der D₂-Lampe. Es ergeben sich, bezogen auf die integralen Extinktionswerte der unbelichteten Polymerstege (Maximalwert der integralen Extinktion), tiefere Poren in der Mikrostruktur für eine Belichtung bei gleicher Dauer für die D₂-Lampe. Die Profildarstellung weist mit Werten deutlich < 0,2 geringere Extinktionswerte im Porenbereich auf, als mit der Xe-Lampe erzielbar sind. Daraus kann für die D₂-Lampe eine höhere effektive Lichtleistung und damit verbunden kürzere Belichtungszeiten abgeleitet werden. Alle folgenden PMMA-Filme werden mit der D₂-Lampe belichtet.

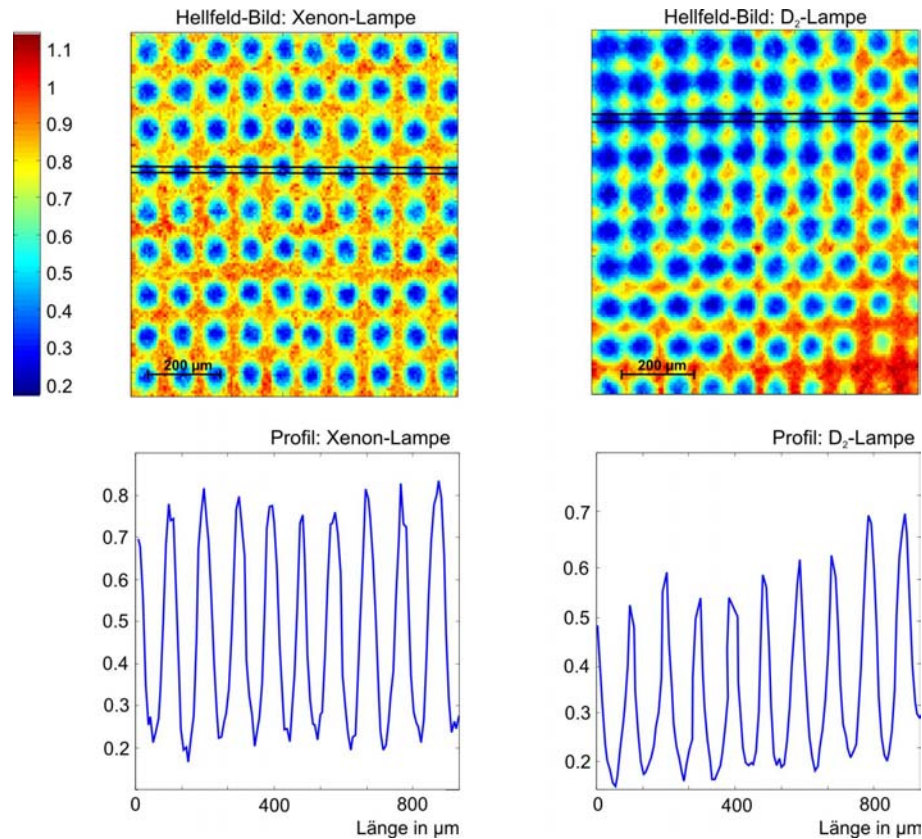


Abb. 28: FTIR-Imaging Messungen von Mikrostrukturen (TEM-Maske: runde Porendurchmesser $40\mu\text{m}$) in einem 300nm dicken PMMA-Film. (Links) Integrale Extinktion mit Profildarstellung des markierten Probenbereiches mit Xenon-Lampe belichtet. (Rechts) Integrale Extinktion mit Profildarstellung des markierten Probenbereiches mit D_2 -Lampe belichtet.

Um die optimale Belichtungsdosis für die D_2 -Lampe mit gekoppelter UV-durchlässiger Quarzfaser an PMMA-Filmen mit einer Schichtdicke von rund 300nm zu bestimmen, wird die Mikrostruktur unterschiedlich lang belichtet (Abb. 29). Der Entwicklungsprozess wird 15min lang in MIBK:ISO 1:1 durchgeführt. Die Entwicklungszeit wird sehr hoch angesetzt, um tatsächlich alle fragmentierten Kettenbruchstücke des PMMA zu lösen. Anschließend wird für 2 Stunden bei 180°C getempert.

Nach der Clusteranalyse (Clusteranzahl=10) erfolgt Normierung auf den maximalen E_R -Wert des Zentroid-Spektrums des unbelichteten Stegbereiches (Abb. 27C). Die E_R -Werte der intensitätsschwächsten Zentroid-Spektren (Poren-Bereiche) werden gegen die Belichtungsdosis aufgetragen. Mit steigender Dosis sollten die Strukturen an Tiefe gewinnen und es kann eine optimale Belichtungsdosis ermittelt werden, nach der keine weitere Vertiefung der Strukturen erreicht wird. Die eingestrahelte Dosis direkt auf der Probenoberfläche kann im Versuchsaufbau bestimmt werden. Dazu wird mit einem Miniaturleistungsmesser (MOP - engl. Miniature Optical Powermeter) [Aerotech, USA] eine durchschnittliche Lichtleistung von $12,4\mu\text{W}$ am Faserausgang gemessen. Der Bezug auf die Belichtungsfläche von $2 \cdot 10^{-3}\text{cm}^2$ ergibt eine flächennormierte Belichtungsleistung von $6,3\text{mJ} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. Mit Hilfe der belichteten Zeitdauer kann die eingestrahelte Dosis errechnet werden.

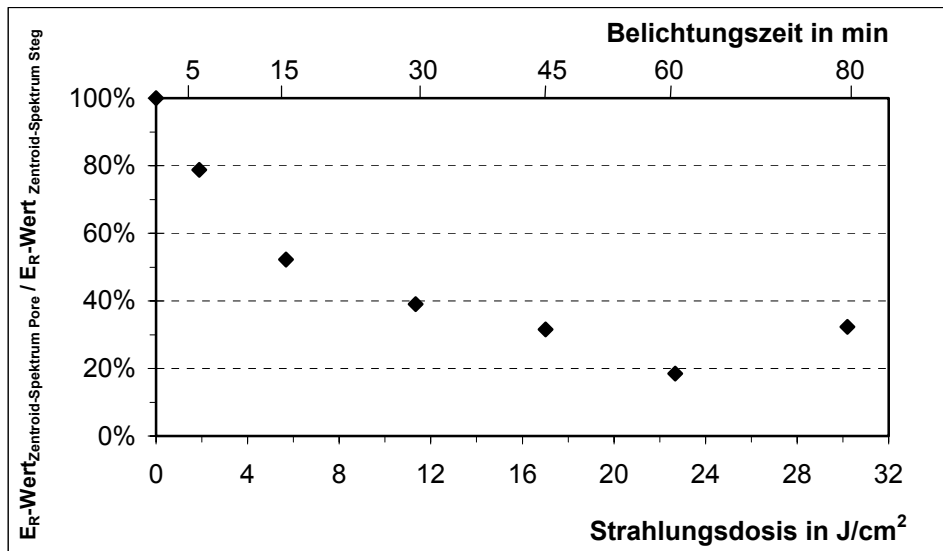


Abb. 29: Abhängigkeit des prozentualen Verhältnisses der E_R -Werte des Poren-Zentroid-Spektrums zum E_R -Wert des Zentroid-Spektrums des Stegs von der Strahlungsdosis der D_2 -Lampe mit Faserkopplung bzw. ihrer Belichtungszeit.

Bereits nach 15 min ist eine deutliche Strukturierung erfolgt. Nach 60min können auch bei weiterer Verlängerung der Belichtungsdauer keine tieferen Strukturen erzielt werden. Die Poren- und Stegweiten zeigen, dass ab einer Belichtungsdauer von 45min eine Überbelichtung der Strukturen stattfindet. Bei Belichtungszeiten > 60 min kommt es zur Einmündung der gesamten Mikrostruktur. Innerhalb der Poren verbleibt eine optische Restschichtdicke von minimal 20% bezogen auf die Schichtdicke der Stege. Die Restschichtdicke erscheint für eine verlängerte Belichtungsdauer von 80min höher als bei der um 20 Minuten kürzeren Belichtungszeit. Das dargestellte Verhältnis steigt bei konstanter Restschichtdicke durch Verminderung der Steghöhe an. Dieser Effekt der Einmündung ist nicht erwünscht, da dadurch die Porentiefe und damit das Volumen dieser Poren absinkt.

Die ermittelte optimale Belichtungsdosis für Strukturgrößen von $10\mu\text{m}$ bis $50\mu\text{m}$ in rund 300nm dicken PMMA-Filmen beträgt damit 60min. Die minimale Restschichtdicke lässt sich mit weiterer Erhöhung der Belichtungszeit bzw. -dosis nicht weiter vermindern.

Mit zunehmender Resist-Tiefe steigt die Länge der gebildeten Kettenbruchstücke linear an und die vom Resist absorbierte Energie sinkt zum Substrat hin ab [156]. Man kann dieses Verhalten darauf zurückführen, dass die Transmission des PMMA durch die Bildung von C=C-Verbindungen beim Belichten sehr stark absinkt [128]. Im Folgenden wird deshalb untersucht, ob die Belichtungsdosis in Substratnähe ausreicht, um für den Entwickler genügend lösliche Kettenfragmente zu erzeugen. Dazu wird im folgenden Abschnitt A) die Größe der Fragmente berechnet. Im Abschnitt B) werden dann anhand von entsprechend kurzkettigem Polymer die Lösungseigenschaften geprüft und mit denen der Fragmente verglichen. In C) schließlich wird experimentell geprüft, wie sich in maximalen Resist-Tiefen eine Polymerkettenlänge verhält, die auch ohne Belichtung im Entwickler löslich ist. Sollten Poren mit verminderter optischer Restschicht nachgewiesen werden, ist die Belichtungsdosis der D_2 -Lampe für die verwendeten PMMA-Filme zu gering.

A) Aus der experimentell bestimmten Auflösungsrate S_p kann das mittlere Molekulargewicht (MW) der Kettenfragmente MW_f über:

$$S_p = \frac{\beta}{MW_f^\alpha} \quad \text{Formel 10}$$

nach [165] berechnet werden. α und β sind empirische Konstanten, die in [165] aus Stoffkonstanten, dem ursprünglichen Molekulargewicht und einer schichtdickenabhängigen Energieverteilung im Resist berechnet werden können. α wird mit 3,4 und β mit $2 \cdot 10^{13} \text{ nm/min}$ im Entwicklersystem MIBK:ISO 1:2 bestimmt [157]. Hiermit lässt sich das mittlere MW_f der fragmentierten PMMA-Ketten nach der UV-Belichtung und Entwicklung ungefähr mit rund 50000 g/mol (entspricht 50K) abschätzen. Vereinfacht wird im Mittel also die ursprüngliche PMMA-Kette in 20 gleichgroße Fragmente zerlegt, die im Entwickler löslich sind.

B) Kurzkettiges PMMA mit einem MW von 50K zeigt im Entwickler MIBK:ISO 1:1, dass es kürzere Belichtungszeiten zur Fragmentierung und damit für die gewünschte Löslichkeitsänderung benötigt als ursprünglich eingesetztes PMMA mit einer Kettenlänge von 950K. Bei Entwicklungszeiten oberhalb von 3min wird die Schichtdicke des unbelichteten 50K PMMA bereits signifikant verringert.

C) Dass die Belichtungsdosis auch in Substrat-Nähe zur Erzeugung löslicher Kettenfragmente ausreicht, wird indirekt nachgewiesen. Dazu wird auf dem Gold-Substrat ein PMMA-Film mit einem MW der Polymerkette von 50K aufgebracht. Dieses MW entspricht bereits ohne Fragmentierung durch UV-Licht dem MW_f nach der Belichtung des PMMA 950K. Über diesen PMMA-Film wird ein zweiter mit dem ursprünglichen MW von 950K aufgebracht, so dass eine Gesamtschichtdicke an PMMA von rund 300nm entsteht. Das Zwei-Schichtsystem wird analog der Schicht aus PMMA 950K belichtet und entwickelt. Tritt ein Energieabfall des UV-Lichtes im Polymer auf, insbesondere in Substratnähe und tieferen Resistschichten, wird durch den sensitiveren kurzkettigen PMMA-Film mit MW 50K der verminderten Ketten-Fragmentierung entgegengewirkt. Diesen Effekt zeigt Abb. 30.

Die notwendige Belichtungsdosis, die für die Spaltung der PMMA-Ketten im Mehrschichtsystem 50K-950K-PMMA notwendig ist, muss demnach deutlich geringer sein als bei einem homogenen 300nm dicken PMMA-Film der Kettenlänge 950K.

Bei der Belichtung von 60min und einer Entwicklungszeit von 15min zeigt sich, dass in den Poren des Mehrschichtsystems ebenfalls rund 20% der ursprünglichen optischen Schichtdicke an PMMA zurückbleiben.

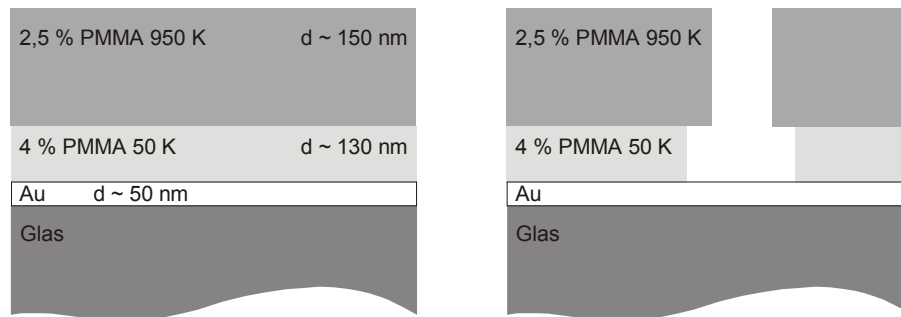


Abb. 30: (Links) Mehrschichtsystem mit reflektometrisch bestimmten Schichtdicken. (Rechts) Schematisches Resistprofil nach Belichtung und Entwicklung.

Werden unterschiedliche Schichtdicken (160nm und 100nm) der PMMA-Filme mit MW 50K gewählt und die Schichtdicke des PMMA 950K entsprechend der Gesamtschichtdicke von 300nm angepasst, liegt die FTIR-spektroskopisch ermittelte optische Schichtdicke in den Poren unverändert bei $21\% \pm 1\%$ bezogen auf die Schichtdicke der Stege. Hieraus lässt sich schließen, dass die Fragmentierung in den PMMA-Filmen mit einem MW von 950K bei der verwendeten Belichtungs-dosis von $23\text{J}/\text{cm}^2$ bis zur Substratoberfläche erfolgt.

Schlussfolgerungen aus diesen Ergebnissen sind:

- ▷ Ein Entfernen des restlichen Materials in den Poren der Mikrostruktur kann nicht durch die Wahl einer speziellen Belichtungsquelle im UV-Bereich erreicht werden.
- ▷ Mit verlängerten Belichtungszeiten lässt sich die Restschichtdicke nicht weiter vermindern. Sie beträgt rund 20% der optischen Schichtdicke der PMMA-Stege.
- ▷ Die optische Restschichtdicke stimmt für das sensitivere Mehrschichtsystem und das PMMA 950K überein. Der Dosisabfall innerhalb des PMMA-Films ist somit nicht für die Dicke der Restschicht verantwortlich. Sie kann durch Variation der eingesetzten PMMA-Kettenlänge nicht verringert werden.

4.3.1 Entwicklung und Nachätzen der Mikroporen

Im Folgenden wird untersucht, ob durch die Optimierung des Entwicklungsprozesses oder einen weiteren Ätzschritt das verbliebene Material in den Mikroporen entfernt werden kann. Dazu werden nasschemische und trockene Ätzprozesse unterschieden [158].

4.3.1.1 Nasschemisches Ätzen

Der belichtete PMMA-Film wird nach der Belichtung in eine Entwicklerbadlösung eingelegt. Anschließend wird mit einer Waschlösung der Entwicklungsprozess gestoppt und Reste des Entwicklers und damit in ihm verbliebene Kettenfragmente entfernt.

Im Idealfall löst der Entwickler selektiv alle fragmentierten Polymerketten. Gute Lösemittel für PMMA sind Ketone, weil sie polar sind und kaum Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Auf Grund ihrer hohen Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen sind Alkohole schlechte Lösemittel [159]. In Lösemittelgemischen schwächt der Alkohol die Lösekraft des Ketons ab, so

dass unbelichtete Bereiche nicht mit gelöst werden. Durch den Einsatz von Entwicklersystemen wird eine Kontraststeigerung im Entwicklungsprozess erreicht.

Lange Entwicklungszeiten führen oftmals zum signifikanten Abtragen oder starken Quellen des unbelichteten PMMA und zu Brüchen [160, 164]. Deshalb werden kurze Entwicklungszeiten bei längeren Belichtungszeiten angestrebt. Die Auflösungsrate S_L ist zur Größe des Lösemittelmoleküls und zur Entwicklungszeit umgekehrt proportional [159], wobei β ein empirischer Faktor ist. Sie wird aus dem linearen Zusammenhang zwischen der Verringerung der Schichtdicke und der Zeit im Entwickler bestimmt:

$$S_L = \frac{\Delta d_{PMMA}}{\Delta t} \sim \left(\frac{1}{MW_{LSM}} \right)^\beta \quad \text{Formel 11}$$

Die vier gebräuchlichsten Entwicklersysteme für PMMA (Tabelle 4) wurden empirisch ermittelt. Die Stärke der Lösemittel fällt in der Reihenfolge

MEK > MIBK > Cellosolve > BEE.

Tabelle 4: Entwicklersysteme für PMMA.

Lösemittel	Zusammensetzung	Belichtungsverfahren	Bemerkung	Literatur
Methylethylketon (MEK)	MEK:ISO 7:3 (w/w)	Elektronenstrahl	stärkster Entwickler, keine Gel-Schicht	[161, 162, 163]
Methylisobutylketon (MIBK)	MIBK:ISO 1:3 bis 1:1 (v/v)	Elektronenstrahl	starker Entwickler; Gel-Schicht	[163, 164, 165]
2-Ethoxy-ethanol (Cellosolve)	Cellosolve:Methanol 3:7	Elektronenstrahl	verkürzte Entwicklungszeiten	[166, 167, 168]
2-Butoxy-2-ethoxyethanol (BEE)	BEE:H ₂ O:Morpholin-2-Aminoethanol 60:15:20:5 % (v/v)	Röntgenstrahlung	als GG-Entwickler bezeichnet; hohe Aspektverhältnisse in dicken PMMA-Filmen; lange Entwicklungszeiten; keine Resist-Brüche	[128, 156, 169, 170]

Ob das verbleibende Material in den Mikroporen vollständig entfernt oder vermindert werden kann, wird nachfolgend unter konstanten Belichtungsbedingungen (Belichtungszeit 60min) mit den unterschiedlichen Entwicklersystemen getestet. Vor der FTIR-Imaging-Messung erfolgt Temperung bei 180°C für zwei Stunden, um Lösemittelreste auszutreiben. In Abb. 31 sind die E_R -Werte der Zentroid-Spektren, die dem Porenbereich zugeordnet werden, relativ zu den E_R -Werten der Zentroid-Spektren des Stegbereiches nach der Entwicklungszeit von jeweils 15min bei RT von 20°C dargestellt.

Neben den in Abb. 31 dargestellten Entwicklersystemen wurde auch das stärkste Entwicklersystem MEK:ISO 7:3 (w/w) getestet. Die MEK-Moleküle sind im Verhältnis zu den anderen Lösemittelmolekülen am kleinsten. Sie lassen die stärkste Lösekraft erwarten. Dieses Entwicklersystem ist jedoch nicht einsetzbar, da der PMMA-Film bereits nach einer Sekunde im Entwicklerbad Brüche und ein partielles Ablösen vom Gold-Substrat zeigt.

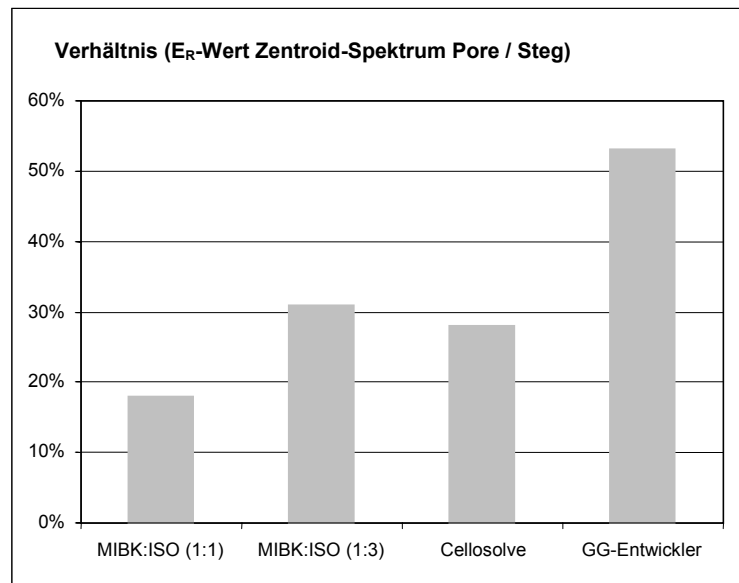


Abb. 31: Prozentuales Verhältnis der E_R -Werte von Poren-Zentroid-Spektrum zu Zentroid-Spektrum der Stege nach Entwicklung in verschiedenen Entwicklersystemen.

Der GG-Entwickler zeigt die größte optische Restschichtdicke im Bereich der Poren. Dieses Ergebnis kann auf einer sehr niedrigen Auflösungsrate oder der Ausbildung einer sehr stabilen Gel-Schicht beruhen. Weitere Untersuchungen werden mit diesem Entwickler nicht durchgeführt.

Aus den Entwicklersystemen wird das MIBK:ISO 1:1 für alle weiteren Untersuchungen ausgewählt. Er zeigt kaum Temperaturabhängigkeit [159]. Die Größe der MIBK-Moleküle und die Lösekraft sind hoch, ohne jedoch die PMMA-Mikrostrukturen zu beschädigen. Im Vergleich zur Entwicklerzusammensetzung 1:3 zeigt sich eine erhöhte Lösekraft, d.h. eine geringere Belichtungs-dosis bei gleichen Entwicklungsbedingungen wird benötigt. Es werden keine Brüche im PMMA-Film beobachtet. Eine Erhöhung des MIBK-Anteils im Entwickler auf über 50% ist nicht empfehlenswert, da sich ab 60% MIBK-Anteil unbelichtetes PMMA auflöst [171].

Abb. 32 zeigt anhand der Änderung der E_R -Werte in den Poren, dass die Auflösungsrate S_L stetig sinkt und im Gleichgewichtszustand zu einem Grenzwert der optischen Restschichtdicke nach rund 10min führt. Die Resist-Schichtdicke vor der Entwicklung beträgt 0,67 und wird in den ersten Sekunden im Entwickler schnell abgetragen. Nach 2min ist die Auflösungsrate von $4,3\text{min}^{-1}$ auf $0,1\text{min}^{-1}$ abgesunken und beträgt nach 10min nur noch $3 \cdot 10^{-3}\text{min}^{-1}$. Im Gleichgewichtszustand beträgt die optische Restschichtdicke 18% der ursprünglichen Schichtdicke bei einer Auflösungsrate von 0.

Prinzipiell kann aus der Entwicklerlösung eine Abscheidung von PMMA-Kettenfragmenten in den Poren stattfinden. Untersuchungen zeigen jedoch, dass eine Mehrfachentwicklung in frisch zubereiteten Entwicklerbädern die optische Restschichtdicke nicht weiter absenken kann.

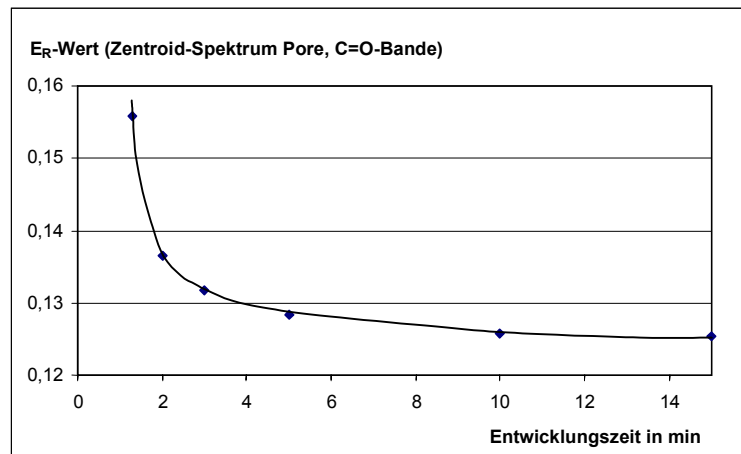


Abb. 32: Abhängigkeit der E_R -Werte in den Poren von der Entwicklungszeit in MIBK:ISO 1:1 bei RT und anschließend 2h bei 180°C getempert.

Bei der Entwicklung können sich Gasbläschen bilden. Sie verhindern ein weiteres Entwickeln oder setzen die Auflösungsrate herab. Es konnte kein Effekt auf die Restschichtdicke in den Poren des PMMA beobachtet werden, wenn die Probe im Vakuum oder im Ultraschallbad entwickelt wird. Bei der ultraschallgestützten Entwicklung kommt es außerdem häufig zu einem partiellen Ablösen und zu Brüchen im PMMA-Film.

Nach CHENG und CHEN [172] zeigt die Schwerkraft der Polymerketten einen Einfluss auf die Auflösungsrate. Die Schwerkraft unterstützt den Abtransport der Kettenfragmente aus den Mikrostrukturen. Die Plazierung des Glasprismas mit der Polymermatrix im Entwicklerbad horizontal mit den Porenöffnungen nach unten (0°) zeigt jedoch keinen erhöhten Abtrag in den Poren im Vergleich zu einer Lage der Porenöffnungen von 90° bzw. 120° zur Horizontalen bzw. mit den Porenöffnungen nach oben gerichtet.

Mechanisches Rühren hat keinen Einfluss auf Dicke der verbleibenden Restschicht, führt jedoch zu einer Verkürzung der Entwicklungszeit auf 3min im Entwickler MIBK:ISO 1:1. Es wird fortan zur Unterstützung des Entwicklungsprozesses eingesetzt,.

4.3.1.2 Trockenätzen durch Sauerstoff- und Luftplasma

Neben der nasschemischen Entwicklung wird zur Entfernung von verbliebenen Polymerresten oftmals ein trockener Ätzprozess durchgeführt [116, 118, 173]. Beim Ätzen im Plasma finden verschiedene Prozesse statt, die die Resist-Oberfläche angreifen und abtragen. Es werden hauptsächlich drei Plasma-Effekte beobachtet [174]:

- Mikrosandstrahlen: vorrangig physikalischer Effekt des Sputterns
- Chemische Reaktion: Oberflächenreaktionen mit den Gas-Ionen des Plasmas
- UV-Strahlung: UV-Strahlung führt zur Spaltung von C-C-Ketten, C-O- bzw. anderen Hetero-Bindungen in organischen Verbindungen

Je nach Anzahl und Art der reaktiven Teilchen im Plasma (Elektronen, Ionen, Radikale und Neutralteilchen) überwiegt einer der genannten Prozesse. Der resultierende Plasma-Effekt ergibt sich aus der Kombination des Gastypes und der chemischen Struktur des Polymers [175]. Um geringe Polymerschichten abzutragen, wird in der Mikrosystemtechnik im Allgemeinen mit

Sauerstoff- oder Luft-Plasma geätzt. Durch den Angriff mit reaktiven Ionen oder Radikalen des Sauerstoffs wird die Polymeroberfläche chemisch stark verändert. Die Zugabe von Stickstoff zu Sauerstoff-Plasmen führt zur Erhöhung des Sputter-Effektes und zur Erhöhung der anisotropen Ätzrate [179]. Luftplasma, das ca. 80% Stickstoff enthält, wird daher einen höheren physikalischen Abtrag aufweisen.

PMMA ist wenig resistent gegenüber der Einwirkung von Sauerstoff-Plasma und zeigt vorrangig Depolymerisation, was auch auf den Einfluss der kurzwelligen Plasma-UV-Strahlung zurückzuführen ist [176]. Neben der Photooxidation entstehen gecrackte Polymerketten [177, 178]. Quervernetzungen finden statt. Bei vollständiger Umsetzung können gasförmige Spaltprodukte, wie CO_2 , H_2O und CO , im Vakuum abgesaugt werden [179].

Im Ätz-Versuch zur Verminderung der optischen Restschichtdicke am Porengrund wird eine hexagonale Mikrostruktur von $50\mu\text{m}$ Porenbreite in einem 300nm dicken PMMA-Film unvollständig entwickelt. In den Poren verbleiben rund 30% optischer Schichtdicke.

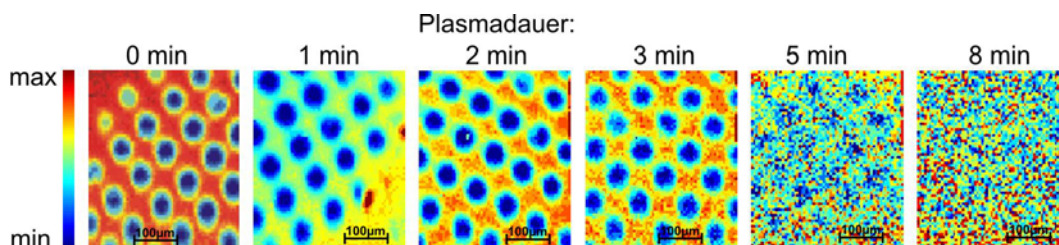


Abb. 33: E_R -Werte ($\text{C}=\text{O}$ -Bande) der Zentroid-Spektren.

Das FTIR-Bild (Abb. 33) und anschließend das entsprechende SPR-Bild werden nach unterschiedlichen Zeiten im Luft-Plasma aufgenommen. Die Clusteranalyse der FTIR-Bilder wird mit 20 Clustern für den Carbonyl-Schwingungsbereich von 1680cm^{-1} bis 1760cm^{-1} durchgeführt, um eine bessere Unterscheidung zwischen Poren- und Stegbereich insbesondere nach langen Zeiten im Plasma treffen zu können. Die laterale Zuordnung der Zentroid-Spektren ist in Abb. 33 dargestellt. Der quantitative Abtrag des PMMA im Bereich der Stege bzw. der Poren wird in Abb. 34 gezeigt.

Obwohl die Extinktion im spektralen Bereich der $\text{C}=\text{O}$ -Bande nicht auf 0 absinkt, kann nach 8min Ätz-Zeit unter höchster Leistungsstufe des Plasmacleaners nicht mehr zwischen Porenbereich und PMMA-Stege unterschieden werden. Der Abtrag entspricht im Stegbereich einer mittleren Ätzrate von $0,8\text{nm/s}$. Die maximale Ätzrate ist im Verhältnis zur Ätzrate von gerichteten Plasmen gering und stark anisotrop. Im Bereich der Poren weist die Ätzrate deutlich geringere Werte von durchschnittlich $0,2\text{nm/s}$ auf. Abb. 34 zeigt, dass der Stegbereich abgetragen wird, noch bevor die Poren vollständig freigeräumt werden. Zwischen 5min und 8min im Luft-Plasma gleichen sich die E_R -Werte für Poren- und Stegbereich an. Die Mikrostruktur ist nicht mehr detektierbar.

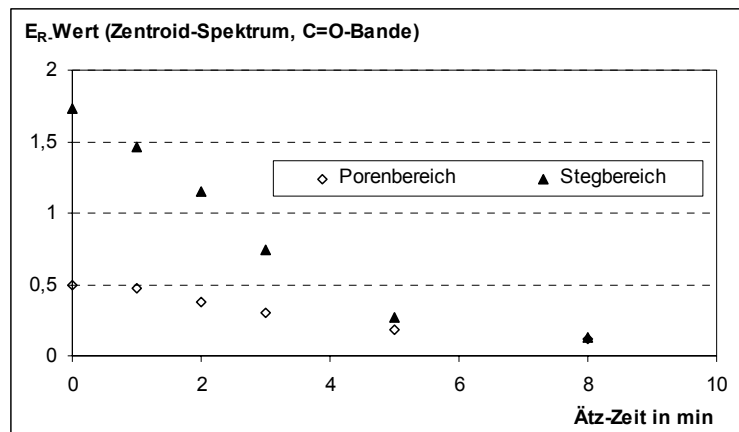


Abb. 34: Resist-Abtrag durch Ätzen im Luft-Plasma im Bereich der Steg- und Porenregion einer PMMA-Mikrostruktur.

Die geringere Ätzrate im Bereich der Poren kann nicht mit einer schlechteren Zugänglichkeit durch die reaktiven Plasma-Teilchen erklärt werden, da es sich bei der untersuchten Mikrostruktur mit dem Aspektverhältnis von 135 um sehr weite und flache Poren handelt. Die Unterschiede in den Ätzraten von Poren- und Stegbereich resultieren möglicherweise daraus, dass der PMMA-Film in Substratnähe eine höhere Ätzresistenz aufweist und langsamer angegriffen wird. Der Sputter-Effekt, der vorrangig durch die weniger reaktiven Stickstoff-Spezies ausgelöst wird, spricht ebenfalls auf den Eigenschaftsgradienten im PMMA an.

Die minimale optische Schichtdicke von 8% zur ursprünglichen optischen Schichtdicke der Stege wird nach 5min Ätz-Zeit erreicht. Sie liegt deutlich unterhalb der optischen Restschichtdicke, die bei der Optimierung des Belichtungs- und Entwicklungsprozesses erzielt wird. Nach dem Trockenätzprozess ist die Schichtdicke der Stege ebenfalls auf 1/6 der ursprünglichen optischen Schichtdicke abgesunken.

Der Kontrast zwischen den mit Puffer gefüllten Poren und dem Stegbereich im jeweiligen SPR-Bild sinkt mit zunehmender Ätz-Zeit ab. Nach 5min im Luft-Plasma ist er nicht mehr detektierbar.

Daraus ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- ▷ Das Gemisch von MIBK und ISO aus gleichen Anteilen ist am besten zur Entwicklung der PMMA-Matrix geeignet. Mechanisches Rühren verkürzt die Entwicklungszeit auf 3min.
- ▷ In den Mikroporen verbleibt eine optische Restschicht von 18% im Vergleich zur optischen Schichtdicke des Stegbereichs.
- ▷ Die Poren im PMMA-Film können weder durch die Variation der Entwicklerzusammensetzung noch der Entwicklungsparameter von Rückständen befreit werden.
- ▷ Ein Nachätzen der Poren im ungerichteten Luft-Plasma zeigt nicht den Effekt, dass partiell in den Poren die Restschichtdicke an PMMA bzw. seinen Abbauprodukten reduziert wird. Die Schichtdickenreduktion erfolgt schneller an den Stegen der PMMA-Matrix und führt zur drastischen Verringerung des Aspektverhältnisses.
- ▷ Durch die Plasmabehandlung wird der SPR-Bild-Kontrast vermindert.

4.3.2 Polymerreste in den Mikroporen

Die Erklärung der verbleibenden Restschicht in den Poren der Polymermatrix kann mit Hilfe der Grenzflächenchemie von PMMA mit dem Goldsubstrat des optischen Transducers erfolgen. In der Literatur sind Einflussfaktoren auf die Wechselwirkung zwischen Polymer und Metall-Substraten beschrieben, wobei insbesondere die Oberflächenrauigkeit eine wichtige Rolle spielt [180]. Neben der chemischen Oberflächenzusammensetzung des Metalls entscheidet auch die Art des Polymers und dessen MW über die Stärke der Wechselwirkungen in der Grenzschicht. Die adsorptiven Kräfte werden weiterhin von äußeren Einflüssen, wie der Einwirkung von elektromagnetischer Strahlung, Luftfeuchtigkeit oder organischen Lösemitteln, bestimmt [181]. Der „chemische Griff“ des Polymers kann mit zwei wesentlichen Effekten beschrieben werden [182]:

- Wechselwirkungs-Verstärkungs-Effekt

In einem Polymer mit identischen Untereinheiten wird die Wechselwirkung eines Kettensegmentes durch alle weiteren verstärkt. Bestimmend für diesen Effekt ist das Molekulargewicht des Polymers. Polymere können deshalb auf Metalloberflächen zu irreversibler Adsorption neigen, auch wenn die Wechselwirkungen zwischen einem Kettensegment und dem Metall schwach sind.

- Erhöhung der Packungsdichte

Dieser Effekt wird bei Polymeren mit funktionellen Gruppen beobachtet, die eine starke Segment-Metall-Wechselwirkung eingehen. Man beobachtet dichtere Packungen bei gleichzeitiger eingeschränkter Kettenmobilität [182], insbesondere an clusterartigen Metalloberflächen [183].

Tabelle 5: Adsorption von PMMA auf verschiedenen Metallen und von C=O-Gruppen enthaltenden Polymeren auf Gold

Substrat	Polymer MW	Untersuchungsmethodik	Wechselwirkung an der Grenzfläche	Literatur
Cr	PMMA, 250K	XPS, PM-IRRAS	Carboxylatbildung nach Esterspaltung; direkte ionische Bindung (Cr-O-Polymer-Bindung nachgewiesen)	[182, 184]
Cu	PMMA, k. A.	XPS, FT-IRRAS	starke Komplexbildung zwischen Cu und oberflächenorientierter C=O-Bindung	[184, 185, 186]
Ni	PMMA, k. A.	XPS, Adhäsionsmessung	Bildung von Ni-Chelat-Komplexen, beteiligt sind C-O- und C=O-Bindungen des PMMA	[184]
Al ₂ O ₃ Al	PMMA, divers	XPS, FT-IRRAS, NMR, TEM	Hydrolyse der Esterseitenkette, Carboxylat-Bildung, sehr starke ionische Bindung	[148, 151, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193]
Si SiO ₂ Glas	PMMA, divers	ATR, ESR, FT-IR	Adsorption über Wasserstoff-Brückenbindungen mit OH-Oberflächen-Gruppen und Carboxylat-Komplexbindung mit Metallionen im Glas	[147, 149, 153, 194, 195, 196, 197]
Au	PC, EC	XPS, ATR	Charge-Transfer-Wechselwirkung, Au als Elektronen-Donator und C=O als Akzeptor	[198, 199]
Au	BA-Makrozyklen	XPS	Chemische Bindung (Au-O-Polymer-Bindung nachgewiesen)	[200, 201, 202]

Systematische Einflussparameter (Lösemittel, MW, Wassergehalt des Lösemittels und PMMA-Konzentration) auf die Adsorption von stereoregulären PMMA-Ketten auf Gold-Substraten

wurden von SERIZAWA et al. [203] untersucht. Über ATR-Spektroskopie wurde die Charakterisierung der Adsorption für stereokomplexe Moleküle des PMMA zugänglich.

Die Wechselwirkungsarten von PMMA mit Metalloberflächen werden als Van der Waals-, ionische und starke Koordinationsbindungen beschrieben [204, 205]. Der Bindungstyp wird dabei von der Metalloberfläche bestimmt. Während die chemische Natur der Adsorption von PMMA auf den in der Tabelle 5 dargestellten Substraten gut untersucht wurde, wird in der Literatur allgemein von einer schwachen Adhäsion des PMMA auf Gold berichtet [206] und die Nutzung von Promotern angeraten [207, 208]. Quantifiziert wird die Adhäsion der PMMA-Filme mit mechanischen Verfahren, wie dem Klebstreifen-Test [209], Scherspannungs-Lift-Test [185], Biege-Bruch-Verfahren sowie dem 90°-Zug-Test [184].

Aus den FTIR-Imaging-Messungen und der partiellen Ätzung der Goldschicht (s. Kapitel 4.2.2) geht hervor, dass die PMMA-Rückstände am Porenboden nicht als homogene Schicht vorliegen. Die Untersuchung des Porenbodens mittels Atomfeld-Kraft-Mikroskopie (AFM) zeigt eine maximale Höhendifferenz im AFM-Bild von 26,1nm (Abb. 35 links). Eine körnige Oberflächenstruktur ist zu erkennen. Die berechnete mittlere Oberflächenrauigkeit anhand der gewählten Profildarstellung (Abb. 35 rechts) wird mit 16nm angegeben (Berechnung erfolgt von der Messsoftware DualScope(tm)/Rasterscope(tm) SPM [DME-Danish Micro Engineering A/S, Dänemark]). Die berechnete Oberflächenrauigkeit rührt nicht von der Goldschicht her, da eine analog strukturierte Probe auf einem Si-Wafer eine vergleichbare Textur und Oberflächenrauigkeit von 18nm aufweist.

Im Vergleich zum Porenboden weist die Oberfläche im Bereich der Stege eine mittlere Oberflächenrauigkeit von 10-12nm auf und besitzt keine vergleichbare Textur.

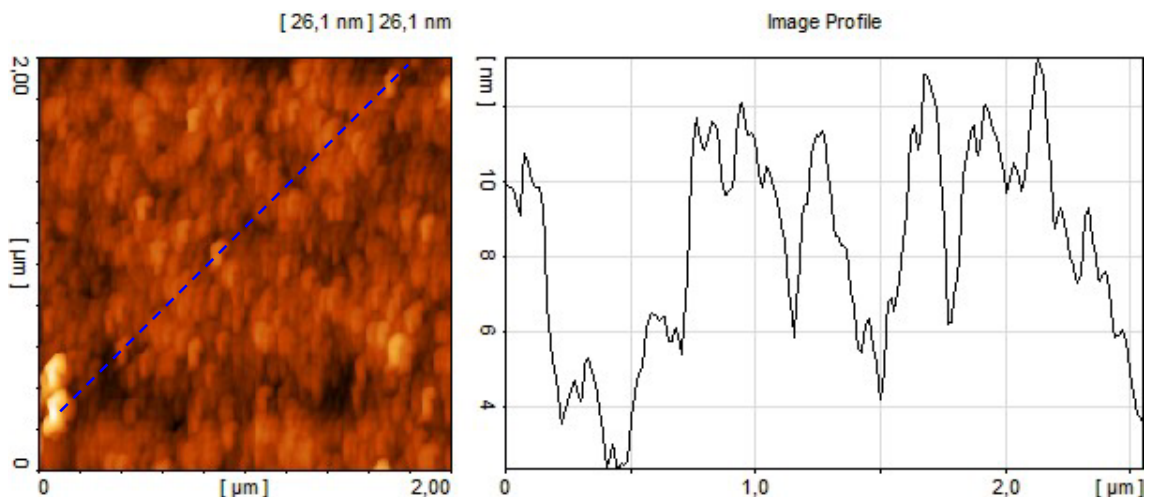


Abb. 35: AFM-Bild und Oberflächenprofil des Porenbodens in einer PMMA-Mikropore.

Aus AFM-Bildern können Aussagen zu den Porenrändern abgeleitet werden (Abb. 36). Sie zeigen bei einem Kippwinkel der Probe von 30° keine vertikalen Überwölbungen bzw. scharfe Kantenabriss. Die Stege sind an der Oberfläche abgerundet, was die Profildarstellung deutlich zeigt. Die UV-Lithographie im Masken-Kontakt-Verfahren erzeugt damit Strukturen, die die gewünschten Poren im PMMA-Film aufweisen. Unerwünschte Defekte, wie sie beispielsweise

bei den soft-lithographischen Verfahren durch Abziehen der Stempelform auftreten, werden am Porenrand der Stege nicht detektiert.

Die Profildarstellung ist zur Charakterisierung des Porenbodens nicht geeignet. Bei der geradlinigen Vertiefung jeweils im zentralen Porenbereich der Poren handelt es sich um einen Messartefakt, nicht um Höhenunterschiede am Porenboden.

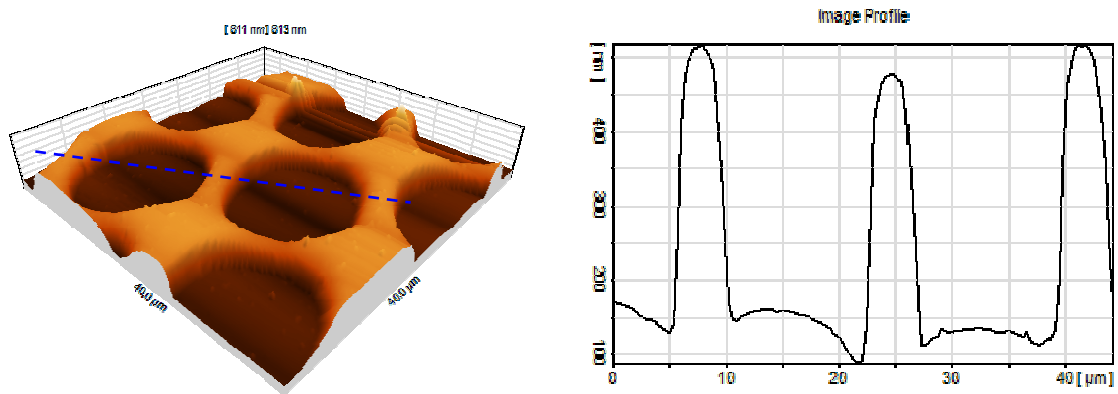


Abb. 36: 3D-AFM-Bild einer PMMA-Mikrostruktur mit 20µm Poren auf einem goldbedampften Glassubstrat und Darstellung des Oberflächenprofils.

Trotz intensiver Nachbehandlung der Mikrostruktur werden die Poren nicht vollständig von der Restschicht befreit. Eine mögliche Ursache für die starken Wechselwirkungen liegt darin: Die Goldoberfläche besitzt Oberflächenplätze mit niedrigerer und hoher Oberflächenenergie. Hierfür verantwortlich sind zum Beispiel Oberflächenrauigkeit, Fehlstellen und Kratzer. Die Desorption an solchen Gitterplätzen ist stark vermindert bzw. kaum möglich [182, 196, 210].

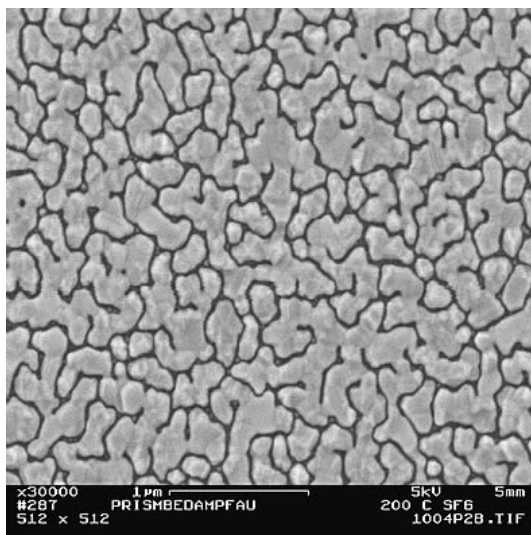


Abb. 37: SEM-Aufnahme (Beschleunigungsspannung 5 kV, Inlensdetektor) einer aufgedampften Gold-Schicht von 50nm (Aufdampfrate: 2,5nm/min, T=40°C).

Die auf das Prisma aufgedampfte Goldschicht zeigt typischerweise clusterartige Struktur (Abb. 37). Eine Anreicherung von Spaltprodukten nach den PMMA-Kettenbrüchen durch die Belichtung erfolgt vorrangig in der Grenzschicht zum Gold [198]. Kleinere Spaltprodukte können in das freie Volumen zwischen den Gold-Clustern eindiffundieren. Die Cluster zeigen außerdem sehr hohe Oberflächenreaktivitäten und damit verstärkte Kopplung zum Polymer [183, 211].

PMMA-Ketten besitzen vor der Adsorption Konformationen, die als zusammengerollt und schlaufig in der Lösung bezeichnet werden [182]. Bei der Adsorption tritt Entknäulung und Verflachen gekoppelt mit Kettenversteifung auf [210]. Ein Umarrangieren der Ketten kann nur

oberhalb der Glasübergangstemperatur des Polymers auftreten. Durch die eingeschränkte Beweglichkeit der Polymerketten weichen die Eigenschaften in der Adsorbatschicht stark von denen im Volumen ab. Polymerketten, die zuerst die Goldoberfläche erreichen, adsorbieren flach mit nahezu allen Segmenten (C=O- und C-O-Bindungen) auf der Goldoberfläche. Alle nachfolgenden Ketten müssen mit der zunehmend beschränkten Anzahl von Adsorptionsplätzen auskommen [182].

Die Eigenschaften des PMMA in der Adsorbatschicht hängen von seiner „Geschichte“ ab [194]. Dazu zählen unter anderem Lösungsmittel, Beschichtungsparameter, Temperprozesse und deren Dauer. So können chemisch homogene Polymere geometrisch inhomogen und quasi im Nicht-Gleichgewichtszustand eingefroren vorliegen. Nach der Belichtung können Bindungen durch Rekombinationsreaktionen zwischen entstandenen Radikalen und der Goldoberfläche entstehen.

Die chemische Veränderung in der Adsorbatschicht lässt sich mittels FTIR-Imaging ermitteln. Die Untersuchung der Mikrostrukturen ergibt Bandenverschiebungen im Spektrum des PMMA innerhalb der Mikroporen im Vergleich zum Spektrum der Stegbereiche [212]. Anhand der C=O-Bande soll auf die veränderten Eigenschaften des PMMA in Substratnähe hingewiesen werden (Abb. 38).

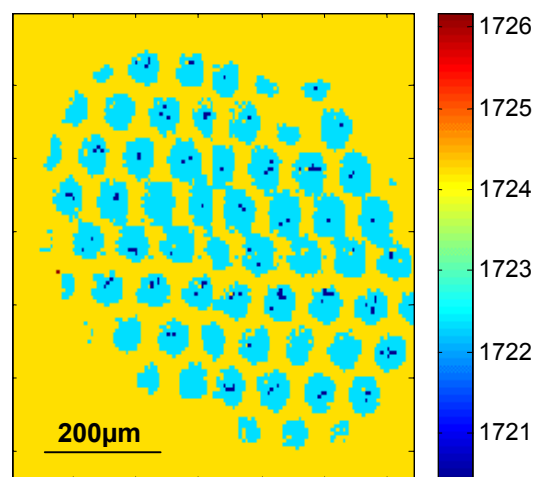


Abb. 38: Darstellung der Lage des Maximums der C=O-Bande einer PMMA-Mikrostruktur im FTIR-Bild nach Clusteranalyse mit 10 Clustern.

Die Lage des Maximums der C=O-Bande verschiebt sich im Bereich der Poren zu kleineren Wellenzahlen. Die Verschiebung beträgt bis zu 3cm^{-1} und wird im Bereich der Poren anhand der Farbverschiebung von Gelb zu Blau deutlich. Interpretiert wird die Bandenverschiebung mit einer Aufweitung des Bindungsabstandes der C=O-Bindung.

Eine Erklärung für die Verschiebung des Bandenmaximums liefern die Esterspaltung des PMMA und das Entweichen von Methanol im belichteten und entwickelten Probenbereich. Die resultierende freie Säure-Gruppe weist ein C=O-Bandenmaximum mit geringerer Wellenzahl als im Ester auf. Allerdings zeigen erst weiterführende Studien an der Restschicht innerhalb der Poren, ob sich chemisch andere Verbindungen aus dem adsorbierten PMMA gebildet haben und welche Molekül-Teile an der Anbindung beteiligt sind. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist der im

PMMA enthaltene Sauerstoff an der Bindung zur Gold-Substratoberfläche beteiligt. Mögliche Konformationen bzw. Bindungsarten zum Substrat zeigt Abb. 39.

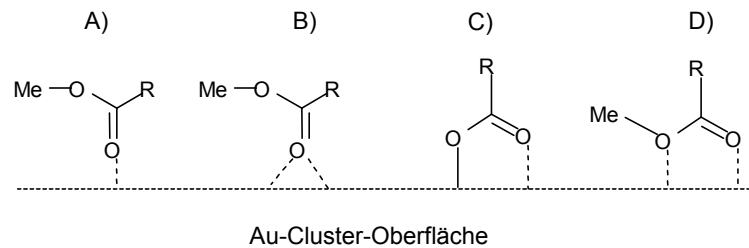


Abb. 39: Mögliche Bindungskonformationen der Estergruppe bei der Adsorption von PMMA auf einer Goldoberfläche [212 und enthaltene Ref.]. Bei A) und B) tritt nur der Carbonylsauerstoff in Wechselwirkung mit der Au-Oberfläche, C) zeigt ionische Bindung der Carboxylatgruppe nach Methanol-Abspaltung D) Wechselwirkung beider Ester-Sauerstoffe mit der Oberfläche ohne Methanolabsplaltung.

4.3.3 Adhäsionsblocker

Die nachträgliche Entfernung der Rückstände in den Poren der Mikrostruktur ist mit den bisher besprochenen Methoden nicht gelungen. Alternativ könnte die feste Anbindung auf der Goldoberfläche unterdrückt werden, indem zwischen Gold- und PMMA-Schicht eine weitere Schicht aufgebracht wird. Diese Schicht wirkt als Blockerschicht für die attraktiven Wechselwirkungen zwischen Gold und PMMA.

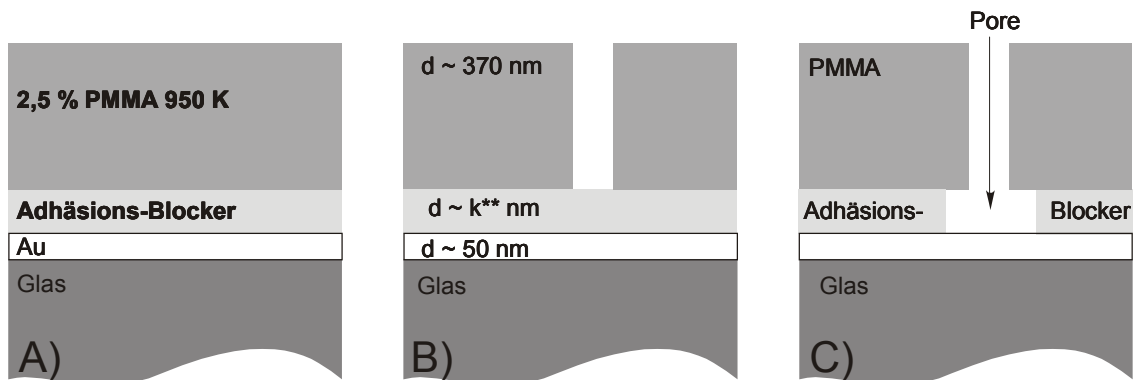


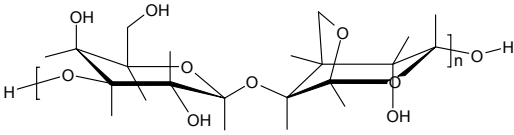
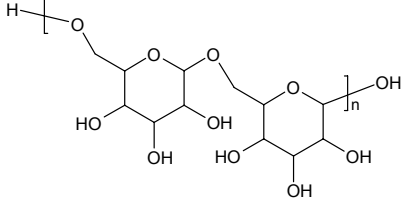
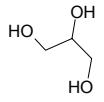
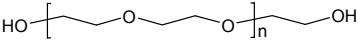
Abb. 40: A) Schicht-System mit Adhäsions-Blocker B) Mikrostrukturierung der PMMA-Schicht; Reflektometrisch bestimmte Schichtdicken (k^{**} ist abhängig von der Blocker-Verbindung). C) Entwicklung der Adhäsionsblockerschicht; Schematisches Resistprofil mit Pore.

Der Adhäsionsblocker wird so ausgewählt, dass er für die Lipidmembran und den Ionenkanal physiologisch unbedenklich ist. Seine hydrophilen Eigenschaften verbessern das Benetzungsverhalten der Mikroporen mit der Ringer-Pufferlösung. Der Adhäsionsblocker muss sich definiert als homogene dünne Schicht auf der Goldoberfläche aufbringen lassen und eine gute Verbindung zum PMMA aufweisen (Abb. 40).

Die Mikrostrukturierung der PMMA-Matrix soll die Adhäsionsblockerschicht in den Poren freilegen, um diese in einem zweiten Entwicklungsschritt herauszulösen. PMMA-Fragmente werden bei der Entwicklung der Adhäsionsblockerschicht entfernt, da sie nicht mehr in Kontakt mit der Goldoberfläche kommen. Die Adhäsionsblockerschicht muss entfernt werden, weil sie

als zusätzliche gequollene Schicht wie eine Diffusionsbarriere für die Analyt-Ionen wirkt. Als Folge träte eine Verminderung der Sensitivität der SPR-Messung ein.

Tabelle 6: Testverbindungen für eine Adhäsionsblockerschicht.

Verbindung	Strukturformel	MW in g/mol
Agarose		100-50.000
Dextran		71.400
Glycerol		92
Polyethylenglykol		400

Die Adhäsionsblockerschicht wird mit den in Tabelle 6 aufgeführten Verbindungen erzeugt. Die Parameter für den Beschichtungsprozess und die reflektometrisch bestimmten Schichtdicken finden sich im Anhang 7.6. Die Schichtdicken der Adhäsionsblockerschichten variieren zwischen den Verbindungen und gelten als Richtwerte der physikalischen Schichtdicke, da sich mit dem Quellgrad der Brechungsindex der Schicht verändert. Die Messwerte stellen den Mittelwert über ein Probenareal von 1mm^2 dar, wobei der Quellgrad örtlich verschieden hoch sein kann.

Nach der Belichtung des Schichtsystems wird in einem ersten Entwicklungsschritt I das fragmentierte PMMA gelöst. Die Polymermatrix entsteht und legt die Adhäsionsblockerschicht im Porenbereich frei. Die Blockerschicht wird in einem zweiten Entwicklungsschritt II entfernt. Durch den zweiten Entwicklungsschritt wird die Goldschicht am Porenboden freigelegt.

Der Porenboden wird mit FTIR-Imaging charakterisiert. Die Zentroid-Spektren im Porenbereich zeigen für die Verbindungen, die als Blocker verwendet werden, im Bereich der Valenzschwingung $\nu(\text{OH})$ bei 3000cm^{-1} bis 3300cm^{-1} eine breite flache Absorptionsbande, die nicht quantitativ erfasst werden kann. Für das Polyethylenglykol zeigt sich bei etwa 1110cm^{-1} eine schmale, starke Bande der C-O-C Schwingung, die sich mit der des PMMA überlagert. Die quantitative Auswertung der FTIR-Imaging Messungen beschränkt sich deshalb auf die Charakterisierung der C=O-Bande, die eine Verminderung der optischen PMMA-Schichtdicke innerhalb der Poren anzeigt.

Polyethylenglykol (PEG). Es wird eine homogene Schichtausbildung des PMMA auf dem erzeugten PEG-Film beobachtet. Aus der mikroskopischen Aufnahme in Abb. 41 ist zu erkennen, dass sich die PMMA-Schicht auf der PEG-Schicht mikrostrukturieren lässt, allerdings Filmspannungen in der PMMA-Schicht während der Entwicklung I zum Zerreißen führen.

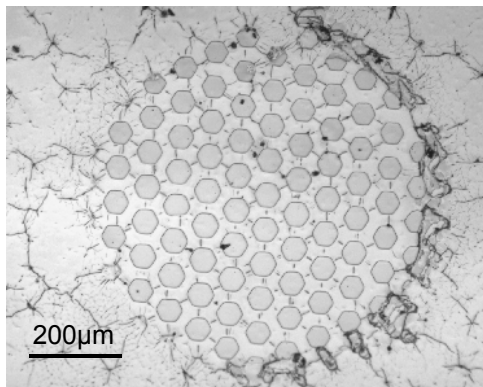


Abb. 41: Auflichtmikroskopische Aufnahme der PMMA-Matrix (Hexagons mit Strukturbreiten von 40 µm) nach den Entwicklungen I und II unter Verwendung von PEG als Adhäsionsblocker.

Während des Entwicklungsprozesses I wird die PMMA-Matrix unterspült. Die nichtbelichteten Bereiche der Probe zeigen ebenfalls Rissbildung und Aufwerfungen. Daraus ist zu schließen, dass PMMA bereits auf der Blockerschicht nur ungenügende Adhäsion zeigt. In den FTIR-Daten zeigt sich die Wirkung des PEG deutlich (Abb.

43). Innerhalb der Poren wird kaum noch die C=O-Bande nachgewiesen. Der minimale E_R -Wert der Zentroid-Spektren im Bereich der Poren bezogen auf den E_R -Wert der Stege beträgt 10,9%. PEG blockt damit die anziehende Wechselwirkung zwischen Gold und PMMA, ist allerdings als Blockerschicht nicht geeignet, da die Rissbildung im Bereich der PMMA-Matrix zu Poren führt, die nicht mehr dicht das Porenvolumen abschließen.

Dextran. Dextran bildet auf dem Goldsubstrat homogene Schichten. Die feuchten Schichten werden für 2h bei 100°C getempert, bevor die PMMA-Schicht aufgebracht wird. Belichtung und Entwicklung I führen zur Mikrostruktur in der PMMA-Schicht. Im Entwicklungsschritt II löst sich die PMMA-Schicht vom Substrat. Auch die partielle Zerstörung der Goldschicht wird beobachtet. Veränderung der Entwicklerzeit II kann die PMMA-Schichtzerstörung nicht verhindern. Ohne den Entwicklungsschritt II kann kein zusätzliches Verringern der optischen Schichtdicke zu Poren ohne Blockerschicht beobachtet werden. Somit ist Dextran als Blockerschicht ungeeignet und in Abb. 43 nicht dargestellt.

Glycerol. Reflektometrisch messbare Schichten lassen sich auf der Goldoberfläche nicht erzeugen. Nach Abschleudern des Glycerol-Überstandes ist die Goldoberfläche mit Glycerol benetzt und die Räume zwischen den Goldclustern (Breite: 1-2nm) sind ausgefüllt. Anschließend wird mit PMMA 950K eine Schichtdicke von 300nm erzeugt. Die PMMA-Schicht wird nach der Belichtung im Entwicklungsschritt I entwickelt. Glycerol weist im Entwickler I Löslichkeit auf. Es wird bereits im ersten Entwicklungsschritt I vom Porenboden gelöst. Die Entwicklung II mit Reinstwasser zeigt keinen negativen Einfluss auf die Filmstabilität der Polymermatrix. Wie sich der C=O-Gehalt in den Poren durch beide Entwicklungsschritte I und II ändert, ist in Abb. 43 dargestellt. Der Verlust der optischen Schichtdicke liegt bei rund 3% im Vergleich zu Poren, die ohne Adhäsionsblockerschicht erzeugt werden.

Es lässt sich feststellen, dass durch die Verwendung von Glycerol als Adhäsionsblocker mit dem Entwicklungsschritt II zusätzliches PMMA aus den Poren entfernt werden kann. Es verbleiben allerdings weiterhin Reste in den Poren. Dies wird damit begründet, dass das Glycerol zwar die Zwischenräume der Goldcluster füllt, aber die Anbindung des PMMA auf der Oberseite der Cluster nicht verhindern kann. Auf Grund der Löslichkeit des Glycerols im Entwickler I könnten die PMMA-Fragmente während der Entwicklung der Matrix doch in Wechselwirkung mit der Goldoberfläche treten.

Agarose löst sich in heißem Wasser. 1% (w/V) Agarose-Lösung bildet im Spin-coating-Prozess homogene, gelartige Filme auf der Goldschicht aus. Durch Tempern bei 120°C wird den

Schichten ein großer Teil Wassers entzogen. Das anschließende Aufschleudern der PMMA-Lösung führt zu einem gut haftenden Schichtsystem. Nach Belichtung und Entwicklung I erfolgt Entwicklung II für 3h in Reinstwasser bei 100°C.

Während der Belichtung mit UV-Strahlen kann es zu Fragmentierungsprozessen der Agarose-Ketten kommen. Das UV-Spektrum im Wellenlängenbereich von 200nm bis 270nm zeigt eine schwache Absorption. Allerdings wird die Agaroseschicht nur geringen Belichtungs Dosen ausgesetzt, da die darüber liegende PMMA-Schicht einen hohen Anteil der Energie absorbiert.

Die SEM-Aufnahmen (Abb. 42) der Mikrostrukturen nach beiden Entwicklungsschritten I und II zeigen, dass die Porenränder Abrisse aufweisen. Nach der Entwicklung I bleibt noch Material in den Poren zurück. Der Porenboden erscheint inhomogen und mit geringem Materialkontrast zu den PMMA-Stege. Nach der Entwicklung II ist eine Steigerung des Kontrastes zu beobachten. Im Bereich der Poren werden mehr Elektronen zurückgestreut, d.h. hier liegt kaum Restmaterial auf der Goldschicht. Nicht alle Poren im Array sind vollständig entwickelt. Die hohe laterale Auflösung der SEM-Bilder zeigt einen inhomogenen Übergangsbereich zwischen den Stegen und dem Porenboden. Dies erklärt, warum im FTIR-Bild im Zentroid-Spektrum des Porenbereiches rund 10% an optischer Restschichtdicke im Vergleich zur Schichtdicke der Stege nachzuweisen sind.

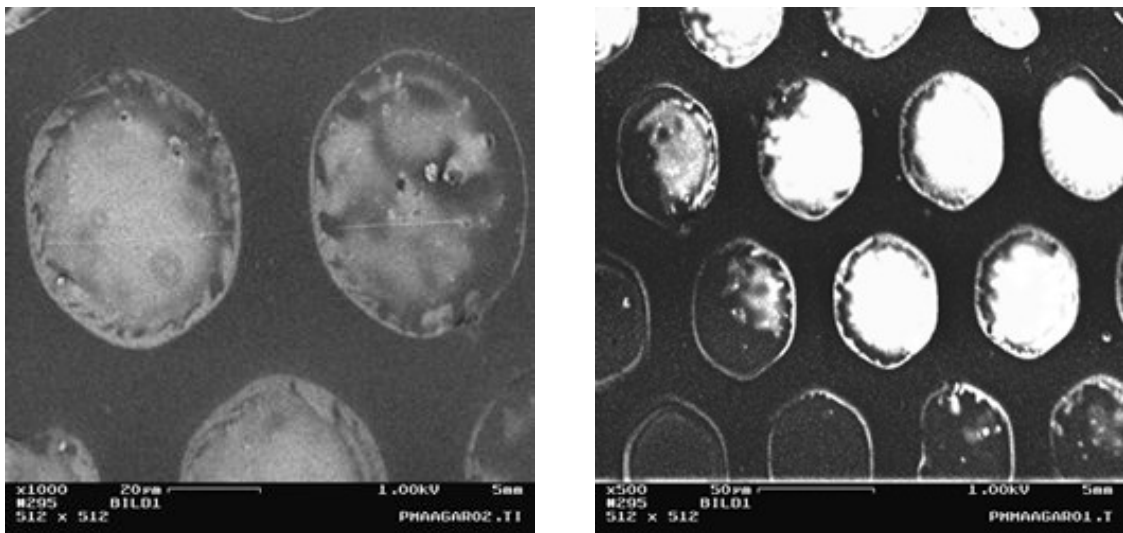


Abb. 42: SEM-Aufnahmen der Mikrostrukturen unter Verwendung von Agarose als Adhäsionsblocker (Links) 1000fache Vergrößerung nach Entwicklung I; (Rechts) 500fache Vergrößerung nach Entwicklung II.

Wie in Abb. 43 dargestellt, wird während der Entwicklung II noch mehr als 50% der in den Poren der Mikrostrukturen verbliebenen optischen Schichtdicke mit Agarose als Adhäsionsblockerschicht entfernt. Die auf die Stege der Polymermatrix bezogene Menge an C=O-Bindungen beträgt insgesamt rund 10%. Die PMMA-Schicht wird während der Entwicklungen I und II nicht beschädigt oder vom Substrat abgehoben. Damit wurden aus den Poren restliches PMMA bzw. seine Fragmente effektiv herausgelöst.

Beim Vergleich der eingesetzten Verbindungen und der in den Poren verbleibenden optischen Schichtdicken gilt der relative Anteil, bezüglich der Restschichtdicke in den Poren mit und ohne

Blockerschicht, als Maß für die Eignung als Adhäsionsblocker-Verbindung zwischen der Goldoberfläche und den PMMA-Ketten.

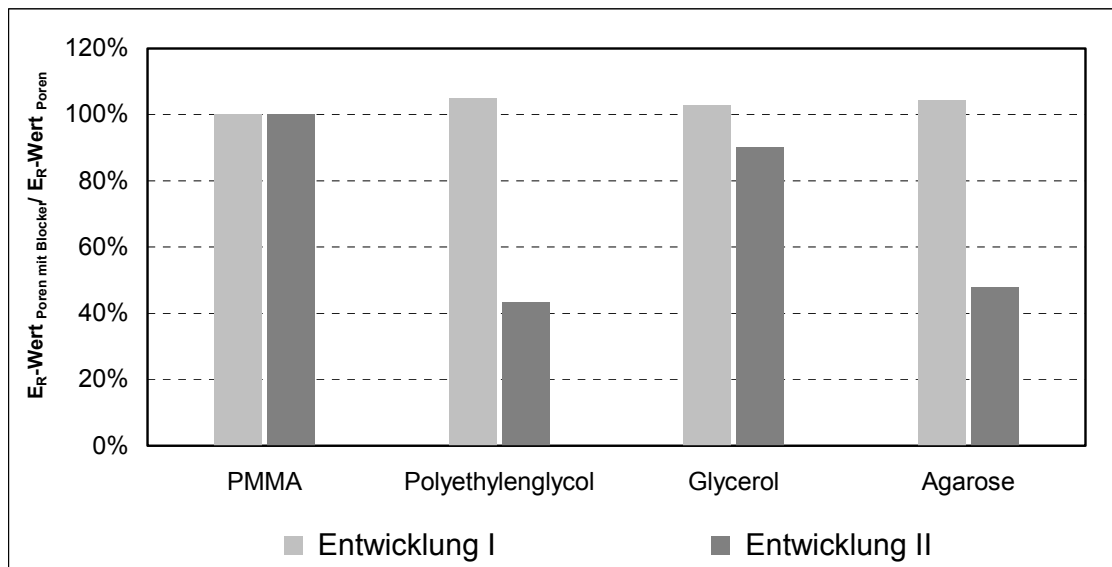


Abb. 43: E_R -Werte der Zentroid-Spektren im Bereich 1680 cm^{-1} bis 1760 cm^{-1} des Porenbereichs bezogen auf den E_R -Wert der Probe ohne Adhäsionsblockerschicht. Vergleich der optischen Schichtdicken nach Entwicklung I des PMMA-Films und nach der Entwicklung II der Blockerschicht.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Verwendung von Adhäsionsblockerschichten zeigt:

- ▷ Bei der Auswahl geeigneter Adhäsionsblocker ist es wichtig, dass sie sich nach der PMMA-Entwicklung kontrolliert entfernen lassen.
- ▷ Im gesamten Entwicklungsprozess eignet sich Agarose als Adhäsionsblockerschicht, da die optische Restschichtdicke in den Poren auf 10% im Vergleich zur Schichtdicke der Stege abgesenkt wird.
- ▷ Bei der Verwendung von PEG tritt ebenfalls eine Verminderung der optischen Restschicht in den Poren auf. Die Defektbildung in der PMMA-Matrix verbietet jedoch seinen Einsatz als Adhäsionsblocker.

4.3.4 Kontraststeigerung im SPR-Bild

Die Histogramme der Intensitätsverteilung in den SPR-Bildern der Polymermatrix gestatten es, eine Aussage zu treffen, ob die Mikrostruktur für eine empfindliche Detektion im Ionenkanal-sensor-Array geeignet ist.

Zur Aufnahme der SPR-Bilder ist der Resonanzwinkel auf maximalen Kontrast zwischen den wassergefüllten Poren und den Stegen im PMMA eingestellt. Die Bilder bestehen aus rund 2000 Pixeln im Wertebereich von 0 (schwarz) bis 256 (weiß). Pixel mit geringer Intensität weisen auf wenig bis kein Restmaterial hin und helle Pixel-Bereiche zeigen die optischen Eigenschaften der PMMA-Stege bzw. vom Restmaterial in den Poren.

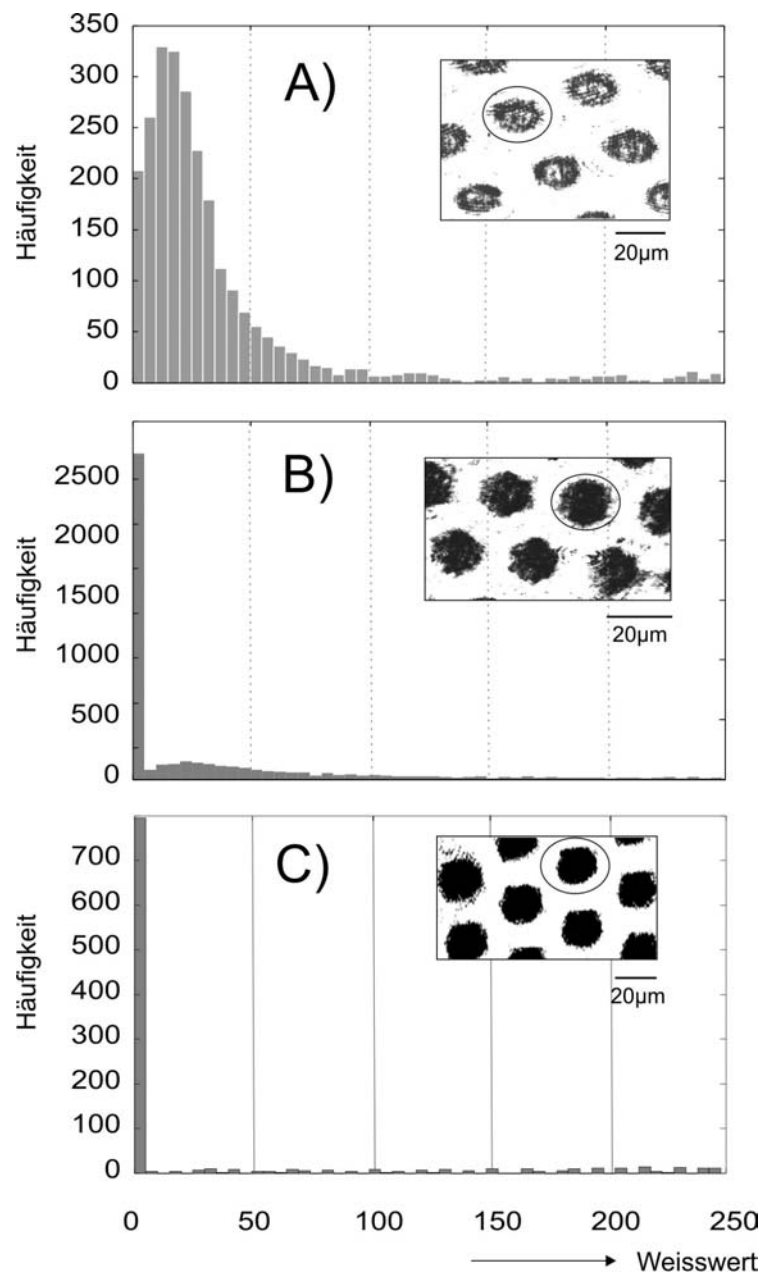


Abb. 44: SPR-Bilder und Verteilung der Weisswerte im Bereich hexagonaler Poren von PMMA-Matrizes. A) Matrix unter Standardbedingungen entwickelt (Entwickler 1:3 MIBK:ISO, 30s); B) Matrix unter optimierter Belichtung und Entwicklung (Entwickler 1:1 MIBK:ISO, 10min) C) Matrix mit Adhäsionsblocker (Agarose, Entwickler 1:1 MIBK:ISO, 3min und Wasser).

In Abb. 44 erfolgt die Charakterisierung dreier Mikrostrukturen in verschiedenen präparierten Polymermatrizes: A) PMMA-Matrix, deren Poren durch eine Standardbelichtung und Entwicklung erzeugt werden, B) PMMA-Matrix nach der Optimierung des Strukturierungsprozesse und C) PMMA-Matrix mit Agarose als Adhäsionsblockerschicht, die im Entwicklungsschritt II entfernt wird.

Innerhalb der einzelnen Poren der Mikrostruktur im jeweiligen SPR-Bild sind Intensitätsunterschiede in der Verteilung der Restschicht erkennbar. Sie beruhen auf Unterschieden in der Restschichtdicke bzw. der optischen Dichte am Porenboden. Auch zwischen verschiedenen Poren wird keine homogene Verteilung der Intensitäten beobachtet. Die Verteilung der Weisswerte im SPR-Bild der Poren kann damit nicht über das gesamte Sensor-Array betrachtet werden, son-

dem muss einzeln für jede Pore analysiert werden. Die Verteilung der Weisswerte wird beispielhaft für jeweils eine gekennzeichnete Pore analysiert. Dabei wird jeweils die Häufigkeit fünf akkumulierter Weisswerte und deren Verteilung aufgetragen.

- Breite Weisswertverteilung im Porenbereich:

Der Grenzfall einer Weisswertverteilung mit gleicher Häufigkeit weist auf unvollständig entwickelte Poren hin. Die Sensitivität, obwohl eine deutliche Verschiebung zu geringen Weisswerten in Abb. 44A beobachtet wird, reicht für die Detektion im Sensor-Array nicht aus. Im SPR-Bild der Probe zeigen sich inhomogene Porenböden mit hohem Anteil an hellen Pixeln.

- Weisswertverteilung ist zu niedrigen Werten verschoben:

Die Restschicht ist nicht über den gesamten Porenboden verteilt, sondern durch wenige Inhomogenitäten gekennzeichnet. Das SPR-Bild zeigt, ob entweder Staub- und Schmutzpartikel verantwortlich sind oder eine unvollständige Kantenentwicklung an der Porenwand auftritt. Eine ähnliche Weisswertverteilung ergibt sich für einen vollständig entwickelten Porenboden mit unregelmäßig zerklüfteter Porenwand (Abb. 44B). Diese Form der Poren resultiert hauptsächlich aus einer Überentwicklung. Hieraus ergibt sich, dass die Form der Poren nicht als zylinderförmig angenommen werden kann, sondern eine Korrektur des Porenvolumens notwendig ist.

- Schmale Verteilung im Bereich niedriger Weisswerte:

Die Pore wird als gut geeignet für die SPR-Detektion im Ionenkanalsensor-Array eingestuft (Abb. 44 C). Je schmaler die Verteilung, desto erfolgreicher war der Strukturierungsprozess und desto mehr nähert sich die Porenwand einer senkrechten Position auf dem Porenboden. Das SPR-Bild zeigt einen sehr hohen Kontrast mit gut abgegrenzten Poren.

In Bezug auf die Optimierung des Strukturierungsverfahren lässt sich folgendes Ergebnis zusammenfassen: Selbst eine drastische Verlängerung von Belichtungs-, Entwicklungszeit um den Faktor 20 und eine Verstärkung der Lösekraft des Entwicklers hinterlassen in den Poren eine mit SPR-Imaging detektierbare Restschicht (Abb. 44A) und B). Wird dagegen eine Adhäsionsblockerschicht unter der PMMA-Schicht aufgebracht, resultiert eine Kontraststeigerung im SPR-Bild (Abb. 44C). Ein Vergleich der verschiedenen Adhäsionsblockerverbindungen mittels SPR-Imaging führt zur Auswahl der geeignetsten Blockerschicht. Die Bewertung der Poren erfolgt wiederum aus der Verteilung der Weisswerte im Histogramm des Porenausschnittes.

Die SPR-Bilder von hexagonalen Poren nach dem Herauslösen der Adhäsionsblockerschicht sind in Abb. 45 dargestellt. Die Histogramme der Poren in A), B) und C) besitzen eine schmale Intensitätsverteilung im unteren Weisswertbereich und zeigen damit eine hohe Qualität an. Für die adhäsionsgeblockten Poren wird deshalb eine höhere Sensitivität erwartet als bei Poren mit optimiertem Belichtungs- und Entwicklungsprozess.

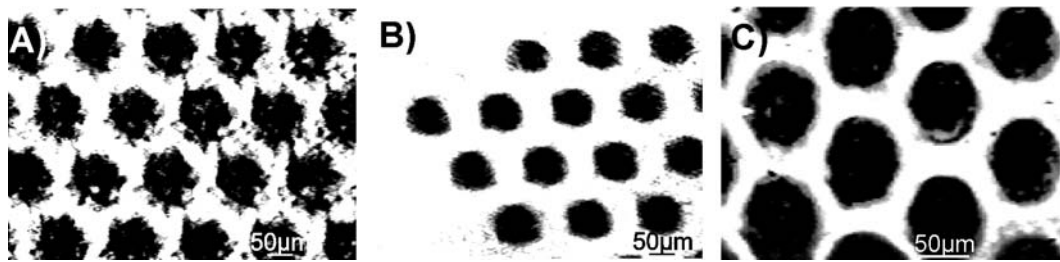


Abb. 45: SPR-Bilder von PMMA-Matrizes unter dem Einsatz verschiedener Adhäsionsblocker A) PEG, B) Glycerol und C) Agarose.

Beim Einsatz von PEG als Adhäsionsblocker (Abb. 45A) besitzen die Poren gut entwickelte Bereiche mit wenig Restmaterial. Durch die hohe laterale Auflösung im SPR-Imaging wird jetzt sichtbar, dass die Porenwände teilweise aufreißen. Es treten Verbindungskanäle zwischen verschiedenen Poren auf. Ein dichtes Abschließen der Poren wird durch die PMMA-Stege nicht mehr gewährleistet.

Die Mikrostrukturierungen unter dem Einsatz der Adhäsionsblocker Glycerol (Abb. 45B) und Agarose (Abb. 45C) zeigen in den SPR-Bildern einen höheren Kontrast. Die Weisswertverteilungen der Pixelintensitäten ist zu niedrigeren Werten verschoben als für PEG-geblockte Poren, was die Ergebnisse der FTIR-Imaging-Messungen bestätigt. Es lässt sich weiterhin aus der vergrößerten Abb. 45C) erkennen, dass der Porenboden gleichmäßig entwickelt vorliegt. Auch die Porenwände bleiben stabil und schließen die zylindrische Pore dicht zur Goldschicht hin ab. Es sind vereinzelte Unregelmäßigkeiten im Porenrandbereich sichtbar. Im Vergleich zu Poren, die mit Glycerol geblockt wurden, ist der Randbereich insgesamt für Agarose-geblockte Poren homogener. Da die Entwicklung der Blockerschicht von Agarose zu einem starken Materialabtrag führt (Abb. 43), kann die Optimierung der Blockerschichtentwicklung hinsichtlich der Unterdrückung von Defekt- und Rissbildungen in der Porenwand durchgeführt werden. Neben der schonenderen Entfernung kann auch eine Optimierung der Blockerschichtdicke den gewünschten Effekt erzielen.

Ist die Reproduzierbarkeit des Mikrostrukturierungsverfahrens hoch, kann zur Bewertung das Histogramm der Intensitätsverteilung der Pixel im Bereich aller Poren herangezogen werden. Die Entwicklung eines automatisierten Bewertungsverfahrens kann zukünftig durch Schwellwerte bestimmt werden. Sie ergeben sich aus der gewünschten Sensitivität der Metallionen-Detektion und der Häufigkeitsverteilung der Restschichtintensitäten im Histogramm der Poren. Die Poren des Ionenkanalsensor-Arrays werden nach der Bewertung zur Detektion zugelassen, mit einem Korrekturfaktor versehen und zugelassen bzw. von der Messung ausgeschlossen.

4.3.5 Verkleinerung der Mikrostrukturen

Der Prozess der beschriebenen Mikrostrukturierung muss für Strukturbreiten kleiner $10\mu\text{m}$ sowohl bezüglich der Belichtungs- als auch der Entwicklungsparameter erneut optimiert werden.

Um Mikrostrukturen zu erhalten, die kleinere Strukturgrößen aufweisen als die minimale Maschenweite der kommerziell erhältlichen TEM-Netze (Maschenanzahl/Netz: 2000 mit quadratischen Strukturbreiten von $5\mu\text{m}$), werden Belichtungsparameter gewählt, die im Bereich einer Unterbelichtung der PMMA-Filme liegen. Die Parameter zur Belichtung und Entwicklung sind im Anhang 7.2 beschrieben. Die Belichtungszeit kann unter der Bedingung, dass möglichst vollständig entwickelte Poren mit Agarose als Adhäsionsblocker erhalten werden, nicht uneingeschränkt verringert werden. Vielmehr zeigt sich eine untere Grenze von $3\mu\text{m}$ Porendurchmesser. Das SPR-Bild und das Histogramm der gekennzeichneten Pore stellt Abb. 46 dar.

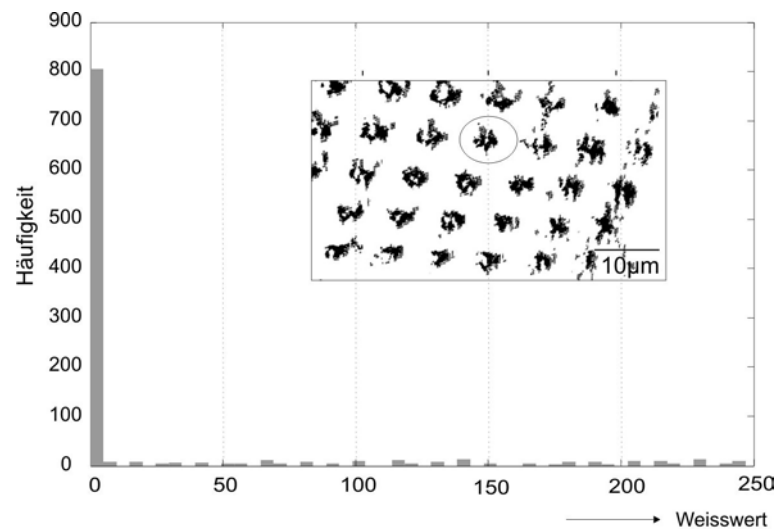


Abb. 46: SPR-Bild einer Mikrostruktur mit einem Porendurchmesser von $3\mu\text{m}$ und Histogramm zur Häufigkeitsverteilung der Grauwerte (Zuordnung 0=schwarz und 255=weiss) der markierten Pore.

Der hohe Kontrast im SPR-Bild zeigt, dass die Poren im Ionenkanalsensor-Array prinzipiell einsetzbar sind. Die Poren weisen eine unregelmäßige Randschicht auf. In der Histogramm-Darstellung der gekennzeichneten Pore des SPR-Bildes sind jeweils 5 Weisswerte zu einer Häufigkeit akkumuliert. Es lässt sich erkennen, dass nach der Analyse der Häufigkeitsverteilung von Poren mit geringer Restschichtdicke ausgegangen werden kann. Die breite Verteilung höherer Weisswerte ergibt sich aus der unregelmäßigen Form des Porenrandes, deren Summe, absolut betrachtet, sehr gering ist.

Die Verkleinerung der Poren in der PMMA-Matrix ist mit einer Zunahme der Unregelmäßigkeiten in der Porenform verbunden. Der minimale erreichbare Porendurchmesser beträgt im Mittel $3\mu\text{m}$, um für das Sensor-Array geeignete Mikroporen zu erzeugen. Aus dem Vergleich der SPR-Messung mit der AFM-Analyse kann für Strukturbreiten von $3\mu\text{m}$ die Notwendigkeit abgeleitet werden, dass das Volumen der Poren zu korrigieren ist. Die Zerklüftung des Randbereiches resultiert möglicherweise daraus, dass die verwendete Agarose-Adhäsionsblockerschicht zu schnell abgetragen wird. Im Gegensatz zu größeren Porendurchmessern treten für die kleinen

Strukturbreiten bei der Entfernung der Blockerschicht Spannungen in der PMMA-Schicht auf und führen zur Defektbildung und Zerstörung. Damit ist eine Korrektur des um die Defektvolumina vergrößerten Porenvolumens notwendig, insbesondere, weil die Verkleinerung der Mikrostrukturen das Verhältnis aus Porenvolumen und Porenoberfläche stark verschiebt.

Die Korrektur des Volumenfehlers, welcher aus der zerklüfteten Porenwand herrührt, erfordert die Kenntnis der Art der Zerklüftungen und deren Verlauf in der Porenwand. Zur Untersuchung der Wandtopologie wird die Mikrostruktur im kontaktlosen Modus mittels AFM betrachtet. In der graphischen Aufbereitung der Messergebnisse wird die z-Achse 8-fach überhöht dargestellt. Die hohe laterale Auflösung der AFM erlaubt eine Charakterisierung der Zerklüftungen von der Oberseite des Sensor-Arrays.

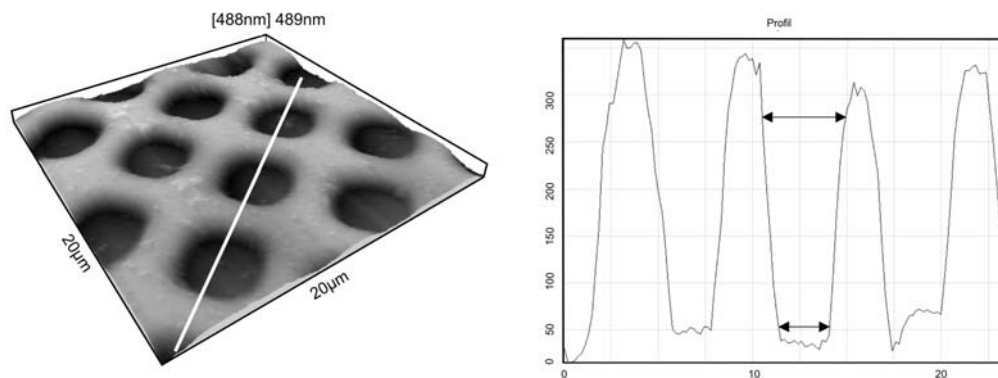


Abb. 47: AFM-Aufnahme einer $3\mu\text{m}$ Porenstruktur und Profilschnitt entlang der Linie. Mit mittleren Porendurchmessern am Porenboden von $2,4\mu\text{m} \pm 0,4\mu\text{m}$ bzw. an der Sensor-Oberfläche von $4,1\mu\text{m} \pm 0,8\mu\text{m}$.

Das AFM-Bild (Abb. 47) zeigt die Polymermatrix mit minimalen Porenbreiten von $3\mu\text{m}$. Die Bewertung des Profilschnittes zeigt nichtzylindrische, aber wenig zerklüftete Porenform. Der Profilschnitt entlang der eingezeichneten Linie gibt Unterschiede in der Wandform der Poren wieder. Die Poren sind konisch aufgeweitet. Die Vermessung der Porenprofile ergibt für die Aufweitung des Porendurchmessers zwischen Porenboden und PMMA-Oberfläche ein Verhältnis von durchschnittlich 1,7. Die im SPR-Bild sichtbare Kantenrauigkeit und Zerklüftung der Porenwände kann durch das AFM-Bild nicht bestätigt werden. Die Oberflächenrauigkeit auf den PMMA-Stegen wird auf Staubpartikel zurückgeführt, da die Charakterisierung der Probe mit AFM nicht direkt im Anschluss an die Mikrostrukturierung erfolgen konnte. Die Unregelmäßigkeiten im SPR-Bild sind nach der Charakterisierung mit AFM nicht mehr in der Porenwand des PMMA zu suchen, sondern befinden sich vermutlich in der Adhäsionsblockerschicht. Diese Schicht liegt unter der PMMA-Schicht und ist für das AFM nicht sichtbar. Die mit beiden Methoden erzielten unterschiedlichen Ergebnisse könnten auch darin begründet liegen, dass das SPR-Bild nicht nur einen Materialkontrast abbildet, sondern auch Unterschiede in der optischen Dichte. Dieser Dichtegradient wird im AFM nicht dargestellt.

Zusammenfassend ist eine Korrektur des Porenvolumens durch die konisch aufgeweitete Porenform ohne die Berücksichtigung von Defektvolumina der Wand notwendig. Grundsätzlich hängt der Volumenkorrekturfaktor weiterhin von der Menge der Rückstände und deren Verteilung in der Pore, als auch vom Defektvolumen der Wandzerklüftungen ab.

Eine weitere Verkleinerung der Porendurchmesser unter den genannten Prozessbedingungen verläuft unter Verminderung des SPR-Kontrastes.

Die Untersuchungsergebnisse zu den drei eingesetzten mikrolithographischen Techniken für das spezielle System Glas – Gold – PMMA lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- ▷ Bei den getesteten lithographischen Verfahren (EBL, IBL und UVL) bleiben Rückstände in den belichteten Porenbereichen zurück. Wechselwirkung während der Belichtung zwischen hochenergetischer Strahlung und der Goldschicht kann bei der IBL zur Zerstörung der Metallschicht führen.
- ▷ Für lithographische Verfahren, bei denen die gesamte Goldschicht mit PMMA belegt und anschließend partiell freigelegt wird, muss ein hoher Optimierungsaufwand in die Reduktion der verbleibenden Restschichtdicke investiert werden, um mit SPR-Imaging die Mikrostrukturen detektieren zu können.
- ▷ Eine für das Sensor-Array geeignete Polymermatrix mit Poren, deren optische Restschicht weiter vermindert ist, werden bei der Verwendung einer Adhäsionsblockerschicht aus Agarose und deren nachträglicher Entfernung im Porenbereich erhalten.
- ▷ Mit UVL lassen sich minimale Porendurchmesser von $3\mu\text{m}$ erzeugen und im SPR-Imaging abbilden.

Zukünftig kann untersucht werden, ob lithographische Techniken, bei denen die Porenbereiche nicht in Kontakt mit dem Polymer kommen, zu besseren SPR-Kontrasten führen. Insbesondere Druck-Techniken, auch gekoppelt mit Grafting-from-Methoden stellen vielversprechende Kandidaten dar.

4.4 Verbesserung der Sensitivität der Mikroporen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass ein Ionenkanalsensor-Array mittels optischer Detektion realisierbar ist. Die Grenzfläche zwischen metallischer Transduceroberfläche und freigelegter Pore bestimmt entscheidend die Funktion des Sensor-Arrays. Durch verbleibende Reste von Polymer auf dem Porengrund werden von der Plasmonenwelle deutlich weniger Ionen erfasst als in einer völlig freien Pore. Um dennoch eine hohe Sensitivität zu erzielen, müssen möglichst viele Ionen an die Gebiete der freiliegenden Metalloberfläche herangeführt werden. Eine selektive Bindung von Ionen an der Metalloberfläche kann daher zu einer Verbesserung der Sensitivität führen.

4.4.1 Selektive Bindung von Metallionen

Es existieren verschiedene Konzepte zur selektiven Bindung von Metallionen:

Eine Adsorption von Metallionen kann mit schwach sauren Polymeren erfolgen [213, 214]. Sie lagern die Ionen über elektrostatische Wechselwirkung in Abhängigkeit der Ionenkonzentration in der Lösung in ihre vernetzten, gequollenen Strukturen ein und verändern damit ihr Quellverhalten, aber auch ihren Brechungsindex. Von Nachteil ist, dass die Polymere kaum homogenes, reproduzierbares Adsorptionsverhalten zeigen. Die Komplexität des Ionenkanalsensor-Arrays

wird nun durch weitere Prozesse, wie den Ionentransport im Polymer, der Verankerung des Polymers mit der Goldschicht, dem Quellverhalten und der Quellzeit, stark erhöht.

Eine andere Strategie zur selektiven Kationbindung aus der Lösung der Mikroporen besteht in der Nutzung oberflächenverankerter Donor-Akzeptor-Moleküle. Als Chelatbildner für Alkali- und Erdalkali-Ionen sind selektive Calixarene [215], aber auch Kryptanden [216] oder Kronenether [217] bekannt. Werden die Chelatbildner auf der Goldoberfläche als SA-Monoschicht angebunden, kann eine Änderung der optischen Eigenschaften sowohl der SA-Schicht als auch des wässrigen Porenvolumens detektiert werden. Da thiofunktionalisierte SA-Schichten geordnet auf Goldoberflächen anbinden, wird auf eine homogene Verteilung der funktionellen Zentren geschlossen [218, 219].

Die Modifizierung der Sensor-Arrayoberfläche zur Erhöhung der Sensitivität erfolgt durch die Einführung eines SA-gebundenen Chelatbildners.

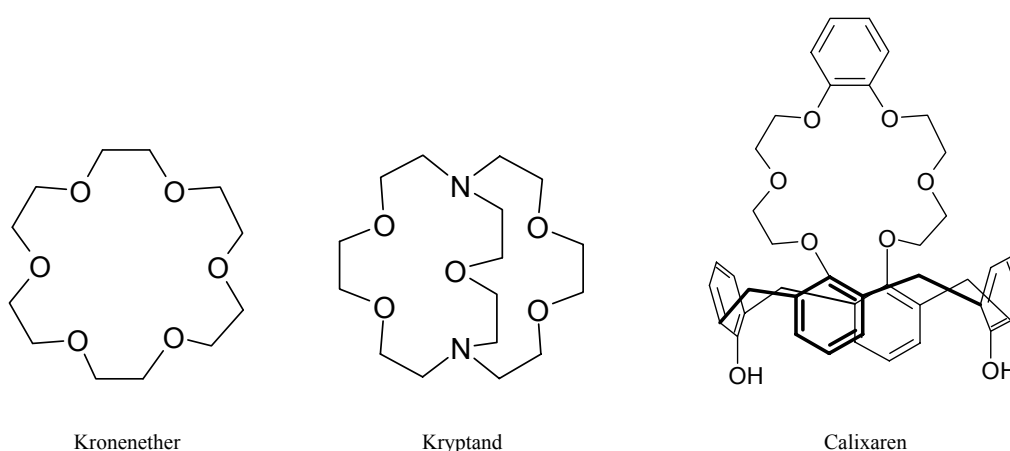


Abb. 48: Chelatbildner, die sich zur Komplexierung von Alkali- und Erdalkali-Ionen eignen. Das Ion wird im Ring der Liganden mehrfach durch Sauerstoff bzw. Stickstoff komplexiert.

In Abb. 48 sind drei Beispiele verschiedener Chelatbildner dargestellt. Es können sich stabile Komplexe mit den Metallionen ausbilden, da mehrere Bindungsstellen pro Molekül vorhanden sind. Die Selektivität der Komplexbildung für eine bestimmte Ionenart ist in der Reihenfolge: Kronenether < Kryptand << Calixaren erhöht. Mit einem maßgeschneiderten Ring kann eine Größenselektion vorgenommen werden.

Unter den genannten Chelatbildnern wird der Kronenether als Modellsubstanz ausgewählt, um zu zeigen, dass durch eine SA-Schicht die Nachweisgrenze der optischen Detektion verringert werden kann. Mit Hilfe der Ringgröße der Krone kann die Selektivität bezüglich des zu komplexierenden Metallions eingestellt werden. Wird das chelatbildende Molekül mit einer thiofunktionalisierten Seitenkette synthetisiert, kann es direkt auf der Goldoberfläche im Bereich der Poren über den SA-Prozess angebunden werden. Je kürzer die Seitenkette ist, desto näher an der Goldoberfläche findet eine mögliche Komplexbildung statt und desto größer ist der zu erwartende Einfluss auf den SPR-Kontrast.

Ein Kronenether mit zwei Mercapto-Seitenketten wurde als Enzymmodell verwendet, um Peptide zu synthetisieren [220]. Der Kronenethermolekülteil dient bei diesen Verbindungen zur Substraterkennung und die Mercapto-Gruppen dienen als Katalysator. Weitere wichtige An-

wendungen finden die Mercapto-Kronenether in der Flüssigextraktion, insbesondere von Ag^+ -Ionen [221], aber auch von Alkali- und Erdalkali-Ionen [222, 223].

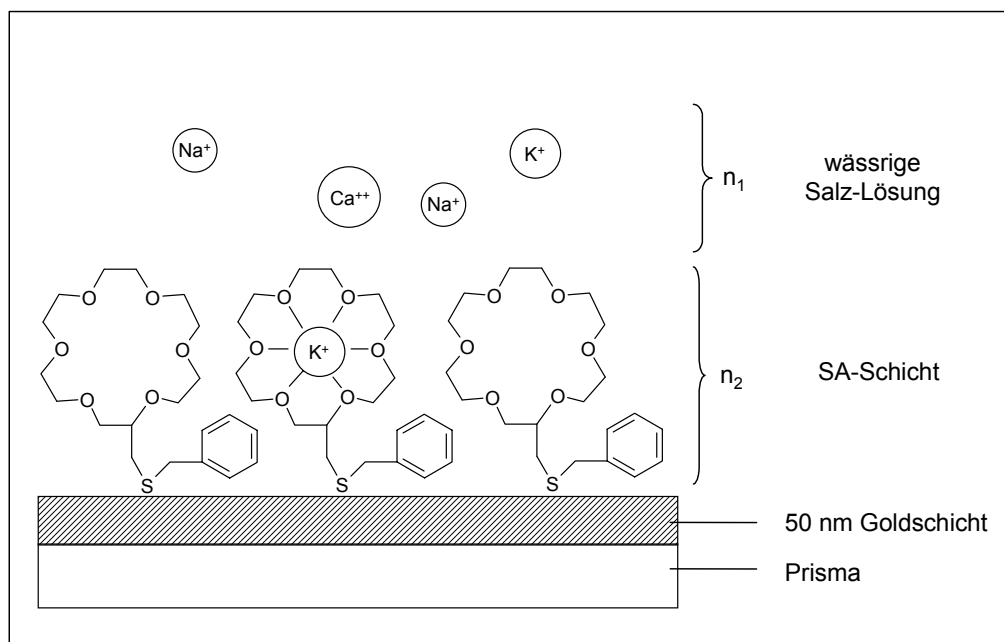


Abb. 49: Schematischer Aufbau der Sensoroberfläche mit adsorbierter 2-(Benzylsulfid)-18-Krone-6. Auf der Goldschicht befinden sich zwei Schichten mit unterschiedlichen Brechungsindizes n_1 und n_2 , wobei n_1 durch die Konzentrationsänderung und n_2 durch Komplexbildung verändert werden.

Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wird der Kronenether 2-(Benzylsulfid)-18-Krone-6 (Abb. 49) zur Komplexbildung von K^+ -Ionen ausgewählt. Einerseits ist der Synthesaufwand im Vergleich zu anderen thiol-substituierten Chelatbildnern vergleichsweise niedrig und andererseits ermöglicht die kurze Seitenkette die Komplexbildung im Bereich der oberflächennahen hohen elektromagnetischen Feldstärke der Plasmonwelle.

Entscheidend im bifunktionalen Molekül ist, dass das Adsorptions- und das Komplexbildungsverhalten sich nicht gegenseitig störend beeinflussen. Es muss berücksichtigt werden, dass die Komplexbildung für Metalle in Lösung nicht direkt übertragbar auf die Komplexbildung an molekularen Oberflächen ist, weil die oberflächengebundenen funktionellen Gruppen zweidimensional fest angeordnet sind [224].

4.4.2 Synthese von 2-(Benzylsulfid)-18-Krone-6 und Adsorption auf Gold

In vielen Untersuchungen zur Adsorption von organischen Thioverbindungen auf Goldoberflächen werden Thiol-Verbindungen eingesetzt [225, 226]. Die Vorteile der Thiole bestehen in der guten Zugänglichkeit der endständigen SH-Gruppe und möglicherweise in der hohen Polarität der S-H-Bindung. Der vollständige Mechanismus der Anbindung auf Gold ist noch nicht gänzlich aufgeklärt [227]. Thiole sind empfindlich gegenüber Autooxidation, wobei sich Disulfide und andere instabile Oxidationsprodukte bilden können.

S-substituierte Kronenether sind stabiler gegenüber Autooxidation als die entsprechenden freien Thiole [228], zeigen aber die gleichen Bindungseigenschaften zu Metallionen [229]. Sie sind

weniger oxidationsempfindlich gegenüber Sauerstoff und unter einem geringeren Syntheseaufwand darstellbar. Meist wird das Thiol durch Abspaltung einer Substitutionsgruppe am Schwefel im abschließenden Reaktionsschritt aus den S-substituierten Kronenethern hergestellt. Ist eine Anbindung des S-substituierten Kronenethers auf der Goldoberfläche nachzuweisen, wäre der experimentelle Aufwand für Synthese und Lagerung der Verbindung im Vergleich zum Thiol wesentlich geringer.

Es sind zwei prinzipielle Synthesewege aus der Literatur zur Darstellung der 2-(Benzylsulfid)-18-Krone-6 (Mercaptomethyl-Kronenether) bekannt. Im ersten Syntheseweg wird 2-Hydroxymethyl-18-Krone-6 als Reaktand eingesetzt [224]. Die enthaltene Hydroxyl-Gruppe wird in einer nukleophilen Substitutionsreaktion gegen eine Thioether-Gruppe ausgetauscht. Durch anschließende Reduktion erhält man als Edukt die Mercaptomethyl-Krone.

Beim zweiten Syntheseweg wird von Thioglycerol ausgegangen [216] und in einem nachfolgenden Schritt die Krone geschlossen. Mercaptomethyl-Kronenethers wird im Syntheseweg II hergestellt (Material und Methoden 8.8).

Die Adsorption des Mercaptomethyl-Kronenethers wird auf frisch bedampften Goldschichten durchgeführt. Die Schichtdicke des aufgedampften Goldes liegt bei 100nm. Die Adsorption erfolgt aus 1mM ethanolischer Lösung des Mercaptomethyl-Kronenethers im geschlossenen Teflongefäß für 24 Stunden unter Rühren bei RT. Nach der Adsorption wird 3mal mit Ethanol gewaschen und anschließend mit Stickstoff trocken geblasen.

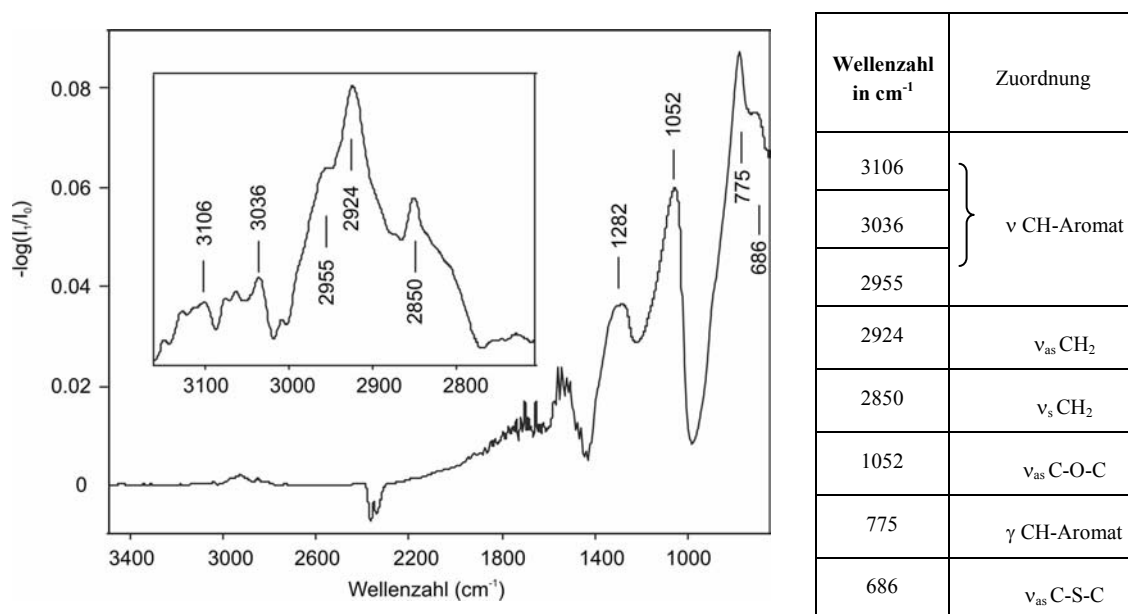


Abb. 50: FT-IRRAS Messung des adsorbierten Mercaptomethyl-Kronenethers auf einem goldbeschichteten Glassubstrat und Zuordnung der Banden.

Die Charakterisierung der SA-Schichten erfolgt direkt im Anschluss an die Adsorption mit FT-IRRAS (Fourier Transformations-Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie). Der streifende Einfall des Lichtes von 83° bietet einen ausreichend großen Wechselwirkungsquerschnitt, um molekulare Monolagen zu erfassen. Die experimentellen Details sind dem Kapitel 8.8 zu entnehmen. Abb. 50 stellt das basislinienkorrigierte Spektrum des auf Gold adsorbierten Mer-

captomethyl-Kronenethers dar. Nebenstehend sind die Bandenzuordnungen der Schwingungen aufgeführt.

Das Spektrum zeigt, dass auch der S-substituierte Mercaptomethyl-Kronenether als SA-Schicht auf Gold anbindet. Die Synthese und Anbindung des freien Thiols ist nicht erforderlich. Damit reduziert sich der Synthesaufwand und die Verbindung besitzt eine höhere Stabilität. Die Anbindung auf der Goldschicht führt nicht zu einer nachweisbaren Spaltung des Mercaptomethyl-Kronenethers, da sowohl ν_{as} der C-S-C-Bindung als auch die Schwingungen, die dem aromatischen Molekülteil zuzuordnen sind, im Spektrum auftreten.

4.4.3 Anbindung des Mercaptomethyl-Kronenethers in Polymerporen

STAMOU et al. [230] zeigten die erfolgreiche Adsorption von Octadecanthiol auf Elektrodenoberflächen, welche vorher mit Photoresist beschichtet und dieses anschließend partiell durch EBL entfernt wurde [230]. Dieses Ergebnis stärkt die hier getroffene Aussage, dass die Metalloberfläche eine Adsorption nach dem lithographischem Verfahren prinzipiell zulässt, auch nachdem sie bereits in Kontakt mit einem Photoresist stand.

Im folgenden wird die Adsorption des Mercaptomethyl-Kronenethers im Bereich der Poren der PMMA-Matrix untersucht. Da der Porengrund durch den lithographischen Prozess nicht vollständig von Materialresten befreit wird, kann eine Adsorption eines SA-funktionalisierten Chelatbildners zumindest empfindlich gestört sein. Zusätzlich kann der SA-Prozess unvollständig [224, 231] und wenig reproduzierbar ablaufen [232, 233].

Da die Adsorption zur Bildung der SA-Schichten in ethanolischer Lösung für 24h durchgeführt wird, muss zunächst die Stabilität der mikrostrukturierten Polymerschicht unter den Adsorptionsbedingungen gewährleistet sein. Eine PMMA-Matrix mit Porendurchmessern von $50\mu\text{m}$ wird in Ethanol gegeben und im FTIR-Imaging untersucht. FT-IRRAS ist für das mikrostrukturierte Sensor-Array aufgrund des streifenden Lichteinfalls nicht mehr zur Charakterisierung geeignet. Die Charakterisierung in den Mikroporen erfolgt daher mit FTIR-Imaging im Reflexionsmodus. Die Unterscheidung zwischen Poren und der Matrix in den FTIR-Bildern wird durch eine fuzzy-k-means-Clusteranalyse nach linearer Basislinienkorrektur getroffen. Die Bilder werden dabei in drei Cluster geteilt: Matrix, Pore und Übergangsbereich. Für die weiteren Auswertungen werden die Zentroid-Spektren der Poren bzw. der Matrix betrachtet.

Durch die Ethanoleinwirkung zeigen sich Veränderungen im Bereich der ν_{as} C-O-C-Schwingung. Das Bandenmaximum verschiebt sich sowohl im Bereich der Poren als auch im Matrix-Bereich um vier Wellenzahlen von ca. 1141 cm^{-1} auf 1137 cm^{-1} . Diese Verschiebung ist selbst durch 12h Tempern bei 180°C nicht reversibel. Die ursprüngliche Bandenlage wird nach Austreiben des Ethanols nicht wieder erreicht (Abb. 51). Welche Prozesse hierfür verantwortlich sind, konnte nicht abschließend aufgeklärt werden.

Eine Hypothese besteht darin, dass Ethanol mit der Methylestergruppierung des PMMA chemisch reagiert. Eine Umesterung findet statt, bei der Methanol aus dem Polymergerüst verdrängt und durch die jeweilige Ethylestergruppierung ersetzt wird. Die Bestätigung dieser Annahme bringt das Vergleichsspektrum des Polymethyl-ethylacrylates mit gleicher Kettenlänge von 950K. Die Synthese dieser Verbindung lag jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit, so dass eine abschließende Klärung der Verschiebung nicht erbracht wird.

Die Adsorption des Mercaptomethyl-Kronenethers erfolgt aus 1mM ethanolischer Lösung. Nach der Adsorption wird dreifach mit Ethanol gespült, um überschüssigen Mercaptomethyl-

Kronenether zu entfernen. Die Zentroid-Spektren von Poren- und Matrix-Bereichen werden zur Probe ohne Ethanoleinwirkung referenziert. Die Charakterisierung erfolgt im Valenzschwingungsbereich der C-O-C-Bande (Abb. 52) und der CH-Banden (Abb. 53). Beide Wellenlängenbereiche zeigen unterschiedliche Bandenlagen der Spektren nach einer Adsorption des Mercaptomethyl-Kronenethers im Vergleich zur Einwirkung des reinen Ethanol. Zusätzlich ist in Abb. 52 das Spektrum des Mercaptomethyl-Kronenethers auf Gold dargestellt, welches mit FT-IRRAS aufgenommen wurde. Der Kronenethermolekülteil zeigt deutliche Banden unterhalb der C-O-C-Bande der PMMA-Matrix. Die C-O-C-Bande im FTIR-Spektrum besitzt eine leichte Verschiebung zu geringeren Wellenzahlen im Vergleich zum FT-IRRAS-Spektrum.

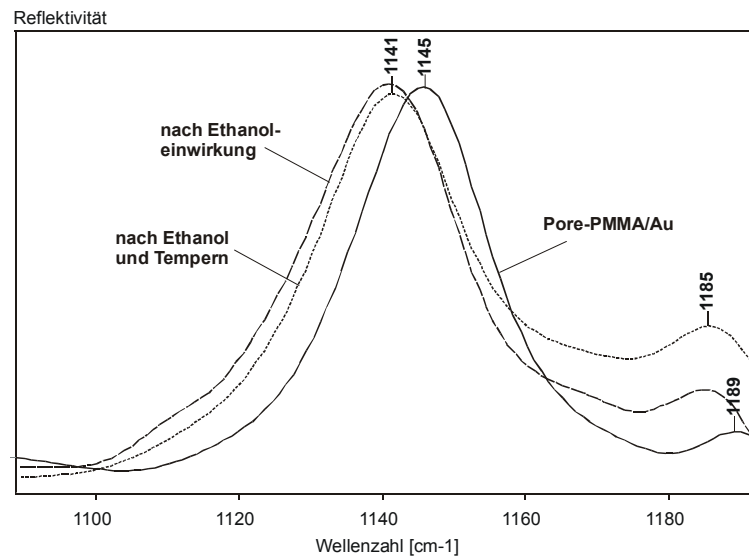


Abb. 51: Einfluss von Ethanol im Bereich der PMMA-Matrix auf die Bandenlage der ν_{as} C-O-C.

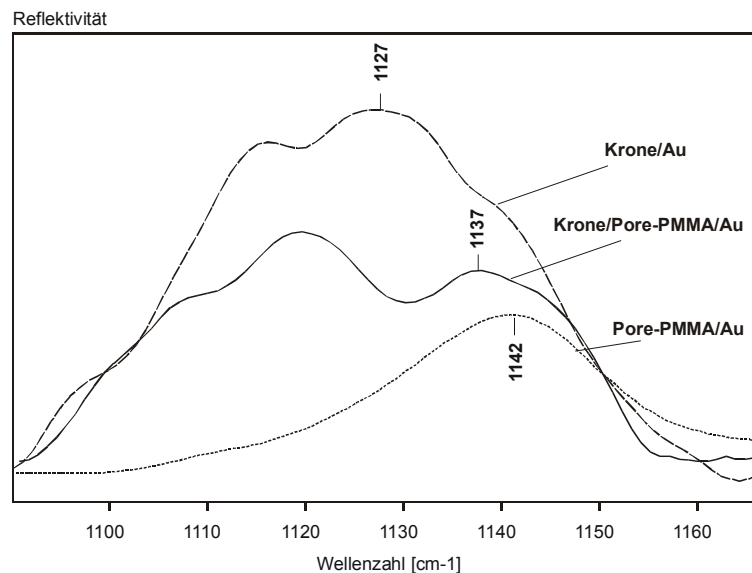


Abb. 52: Mittelwertspektrum im Bereich der ν_{as} C-O-C-Bande von adsorbiertem Mercaptomethyl-Kronenether auf Gold und im Porenbereich der PMMA-Matrix (Zentroid-Spektrum); Zentroid-Spektrum des Porenbereiches ohne Mercaptomethyl-Kronenether.

Der Valenzschwingungsbereich für die C-H-Banden beweist ebenfalls, dass der Mercaptomethyl-Kronenether in den Poren der Matrix anbindet. Die Spektren in Abb. 53 zeigen deutlich

andere Bandenlagen. Die aromatische Seitenkette zeigt intensive Signale oberhalb von 3000cm^{-1} , bei 2990cm^{-1} und 2947cm^{-1} . Im Matrix-Bereich des PMMA kann im Gegensatz zur Porenregion kein adsorbierter Mercaptomethyl-Kronenether detektiert werden.

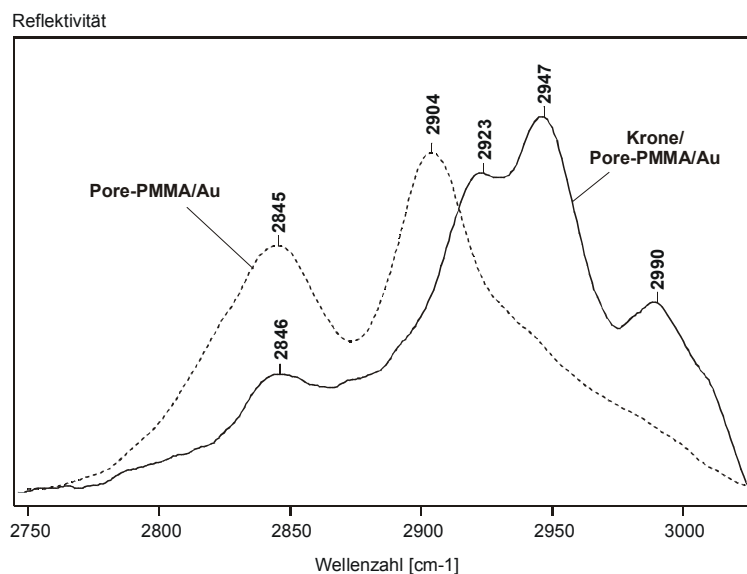


Abb. 53: Zentroid-Spektren im Valenzschwingungsbereich der CH-Banden von adsorbiertem Mercaptomethyl-Kronenether im Porenbereich der PMMA-Matrix und Zentroid-Spektrum des Porenbereiches ohne Mercaptomethyl-Kronenether.

Der Chelatbildner bindet innerhalb der Mikroporen der Polymermatrix an. Da restliches Material in den Poren nicht gleichmäßig verteilt vorliegt, tritt die Thioether-Gruppe nur teilweise mit der Goldoberfläche in Wechselwirkung.

Die Aufkonzentrierung der Ionen ist durch eine Modifizierung der Sensor-Arrayoberfläche innerhalb der Mikroporen möglich. Anhand der dargestellten Ergebnisse wird gezeigt, dass SA-Schichten von Mercaptomethyl-Kronenether Metallionen aus wässriger Lösung binden können. Die Bindung des Mercaptomethyl-Kronenethers zum jeweiligen Metallion beeinflusst die dielektrischen Eigenschaften der Schicht n_2 . Aus den Untersuchungen wird ebenfalls deutlich, dass gerade bei geringen Salz-Konzentrationen die Verwendung einer komplexierenden SA-Schicht die Nachweisgrenze deutlich absenken kann.

4.4.4 Komplexbildung des adsorbierten Mercaptomethyl-Kronenethers

Welche Ionen gebunden werden können, hängt stark von der Ringgröße des Kronenethers ab. Für 18-Krone-6 ist nachfolgender Vergleich der Assoziationskonstanten bekannt [221]:

$$K_{\text{Ca}^{2+}} \sim K_{\text{K}^{+}} > K_{\text{Cs}^{+}} \gg K_{\text{Na}^{+}} > K_{\text{Li}^{+}},$$

Ein quantitativer Vergleich, in wie weit die Seitenkette und die Adsorption auf der Metalloberfläche die Bindungseigenschaften des Mercaptomethyl-Kronenethers im Verhältnis zum freien Molekül in Lösung beeinflussen, wird in der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen.

Nach der erfolgreichen Anbindung des Mercaptomethyl-Kronenethers auf der Goldschicht bleibt zu klären, ob eine Komplexbildung der Metallionen durch den Kronenether stattfindet oder ob die Bindungseigenschaften für die Metallionen von der substituierten Seitenkette und der Nähe zur festen Oberfläche beeinflusst werden. Das Ziel weiterer Untersuchungen ist die SPR-spektroskopische Charakterisierung der Komplexbildung und die Quantifizierung der Sensitivitätserhöhung auf die Detektionsmethode durch die lokale Aufkonzentrierung der Ionen in der SA-Schicht des S-substituierten Mercaptomethyl-Kronenethers.

Die Adsorption des Mercaptomethyl-Kronenethers auf einer Goldschicht wird im Durchfluss mit einer 1mM ethanolischen Mercaptomethyl-Kronenether-Lösung durchgeführt. Anschließend wird mit Wasser gespült, bis ein konstanter SP-Resonanzwinkel vorliegt. Der SP-Resonanzwinkel für Wasser wird als Referenzwert genutzt. Beim Überleiten von wässrigen Salzlösungen mit ansteigender Metallionen-Konzentration im Bereich von 1mM bis 10mM wird die Verschiebung des Resonanzwinkels beobachtet.

Zum Vergleich wird eine zweite Probe ohne SA-Schicht mit Salzlösung überspült. Als Referenzwert für die SPR-Messung dient wiederum Wasser. Der Vergleich beider Proben zeigt den Einfluss des adsorbierten Mercaptomethyl-Kronenethers.

Abb. 54 stellt die Ergebnisse für NaCl-, KCl- und CaCl₂-Lösungen dar. Der Vergleich der relativen Verschiebungen der Resonanzwinkel von freier Goldoberfläche zur Oberfläche mit adsorbiertem Mercaptomethyl-Kronenether führt zu der Aussage, dass die Komplexbildung in der SA-Schicht zu einer deutlichen Veränderung der Signalintensitäten führt. Eine Erklärung liefern die verschiedenen Signalanteile, die die relative Verschiebung des Resonanzwinkels verursachen:

- ▷ Die Änderung der Dielektrizitätszahl durch die verschiedenen Konzentrationen der Salzlösung als homogene Phase über der reinen Goldschicht bedingt die Verschiebung des Resonanzwinkels.
- ▷ Die Änderung der Dielektrizitätszahl der Mercaptomethyl-Kronenetherschicht bildet einen oberflächennahen Anteil n_2 (Abb. 49). Die Verschiebung des Resonanzwinkels wird hier von dominiert. Ein zweiter Anteil aus der Schicht n_1 resultiert, wie bei der reinen Goldoberfläche, aus der Änderung der Dielektrizitätszahl durch die Konzentrationsänderung der Salzlösung. Der geringere Einfluss von n_1 auf die Verschiebung des Resonanzwinkels resultiert daraus, dass die Feldstärke der SP-Welle exponentiell mit der Distanz zur Oberfläche sinkt.

Die in Abb. 54 dargestellten Messergebnisse zeigen, dass die relative Verschiebung des Resonanzwinkels bei geringen Salz-Konzentrationen vergleichsweise stärker ist als bei höheren Konzentrationen. Eine minimale Konzentration von 0,5mM ist bei allen Proben deutlich messbar.

Für die Komplexbildung ist auch der effektive Ionenradius entscheidend. Für Na⁺-Ionen in Komplexen mit der Koordinationszahl 6 beträgt er 102pm [234]. Der komplexierende Molekülteil der 18-Krone-6 bindet die Na⁺-Ionen nicht in der SA-Schicht. Dieses Ergebnis stimmt mit dem entsprechenden aus der Komplexbildung in Lösungen überein [235, 236].

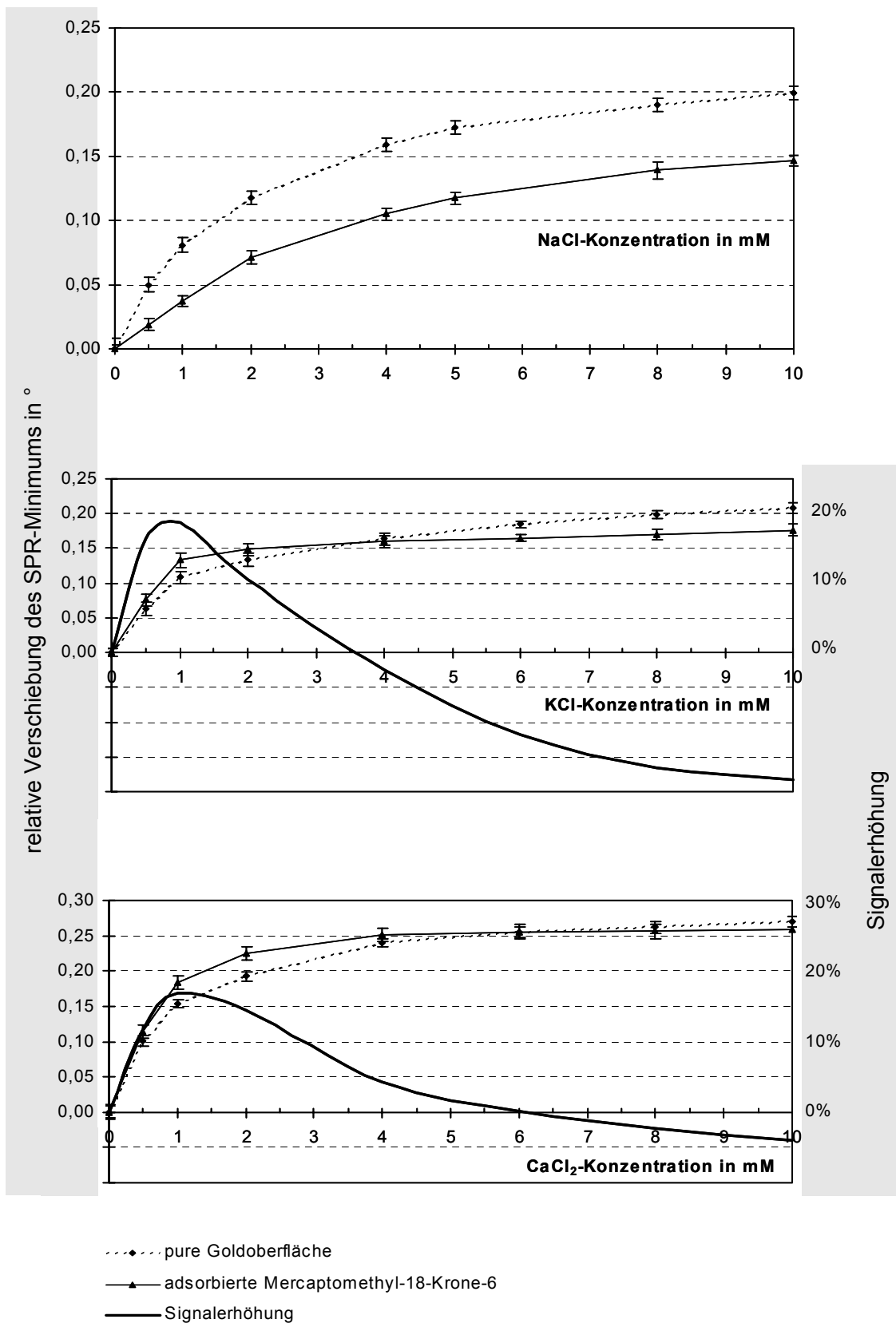


Abb. 54: Darstellung der relativen Verschiebung des Resonanzwinkels der SP-Kurven durch wässrige NaCl-, KCl- und CaCl₂-Lösungen mit ansteigender Konzentration auf der freien bzw. modifizierten Goldschicht.

Der Kurvenverlauf für die Na^+ -Ionen-Komplexierung zeigt, dass die Dielektrizitätszahl in der SA-Schicht n_2 konstant bleibt. Die höheren relativen Verschiebungen bei der freien Goldschicht lassen sich auf die Tatsache zurückführen, dass die Änderung der Dielektrizitätszahl durch die verschiedenen Salzkonzentrationen direkt an der Goldoberfläche gemessen wird. Im Fall der adsorbierten Mercaptomethyl-Kronenetherschicht wird der Einfluss der Salzlösung zurückgedrängt. Dringen nur sehr wenige Na^+ -Ionen in die SA-Schicht ein, schirmt der Mercaptomethyl-Kronenether die Verschiebung des Resonanzwinkels ab. Die SA-Schicht wirkt ähnlich einer „Isolierschicht“ für die SP-Welle.

Wird eine KCl- oder CaCl_2 -Lösung verwendet, zeigt die relative Resonanzwinkelverschiebung in Abhängigkeit von der Salzkonzentration der Lösung einen deutlich differenten Kurvenverlauf.

Bei Konzentrationen unterhalb von 4mM KCl in der Lösung ist die Verschiebung des Resonanzwinkels vergleichsweise größer, als bei der Messreihe ohne SA-Schicht. Es kommt zu einer Änderung des Brechungsindex innerhalb der SA-Schicht. Dies ist das Ergebnis einer Komplexbildung von K^+ -Ionen durch den Kronenether. Die Konzentration an Metallionen ist an der Oberfläche anscheinend größer als in der Lösung. Der Anteil der Verschiebung des Resonanzwinkels der SP-Welle, der aus der Änderung des Brechungsindex durch die ansteigende Salzkonzentration resultiert, ist durch die abschirmende Wirkung der SA-Schicht vergleichsweise gering. Die letztlich messbare Verschiebung des Resonanzwinkels ist unter dem Einfluss der SA-Schicht größer für Ionenkonzentrationen unterhalb des Schnittpunktes beider Messkurven. Es wird eine maximale Erhöhung der Sensitivität um etwa 20% erreicht.

Ca^{2+} -Ionen zeigen ähnliches Verhalten im unteren Konzentrationsbereich. Die Ca^{2+} -Ionen werden ebenfalls vom Kronenethermolekülteil komplexiert. Dadurch wird auch hier die Dielektrizitätszahl der SA-Schicht unmittelbar in Goldoberflächennähe erhöht. Es tritt eine Erhöhung der relativen Verschiebung des Resonanzwinkels auf. Der Schnittpunkt der Messkurven für die freie bzw. mit SAM-beladene Goldoberfläche liegt mit ca. 6mM höher als im Falle der KCl-Lösungen. Die Erhöhung der relativen Winkelverschiebung liegt mit maximal 16% geringfügig niedriger als die für K^+ -Ionen erreichbare. Jedoch ist die absolute Winkelverschiebung höher, so dass letztlich beide Ionenarten zu einer ähnlichen Sensitivität der SPR-Messung führen.

Im Bereich des Schnittpunktes ist der Einfluss beider Anteile (Änderung der Dielektrizitätszahl in der SA-Schicht durch Komplexbildung und Änderung der Dielektrizitätszahl in der Lösung durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen) gleich groß.

Bei Salzkonzentrationen, die oberhalb des Schnittpunktes der jeweiligen Messkurven liegen, steigen die Kurven für K^+ - und Ca^{2+} -Ionen weniger stark an. Die Mercaptomethyl-Kronenetherschicht ist gesättigt. Sie wirkt abschirmend. Der Signalanteil, der aus der Änderung der Dielektrizitätszahl durch die steigende Salzkonzentration resultiert, bestimmt den weiteren Anstieg der Kurve.

Zusammenfassend zeigen die Arbeiten zur Verbesserung der Sensitivität der optischen Detektion durch Verwendung einer SA-Schicht von Mercaptomethyl-Kronenether:

- ▷ Im Ionenkanalsensor-Array verteilen sich die durch das aktivierte Kanalprotein hindurchströmenden Ionen nicht mehr gleichmäßig über das gesamte Porenvolumen, sondern werden an der Goldoberfläche aufkonzentriert. Zur Aufkonzentrierung wird eine SA-gebundene Thioetherschicht in den Mikroporen adsorbiert, die so funktionalisiert ist, dass sie Metallionen selektiv bindet.
- ▷ Es wird eine Sensitivitätssteigerung bei gleichem Sensorprinzip und gleicher Detektionsmethode beobachtet. Das Messsignal wird um 20% gesteigert.
- ▷ Die Verwendung der komplexierenden SA-Schicht verringert den Einfluss des Porenvolumens und seiner Irregularitäten auf die SPR-Imaging-Messung.

Zukünftig besteht mit Hilfe von maßgeschneiderten Chelatbildnern die Möglichkeit Ionenarten in den Mikroporen zu unterscheiden, in Mischungen quantitativ zu erfassen und die Nachweisgrenze noch weiter abzusenken. Dazu werden in verschiedenen Poren verschiedene Chelatbildner adsorbiert bzw. Gemische von Chelatbildnern mit unterschiedlicher Metallionenselektivität der Komponenten.

Somit schalten Ionenkanäle gleicher Art über den unterschiedlich selektiven Chelatbildnern, und es kann das Verhältnis der durchströmenden Ionen untereinander bestimmt werden. Im Unterschied zur integralen Messung mittels SPR-Imaging ohne SA-Chelatbildner kann mit diesem Sensoraufbau die Selektivität von Kationenkanälen bestimmt werden.

Neben der Auswahl der komplexierenden Funktionseinheit bestimmen auch Art, Länge und Anzahl der Seitenketten, die die Verbindung zur oberflächenadsorbierenden Gruppe herstellen, die resultierende Winkelverschiebung der SPR-Funktion. Dies geschieht durch den einstellbaren Abstand der Assoziation des Kations zur Metalloberfläche. Durch besondere Anordnung der SA-gebundenen Moleküle auf der Sensoroberfläche könnte die integrale Affinität der Chelatbildnerschicht gesteigert werden (vgl. Sandwich-Metall-Komplexe in [217]). Sperrige komplexierende Funktionseinheiten könnten durch Verwendung unterschiedlich langer Seitenketten in einer Art dreidimensionalem Schichtsystem verdichtet werden. Ein ähnlicher Effekt lässt sich erreichen, wenn eine S-Gruppierung zwei unterschiedlich lange Seitenketten mit komplexierender Funktionseinheit trüge.

Auch die Anbindung des Chelatbildners auf der Metalloberfläche kann variiert werden. Hierbei könnten Fragen zur Lagerfähigkeit, der Haltbarkeit oder auch Regenerier- bzw. Recyclebarkeit des Sensor-Arrays beleuchtet werden.

5 Lipiddoppelschichten auf der Polymermatrix

Die Grenzfläche zwischen Lipidschicht und Polymermatrix entscheidet über die Ausbildung einer LDS und deren Haltbarkeit. Die Wechselwirkungen zwischen Lipid und Matrix können gezielt beeinflusst werden. Bei einer Veränderung der chemischen Zusammensetzung des Lipids zur Verstärkung der adhäsiven Kräfte zur Matrix muss stets die veränderte Wechselwirkung zum Ionenkanal berücksichtigt werden.

Als membrangebundener Ionenkanal behält der nAChR seine Funktionsfähigkeit nur, wenn er in eine komplex zusammengesetzte LDS integriert wird. In stark aufgereinigten Phosphatidylcholin zeigt er keine Aktivität mehr [237]. Wird zum Aufbau der LDS ein speziell aufbereiteter Lecithin-Extrakt der Soja-Bohne, Lipoid S75, verwendet, konnte die Kanalaktivität nachgewiesen [11]. Das Lipoid S75 enthält einen Phosphatidylcholinanteil von ca. 70%. Anteile an Phosphatidylethanolamin bzw. Lysophosphatidylcholin sind mit 7-10% bzw. max. 3% angegeben. Neben den Phospholipiden können laut Hersteller (Lipoid KG, Ludwigshafen) bis zu 15% Glycolipide enthalten sein. Hauptkomponenten der Fettsäuren sind Palmitinsäure, Stearinsäure, Linol- und Linolensäure und Ölsäure. Neben der komplexen Zusammensetzung des Lipids, spielt der Gehalt an Cholesterol (Chol) eine wichtige Rolle für den Erhalt der Proteinaktivität [238]. Das Chol erhöht gleichfalls die Stabilität der LDS [239]. Weitere Untersuchungen werden daher mit einer Lipidzusammensetzung von Lipoid S75 und einem Chol-Anteil von 70:30 durchgeführt. Die Lösungskonzentration des Lipids beträgt 15mg/ml.

5.1 Lipidmembran-Modelle auf porösen Trägern

Um die Zellmembranen mit künstlichen Membran-Modellen nachzubilden, müssen folgende strukturellen und dynamischen Merkmale der Zellmembran erhalten bleiben:

- Ausbildung einer LDS
- laterale Mobilität von Membrankomponenten, wichtig für Transportprozesse und Integration bzw. Anbindung membranassoziierter Proteine [240],
- Fluidität beider Lipidmonoschichten, wichtig unter Stressbedingungen, wie Temperatur- oder Druckveränderungen [240],
- Bioaktivität von Membranproteinen [241],
- Robustheit, Langzeitstabilität und hohe Impermeabilität für viele Substanzen, insbesondere Metallionen [242].

Das Vorhandensein der vorgenannten Merkmale entscheidet über die biologische Relevanz des Modells bei der Sensorentwicklung.

Ein Membran-Modell mit hoher biologischer Relevanz ist die freistehende Lipidmembran (engl. - black lipid membrane BLM). In hydrophoben Aperturen [243, 244] mit Durchmessern von 1µm bis 1mm wurde eine LDS aufgespannt (Abb. 55A). Die Lipidschicht bildet trägerseitig einen Lipidmeniskus aus [245]. Die Integration und Funktionsfähigkeit von Ionenkanälen wurde nur im Bereich der LDS beobachtet [246, 247]. Lösemittelmoleküle aus dem Bereich des Me-

niskus' können den Ionenkanal deproteinieren [11]. Die wenig reproduzierbare Herstellung und die geringe Stabilität der BLM verhindern einen automatisierten, technischen Einsatz im Biosensor oder in Hochleistungsscreening-Assays [248].

Um die Stabilität und Robustheit der BLM zu erhöhen, wurden sie auf einem festen Träger aufgelegt [249, 250, 251] oder chemisch mit Hilfe von Kopplungssubstanzen angebunden (tethered pore spanning– tp-LDS) [252, 253]. Auf der Trägerseite existierte damit kaum ein Flüssigkeitsreservoir [254]. Falls Membranproteine überhaupt in diese LDS integriert werden, treten mit dem Träger bzw. den Kopplungssubstanzen Wechselwirkungen auf, die das Protein vergiften [255] oder die laterale Mobilität des Lipids herabsetzen. Allerdings wird die hohe Stabilität dieser Membran-Modelle derzeit nur von den Zellmembranen selbst übertroffen. RÖMER et al. veröffentlichten in [248] Untersuchungsergebnisse zu porenüberspannenden Lipidschichten, wobei die Lipidschicht im Kontaktbereich mit einer Siliziumoberfläche über Gold und Thiolipide angebunden wird. Es entsteht eine Hybridmembran (Abb. 55B), deren Stabilität mehrere Stunden beträgt [254, 256]. Bei Hybridmembranen liegt nur im Bereich der Apertur eine LDS vor. Die Eigenschaften der Lipidschicht ändern sich im Porenrandbereich sprunghaft. Ionenströme konnten bisher nur mit synthetischen Ionenkanälen gemessen werden [257]. Alternativ zur chemischen Anbindung kann elektrostatische Wechselwirkung genutzt werden (Abb. 55C). Durch den Glättungseffekt der Kopplungssubstanz wird eine Haltbarkeit bis zu 100h erzielt [258]. Zur Integration von Proteinen in diesem Modell wurden bisher keine Ergebnisse veröffentlicht.

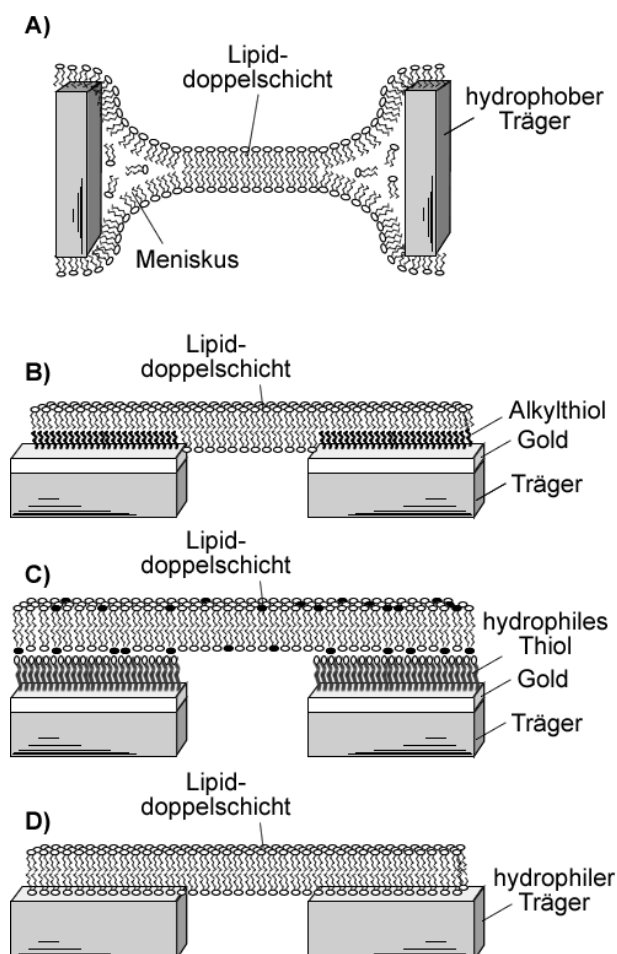


Abb. 55: Schematische Darstellung von Membran-Modellen zur Erzeugung porenüberspannender Lipiddoppelschichten: A) BLM, B) Hybridmembran, C) chemisch-angebundene tp-LDS, D) p-LDS.

In Abb. 55D) wird ein weiteres Modell vorgestellt. Die porenüberspannende Lipiddoppelschicht (p-LDS) ist vom Systemaufbau vergleichsweise einfach und besteht aus einem hydrophilen, porösen Träger und der p-LDS. Die Eigenschaften der p-LDS sind zeitlich konstant, da sich kein Meniskus ausbildet. Die Stabilität der p-LDS liegt damit im Bereich der tp-LDS [259, 260]. Die laterale Fluidität wird bei der Wahl eines geeigneten Trägermaterials kaum beeinflusst. Überspannte Porendurchmesser liegen bisher im Bereich von 10-25nm [240]. Auf Siliziumdioxid- und Glasfilter-Aperturen werden bis zu 100µm überspannt [243].

5.2 Auswahl der porenüberspannenden Lipiddoppelschicht

Membran-Modelle, die den Funktionsverlust der integralen Membranproteine bewirken bzw. deren Integration grundsätzlich ausschließen, scheiden bei der Konzeption des Ionenkanalsensor-Arrays aus. Ein Vergleich biologisch relevanter Merkmale der Apertur-überspannenden Membran-Modelle, die Bildungswahrscheinlichkeit und voraussichtliche Stabilität der erzeugten LDS entscheiden über den Einsatz im Ionenkanalsensor-Array (Tabelle 7).

Tabelle 7: Verschiedene Membran-Modelle und deren biologisch relevante Eigenschaften (Kategorien: ++ sehr gut, + gut, - ausreichend, -- schlecht);
* Abschätzung des Merkmals vorgenommen)

Merkmale im Porenbereich	BLM	Hybridmembran	chemisch- angebundene tp-LDS	p-LDS	
Impermeabilität	++	--	--	++	
laterale Fluidität	++	-	--	(++)	[240]*
Robustheit	--	++	++	+	
Langzeitstabilität	--	++	+	(+)	[261]*
Ausbildung einer LDS	-	--	++	++	
Funktion integrierter Proteine	++	--	--	(++)	[262]*

Das Modell der p-LDS liefert von den bisher publizierten Membran-Modellen voraussichtlich eine Lipidschicht mit biomimetischen Eigenschaften bei höherer Stabilität im Vergleich zur BLM. Die chemische Zusammensetzung soll sich bis auf die Proteinanteile der natürlichen Lipidmembran weitgehend annähern. Damit wird ermöglicht, dass Eigenschaften wie laterale Fluidität und Impermeabilität der LDS weitgehend unbeeinflusst bleiben.

Für den Einsatz der p-LDS im Sensor-Array spricht auch ein einfacher Schichtaufbau aus Träger und Lipidschicht ohne zusätzliche haftvermittelnde Schichten. Membranproteine können im Bereich der überspannten Poren in die LDS integriert werden. Weil die Wechselwirkung mit einem festen Träger und der Kontakt zu Lösemittelmolekülen vermieden werden kann, behalten Sie ihre Funktionsfähigkeit. Auf beiden Seiten der LDS befindet sich ein Flüssigkeitsreservoir, das die hydrophilen Bereiche des Ionenkanals umgeben kann. Neben den bestätigten Eigenschaften besitzt die p-LDS ein hohes Potenzial zur Verbesserung bisher nur abgeschätzter Eigenschaften, z.B. der Robustheit der aufgespannten LDS (mit * gekennzeichnete Eigenschaften in Tabelle 7). Aus den vier Membran-Modellen wird daher die p-LDS für die Entwicklung des Ionenkanalsensor-Arrays ausgewählt.

5.3 Lipidverträglichkeit der PMMA-Stege

Die Wechselwirkung der festen Polymermatrix mit dem Lipid muss zum Einen eine gute Anbindung des Lipids gestatten, um eine ausreichende Stabilität der p-LDS zu erreichen. Zum Anderen sollten die Eigenschaften der Lipidschicht durch den Träger nicht verändert werden. Aus der Literatur sind als geeignete Trägermaterialien bisher Glas [263, 264], Proteine [265], leitende und nichtleitende Polymere bekannt [241, 266]. Die Verbesserung der Substrathaftung kann auch hier durch elektrostatische Wechselwirkung von zugesetzten geladenen Lipidkomponenten mit den Oberflächenladungen des Substrates erfolgen [267].

Zur Charakterisierung der p-LDS wird in der vorliegenden Arbeit die Fluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt. Sie gestattet die Detektion des aufgespannten Lipids auf der PMMA-Matrix und deren Qualität, insbesondere der Defekthäufigkeit im Bereich der Poren und des festen Trägers. Auch die Schichtdicke der Lipidschicht kann bewertet werden. Zur Fluoreszenzmarkierung wird das Fluorophor Marina Blue® DHPE (1,2-Dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-Phosphoethanolamin) eingesetzt, weil es auch bei neutralem pH-Wert noch eine starke Fluoreszenz zeigt. Die fluorophore Gruppe wird über die Phosphoethanolamingruppierung ans Lipid gekoppelt. Der fluoreszierende Molekülteil ragt aus der Lipidschicht heraus. Die Störung der Packungsdichte der Lipidmoleküle durch den Fluoreszenzmarker ist damit wesentlich geringer als bei der Verwendung von Markern, die sich innerhalb der Lipidschicht befinden [268].

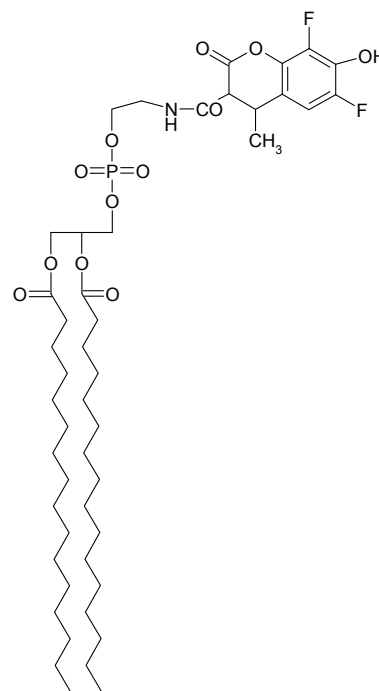


Abb. 56: Strukturformel des Fluoreszenzmarkers Marina Blue® DHPE (Anregungs-/Emissions-maximum 365nm/460nm)

Der Fluoreszenzmarker Marina Blue® DHPE ist sensitiv für Membraneigenschaften, wie die Lipidfluidität, laterale Domänenbildung und Strukturveränderungen durch Proteine [269]. Auf einer PMMA-Mikrostruktur (PMMA 950K) mit Porendurchmessern von 10µm wird unter Ringer-Pufferlösung die fluoreszenzmarkierte Lipid-Lösung mit der Pinseltechnik aufgestrichen. Es wird eine Vesikelbildung des Lipids beobachtet. Die Vesikel befinden sich insbesondere im Bereich der Mikroporen. Mit der Pinseltechnik ließ sich keine p-LDS auf der PMMA-Matrix aufspannen. Die Vesikelbildung kann einerseits durch die Oberflächeneigenschaften der Polymermatrix hervorgerufen bzw. andererseits durch die Auftragetechnik ausgelöst werden.

Um die Lipidverträglichkeit der Matrixoberfläche zu testen, wird auf einer PMMA-Schicht, zunächst ohne Mikrostruktur, in Ringer-Pufferlösung jeweils eine definierte Menge fluoreszenzmarkierte Lipidmischung mit der Pinseltechnik aufgetragen und auf einer weiteren PMMA-Schicht aus einer Kapillare 5µl der Lipidmischung abgesetzt. Die fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der jeweils erzeugten Lipidschichten auf dem PMMA zeigt Abb. 57.

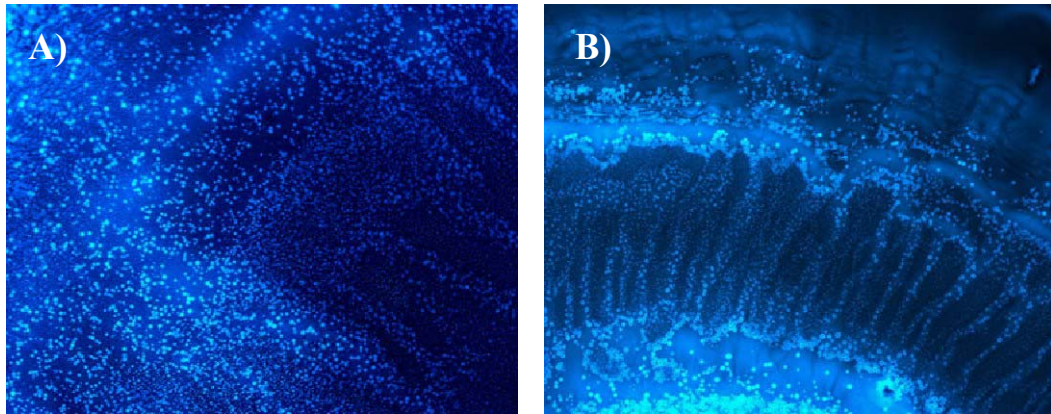


Abb. 57: Fluoreszenzaufnahme des markierten Lipids (3% Marina Blue[®] DHPE) auf PMMA A) mit der Pinseltechnik (200fache Vergrößerung) und B) mit einer Kapillare (100fache Vergrößerung) aufgetragen.

In Folge beider Auftragsmethoden zeigt sich eine Vielzahl von Vesikeln unterschiedlicher Größe. Die Vesikelbildung auf der PMMA-Schicht rührt demnach nicht aus der mechanischen Beanspruchung des Lipids beim Auftrag mit dem Pinsel her. Da beim Ausfluss aus der Kapillare keine Verwirbelung auftritt wie zwischen den Pinselhaaren, bestärkt die Vesikelbildung bei dieser Auftragsmethode die Hypothese, dass die Wechselwirkung zwischen PMMA und Lipid zu keiner festen Haftung führt. Dafür spricht ebenfalls, dass sich auch nach einer Stunde noch keine Veränderung in der Vesikelgröße oder -anzahl zeigt. Eine Aufschmelzung der Vesikel untereinander oder mit der Matrixoberfläche ist nicht zu beobachten.

Da das Lipid als amphiphiles Molekül sich mit der polaren Kopfgruppe in Richtung Puffermedium ausrichtet, versucht es seine Oberfläche, die mit dem PMMA in Kontakt tritt, über Vesikelbildung zu minimieren.

Da sich keine stabile, homogene Lipidschicht an der Grenzfläche PMMA/Puffer auftragen lässt, ist PMMA als Polymermatrix für die p-LDS im Ionenkanalsensor-Array nicht geeignet.

Resultierend aus den bisherigen Untersuchungen muss deshalb eine Strategie entwickelt werden, die eine Adhäsion der polaren Kopfgruppen des Lipids auf der Polymermatrix zulässt. Die Hydrophilie des Polymers muss eine wenige Nanometer dicke Wasserschicht zulassen, um das Lipid zu tragen ohne die Doppelschichtstruktur zu zerstören. Verfahrensstrategien sind:

- ▷ Durch chemische/physikalische Oberflächenmodifikation können die hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften der PMMA-Schicht verändert werden.
- ▷ Das Aufbringen einer weiteren Schicht mit den gewünschten Oberflächeneigenschaften auf die PMMA-Schicht vermittelt die Adhäsion des Lipids.
- ▷ Verwendung eines hydrophileren, mikrostrukturierbaren Polymers.

5.3.1 Oberflächenmodifizierung von PMMA

Neben den Benetzungseigenschaften der PMMA-Matrix gegenüber einer Pufferlösung, die für die vollständige Füllung der Mikroporen entscheidend ist, spielt die Adhäsion zu den polaren Kopfgruppen des Lipids eine wichtige Rolle für die Stabilität der p-LDS. Um die Vesikelbildung des Lipids auf der Oberfläche zu verringern, muss die Hydrophilie der PMMA-Oberfläche erhöht werden. Daraus resultiert eine Steigerung der Lipidverträglichkeit.

Für viele technische Anwendungen bietet die Plasmabehandlung von Polymeroberflächen eine einfache Möglichkeit, gezielt die Oberflächeneigenschaften zu verändern [270]. Modifiziert werden chemische Funktionalitäten an der Oberfläche, das Benetzungsvermögen, die Adhäsionsfähigkeit, die Mikrorauigkeit und der energetische Zustand der Oberfläche [271, 272].

Sauerstoff- oder auch Luft-Plasmabehandlung wird eingesetzt, um PMMA-Oberflächen zu hydrophilisieren [273]. Verschiedene sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen werden in die oberflächennahen Schichten eingebracht [274, 275]. Die Prozesse zur Veränderung der Benetzungseigenschaften sind insgesamt sehr komplex und nicht vollständig verstanden [276]. Daraus ergibt sich, dass die Änderung der Benetzungseigenschaften nicht vollständig theoretisch vorhersagbar ist, sondern in Versuchen getestet werden muss. Auch die Oberflächenrauigkeit nimmt durch die Plasmabehandlung zu [174]. Die damit verbundene Erhöhung der freien Oberflächenenergie trägt zum Effekt der Veränderung der Benetzungseigenschaften zusätzlich bei.

Zum Vergleich wird eine zweite Probe ohne SA-Schicht mit Salzlösung überspült. Als Referenzwert für die SPR-Messung dient wiederum Wasser. Der Vergleich beider Proben zeigt den Einfluss des adsorbierten Mercaptomethyl-Kronenethers.

Deshalb wird die Änderung der Benetzungseigenschaften der PMMA-Matrix durch ein Luftplasma durch Kontaktwinkelmessungen bestimmt. Abb. 58 stellt die gemessenen Kontaktwinkel von Wassertropfen (20 μ l) auf ausgewählten Oberflächen dar.

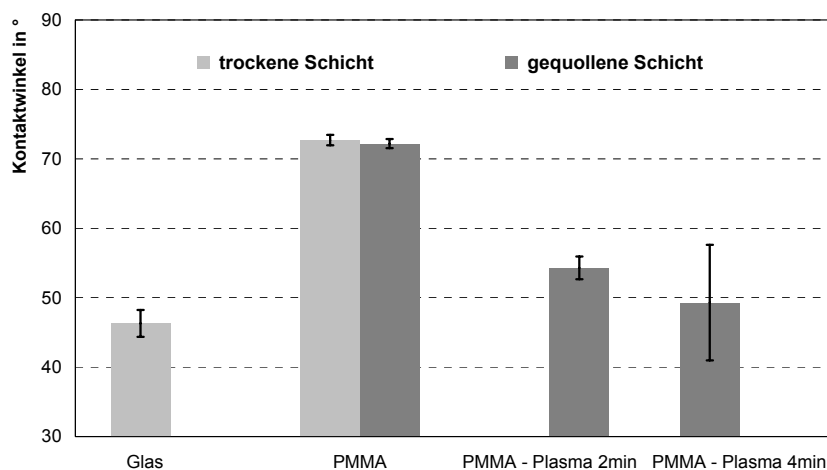


Abb. 58: Kontaktwinkelmessungen mit Standardabweichung auf trockenen bzw. gequollenen Oberflächen.

Glas wird als Routineträgermaterial für Lipidschichten eingesetzt und ist deshalb in die Messung einbezogen worden. Mit einem Kontaktwinkel von $47^\circ \pm 2^\circ$ zeigt es hydrophile Oberflä-

cheneigenschaften. Für eine unbehandelte PMMA-Schicht wird ein Kontaktwinkel zu Wasser von $72^\circ \pm 1^\circ$ gemessen. Wirkt ein Luft-Plasma für 2min bzw. 4min bei RT auf die PMMA-Schicht ein, verringert sich der Kontaktwinkel mit der Wirkungsdauer des Plasmas. Die Oberflächenmodifizierung verstärkt die Hydrophilie des PMMA. Allerdings spiegelt die Standardabweichung von 9° des Messwertes nach 4min im Plasma auch die hohe Oberflächenrauigkeit der Probe wider. Die Standardabweichung bei Kontaktwinkelmessungen ist umso geringer, je glatter die Oberfläche ist.

Eine hohe Oberflächenrauigkeit beeinflusst die Erzeugung einer homogenen, stabilen Lipidschicht nachteilig. Von den hydrophilen Oberflächeneigenschaften der PMMA-Schicht lässt sich deshalb nicht direkt auf das Benetzungsverhalten mit Lipid schließen. Die Hydrophilie-Lipophilie-Balance des Trägers bestimmt die Adhäsion und das Selbstorganisationsverhalten des Lipids [277].

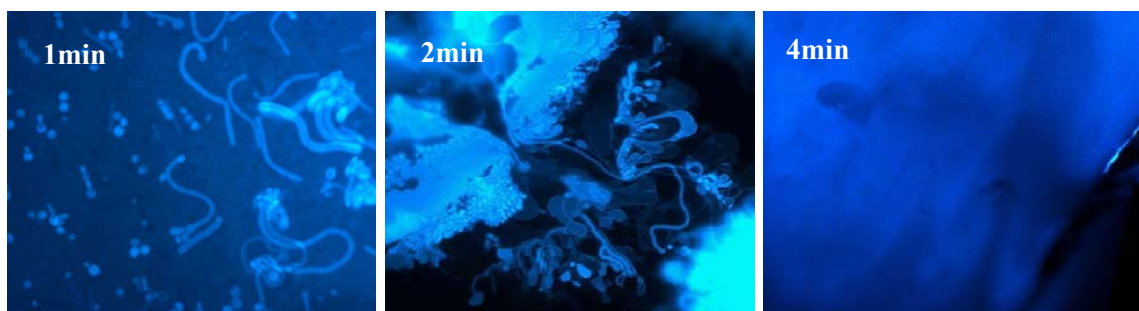


Abb. 59: Fluoreszenzaufnahmen der Lipidschicht in Pufferlösung auf PMMA. Das PMMA wurde jeweils 1min, 2min bzw. 4min einem Luftplasma ausgesetzt (Vergrößerung: 200fach).

Abb. 59 zeigt, wie die Lipidverträglichkeit der modifizierten PMMA-Oberflächen mit der Pinseltechnik und fluoreszenzmarkiertem Lipid in Pufferlösung bestimmt wird. Nach einer Plasmabehandlung von einer Minute zeigen sich bei 200facher Vergrößerung bereits tendenziell größere, fadenförmige Lipid-Vesikel im Vergleich zur unbehandelten PMMA-Oberfläche. Verlängert sich die Plasmabehandlung um eine weitere Minute, sind in der mittleren Fluoreszenzaufnahme bereits größere Bereiche mit einer Lipidschicht überzogen. Bei vier minütiger Plasmabehandlung ist das PMMA-Oberfläche so verändert, dass das Lipid die Oberfläche großflächig bedeckt. Die Intensitätsunterschiede im Fluoreszenzsignal weisen auf unterschiedliche Schichtdicken der Lipidschicht hin. Neben der Schichtdickeninhomogenität weist die Lipidschicht viele kleine Defektstellen und teilweise größere lipidfreie Bereiche, wie in Abb. 59 (rechts) angedeutet, auf. Die Defekthäufigkeit wird durch die Erhöhung der Oberflächenrauigkeit erhöht [174]. Die Ausbildung und die Stabilität der p-LDS werden damit auf der plasmabehandelten Polymermatrix nachteilig beeinflusst.

Eine weitere zeitliche Verlängerung der Plasmabehandlung wird nicht durchgeführt, da der Schichtabtrag der PMMA-Schicht deren Hydrophilisierung überwiegt.

5.3.2 Lipidverträglichkeit von Biopolymeren

Die Suche nach einem geeigneteren Trägermaterial zur Beschichtung der PMMA-Matrix beginnt bei Materialien, die als Trägermedium für Zellen getestet wurden [278]. Vielfach erfolgreich eingesetzt werden sogenannte Biopolymere mit hydrophilen Eigenschaften [279]. Einige ausgewählte hydrophile Biopolymere zeigen hervorragende adhäsive Eigenschaften auf Zellmembranen, insbesondere beim Anwachsen der Zellen an Oberflächen [280, 281]. Neben den als Träger häufig eingesetzten Glasoberflächen weisen hier insbesondere die Biopolymere Agarose und Chitosan (Abb. 60) eine gute Membranverträglichkeit auf [282].

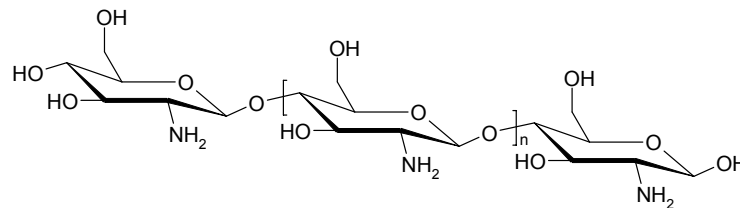


Abb. 60: Strukturformel von Chitosan.

Zur Abschätzung der Lipidverträglichkeit wird die Bestimmung des Kontaktwinkels des Trägers zu einem 20µl-Wassertropfen gemessen. Die Herstellung der modifizierten Trägerschichten erfolgt, indem eine heiße, wässrige Agarose-Lösung bzw. eine essigsaurige Chitosan-Lösung auf einer PMMA-Schicht ohne Mikrostrukturen mittels Spin-coating aufgetragen wird (Anhang 7.7). Die PMMA-Schichten werden vor der Beschichtung mit dem Biopolymer für 1min einem Luftplasma ausgesetzt, um die Haftung der Biopolymerschicht zu gewährleisten.

Für die verschiedenen Trägermaterialien wird ein Vergleich von gequollener zu nicht gequollener, trockener Schicht angestellt (Abb. 61).

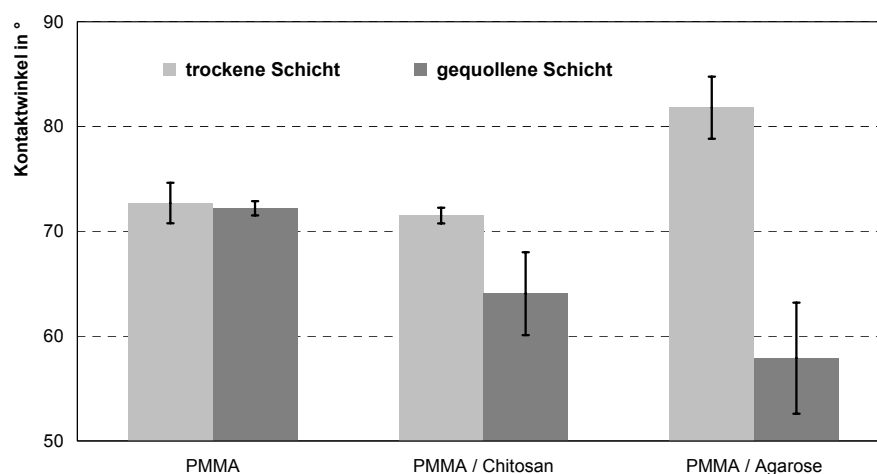


Abb. 61: Kontaktwinkelmessungen mit Standardabweichung auf trockenen bzw. gequollenen Oberflächen.

Für die Biopolymere Agarose und Chitosan gilt, dass die gequollene Oberfläche wesentlich hydrophiler als die getrocknete Schicht ist. Im Vergleich zum PMMA sind die gequollenen

Schichten hydrophiler. Die Verringerung des gemessenen Kontaktwinkels und damit die Erhöhung der Hydrophilie der Oberfläche im Vergleich zur PMMA-Oberfläche ist für agarosebeschichtete Oberflächen größer als für chitosanbeschichtete Oberflächen. Der Kontaktwinkel wird auf gequollenen Agaroseschichten im Mittel mit $58^\circ \pm 6^\circ$ und auf Chitosan mit $63^\circ \pm 3^\circ$ bestimmt. Der geringere Kontaktwinkel ist bei den Agaroseschichten mit einer doppelt so großen Standardabweichung im Vergleich zu den Chitosanschichten verbunden.

Zur Charakterisierung der Lipidverträglichkeit werden die Oberflächen 24h vor dem Lipidauftrag in Ringer-Puffer bei RT vorkonditioniert, so dass ein Quellen der Schichten gewährleistet wird. Der Lipidauftrag erfolgt mittels Pinseltechnik und mit einer Kapillare. Beide Auftragsverfahren führen zu vergleichbaren Ergebnissen.

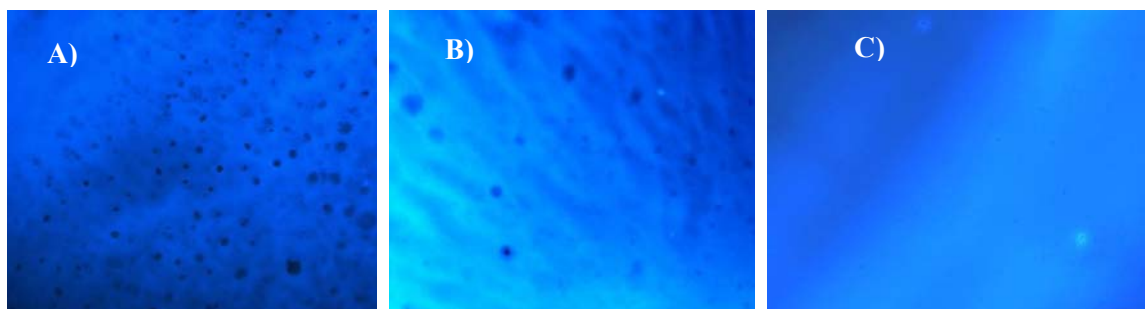


Abb. 62: Fluoreszenzaufnahme von Marina Blue[®]DHPemerktem Lipid auf A) Glas B) Agarose und C) Chitosan mit der Pinseltechnik aufgetragen (Vergrößerung: 200fach).

In Abb. 62 ist zu erkennen, dass sich sowohl auf Glas, Agarose als auch auf Chitosan stabile Lipidschichten erzeugen lassen. Auf den Glas- und Agarose-Oberflächen weist die Lipidschicht Lochdefekte auf und stört die Homogenität der Schichten. Die Agaroseschicht zeigt zusätzlich wellenartige Inhomogenitäten. Ob diese aus Unregelmäßigkeiten der Agarose-Oberfläche herrühren oder auf ungleichmäßige Lipidschichtdicken zurückzuführen ist, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die Chitosan-Oberflächen zeigen hingegen eine vollständige und homogene Bedeckung der gequollenen Oberflächen. Die Lipidverträglichkeit lässt sich daher nicht nur mit der Hydrophilie der Oberfläche erklären.

Die hohe Lipidverträglichkeit des Chitosans wird zum Einen damit erklärt, dass es durch sein Quellvermögen einen sehr hohen Anteil an Oberflächenwasser bindet. Die Grenzfläche zum Lipid liegt gelartig vor. Störungen durch die Oberflächenrauigkeit sind damit wahrscheinlich gering. Zum Anderen besteht eine elektrostatische Wechselwirkung mit dem Lipid. Chitosan besitzt eine primäre Amingruppe pro Untereinheit (Abb. 60), die bereits im schwach sauren pH-Wertbereich protoniert vorliegt. Die Hauptkomponenten der Membranlipide, wie Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin sind Phospholipide. Sie tragen damit mindestens eine negativ geladene Phosphat-Gruppierung an der Kopfgruppe des Lipidmoleküls. Die anziehende Wirkung beider geladener Gruppen trägt offensichtlich zu einer verstärkten Lipidadhäsion bei. Eine Herabsetzung der Membranfluidität und damit die negative Beeinflussung der biomimetischen Eigenschaften von LDS wurde bisher nicht beobachtet [283].

Eine Erweiterung des Schichtaufbaus der Polymermatrix um den Chitosanfilm konnte nur erzielt werden, wenn die Chitosanschicht auf die bereits erzeugte Mikrostruktur mittels Spin-

coating aufgebracht wird. Während der Beschichtung darf keine Chitosan-Lösung in die Poren eindringen, um die Sensitivität im SPR-Imaging nicht zu verringern. Die nachträgliche Beschichtung über das Spin-coating vermindert den Kontrast im SPR-Bild nicht, was darauf schließen lässt, dass mit diesem Verfahren im Gegensatz zum Dippen oder dem Pinselauftrag keine Materialabscheidung in den Poren stattfindet.

Für die weitere Entwicklung am Sensor-Array wird deshalb zur Erhöhung der Lipidverträglichkeit eine Chitosanschicht auf die PMMA-Oberfläche aufgebracht.

5.4 Präparation und Charakterisierung der p-LDS

Das Auftragsverfahren für das Lipid soll gewährleisten, dass kein Lipid in die Mikroporen eingetragen wird. Die Lokalisierung der Lipidschicht in den Poren soll über das gesamte Array annähernd gleich sein. Als optimal stellt sich eine Position am oberen Rand der Mikroporen dar, da durch die Porentiefe ausreichend Raum für hydrophile Proteinbereiche bleibt, die über die LDS hinausragen. Ein Auftragen des Lipids ist aufgrund der Sensorgeometrie nur von einer Seite möglich.

In der Literatur sind für den Lipidauftrag auf festen Trägern folgende Auftragsverfahren beschrieben:

- Streichtechnik

Mit einem Pinsel [247] oder Stäbchen [256] wird das in Lösemittel gelöste Lipid auf dem festen Träger aufgestrichen. Die entstandenen Lipidmultischichten dünnen sich durch das Spritzen des Lipids und die Selbstorganisation auf der Oberfläche zur LDS aus [254]. Die Ergänzung der Methode durch ein Ausfrieren/Auftauen nach dem Lipidauftrag verringert den Lösemittelanteil in den Lipidschichten [284, 285].

- Spin-coaten

Eine Lipidlösung wird auf den Träger aufgetropft. Das Spin-coaten bei geringen Winkelgeschwindigkeiten unterstützt das Spritzen auf dem festen Träger. Die Multischicht wird zur LDS ausgedünnt [263]. Die Lipidschichten sind nicht lösemittelfrei und weisen große Defektdichte auf [286].

- Aufschmelzen von Vesikeln

Lipidvesikel verschiedener Größen lassen sich beispielsweise durch Extrusion [287] oder Ultraschall [288] erzeugen. Auf einer geeigneten Oberfläche fusionieren die Vesikel und bilden Lipidschichten aus. Die Lipidschichten sind als LDS ausgebildet, weisen aber meist Lochdefektstellen auf, an denen kein Vesikel fusionierte [289]. Die Erhöhung der Anzahl der abgeschiedenen Vesikel führt zur Schichtdickeninhomogenität [290].

- Langmuir-Blodgett-Technik (LB-Technik)

Die Technik nutzt den Effekt, dass sich amphiphile Moleküle an einer Grenzschicht Wasser/Luft ausrichten [291, 292]. Der feste Träger wird durch die Grenzschicht geführt, wobei die Amphiphile von der Grenzschicht auf den Träger übertragen werden. Für Lipide lassen sich geordnete Lipidmonolagen übertragen. Die Auftragechnik führt zu lösemittelfreien LDS auf dem Träger. Eine Abwandlung der Technik nutzt die Übertragung einer Monolage Lipid auf den Träger und anschließende Kombination mit der Vesikelaufschmelzung zur Generierung der zweiten Monolage zur LDS [289].

Die Anwendung der beschriebenen Auftragetechniken auf der mikrostrukturierten Sensor-Arrayoberfläche zeigen beispielsweise bei der Streichtechnik, dass sich Poren überspannen lassen, aber in den Poren Lipidvesikel abgeschieden werden. Sowohl im Phasenkontrast-Bild als auch in der Fluoreszenzaufnahme sind die Lipidvesikel am Porengrund deutlich sichtbar. Das Spin-coaten des Lipids führt zum Füllen der Poren mit Lipidlösung am Auftropfort.

Ein Aufschmelzen von Vesikeln auf der mikrostrukturierten Oberfläche erfordert Vesikeldurchmesser, die größer als die Porendurchmesser sind. Es eignen sich nur Riesenvesikel [290, 295], die über den Poren mit dem Träger fusionieren und nicht in die Mikroporen gelangen können. Weil die Herstellung der Riesenvesikel mit einer großen Polydispersion der Vesikelgröße verbunden ist, wurde die Auftragetechnik nicht untersucht, sondern nur zur Vollständigkeit aufgeführt.

Die Untersuchungen zur Eignung der LB-Technik zeigen, dass beim Übertragen der Lipidschichten diese in die Poren gedrückt werden, so dass zwar homogene LDS entstehen, diese aber die Mikroporen auskleiden [293].

Keine der getesteten Auftragetechniken erzeugt eine über den Mikroporen aufgespannte LDS. Insbesondere Vesikel bzw. abgeschiedenes Lipid in den Poren verringern grundsätzlich die SPR-Sensitivität. Deshalb muss eine Auftragetechnik entwickelt werden, die die Nachteile der bisher getesteten Verfahren überwindet.

5.4.1 Aufstempeln der porenüberspannenden Lipiddoppelschicht

Abb. 63 zeigt, wie mit einem Stempel Lipid auf eine mikrostrukturierte Oberfläche übertragen werden kann [294]. Dazu wird Lipid aus einer Lösung aufgenommen. Die Oberfläche des Stempels muss hydrophile Eigenschaften zeigen und ein Lipidreservoir aufweisen.

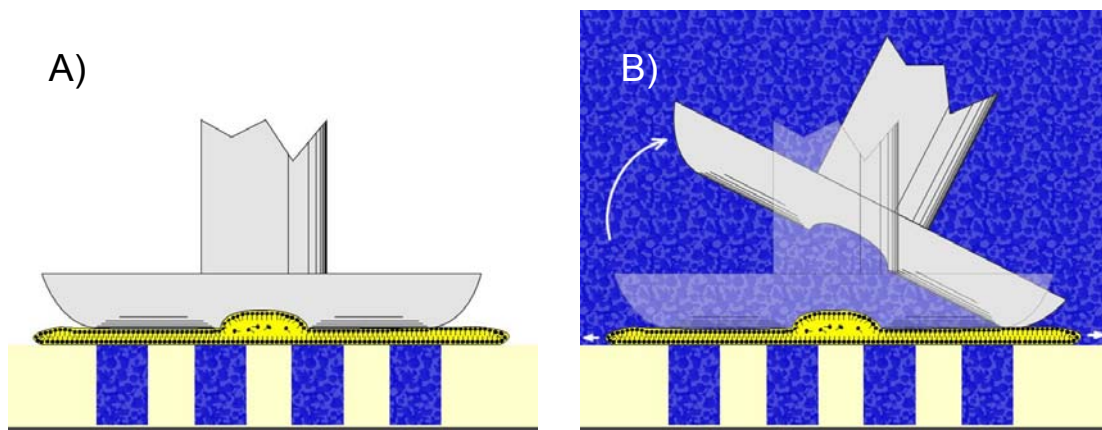


Abb. 63: Aufstempeln der Lipidschicht und Ausdünnen zu einer p-LDS.

Durch die Selbstorganisation des Lipids bildet sich auf der Stempeloberfläche eine geordnete Lipidschicht aus. Die Mikroporen werden mit Pufferlösung gefüllt und der lipidbeladene Stempel auf die ebenfalls hydrophile Sensor-Arrayoberfläche aufgesetzt. Bei aufgesetztem Stempel erfolgt weitere Zugabe von Puffer und schließlich ein Abheben des Stempels. Da die Oberflächenrauigkeit des festen Trägers die Ausbildung der p-LDS empfindlich stört, gleichen Lipidmoleküle aus dem Reservoir diesen Mehrbedarf an Lipidmolekülen aus. Das Abheben des Stempels soll keine Verwirbelungen erzeugen. Ein langsames Abkippen der Stempeloberfläche

führt zu porenüberspannenden Lipidschichten auf dem Sensor-Array. Eine Vorkonditionierung der Trägeroberfläche ist bei der Stempeltechnik nicht notwendig. Eine Übersicht der Ergebnisse für die erzeugten Lipidschichten mit den verschiedenen Auftragsmethoden zeigt Tabelle 8.

Tabelle 8: Vergleich der Auftrage Techniken auf dem mikrostrukturierten Sensor-Array (Kategorien: ++ sehr gut, + gut, - ausreichend, -- schlecht)

Eigenschaft/Verfahren	Aufstreichen	Spin-coating	LB-Transfer	Stempeln
Lipid in den Poren	+	++	++	--
Stabilität	+	--	+	++
homogene Schichtdicke des Lipids	+	+	++	++
Defekthäufigkeit	++	++	--	--
Spritzen nach Auftrag	++	-	--	-
Ausbildung porenüberspannender Lipidschichten	+	-	--	++

Das Lipid porenüberspannend auf dem Sensor-Array aufzubringen ohne die Mikroporen durch Lipideintrag unbrauchbar zu machen, gelingt mit den herkömmlichen Auftragsverfahren nicht. Die entwickelte Stempeltechnik ermöglicht ein Überspannen der Mikroporen maximal über den Bereich der Stempelgröße, der rund $0,5\text{cm}^2$ beträgt.

Das Lipidlösemittel beeinflusst die Ausbildungswahrscheinlichkeit und Qualität der p-LDS. In niedrig viskosen Lösemitteln wie Oktan, Dekan und Chloroform bilden sich auch mit der Stempeltechnik vereinzelte Vesikel beim Abheben des Stempels (Anhang 7.8). Wird dagegen Squalen, eine biologische Vorstufe des Cholesterins, als Lösemittel verwendet, bilden sich p-LDS mit guter Trägerhaftung ohne Vesikelbildung.

Für die weiteren Untersuchungen wird die Lipidlösung in Squalen hergestellt und aufgestempelt.

5.4.2 Nachweis der porenüberspannenden Lipiddoppelschicht

Der Nachweis, dass die Lipidschicht die Mikroporen überspannt, kann nicht über die Markierung des Lipids allein erbracht werden, da die Lipidschicht die Mikroporen auskleiden könnte. Dann wäre kein Detektionsvolumen unter der Lipidschicht vorhanden. Um dies auszuschließen, wird neben der Markierung des Lipids die Markierung des wässrigen Puffers in den Mikroporen vorgenommen. Das Puffermedium über der p-LDS bleibt ohne Fluoreszenzmarker.

Der wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff muss mehrere Anforderungen erfüllen. Zum einen soll er lipidunlöslich sein, um ein Auswaschen durch die Lipidschicht zu vermeiden. Es sollte sich

um ein starkes Fluorophor handeln, da die Schichtdicke der mikrostrukturierten Polymerschicht maximal 400nm beträgt. Die Anregung erfolgt mit einem Schmalbandanregungsfilter für 360nm. Das Fluoreszenzmaximum soll unterscheidbar zum Maximum bei 460nm von Marina Blue[®] DHPE sein. Damit ist eine parallele Messung der Qualität der Lipidschicht und ihrer Position über duale Fluoreszenz-Mikroskopie möglich.

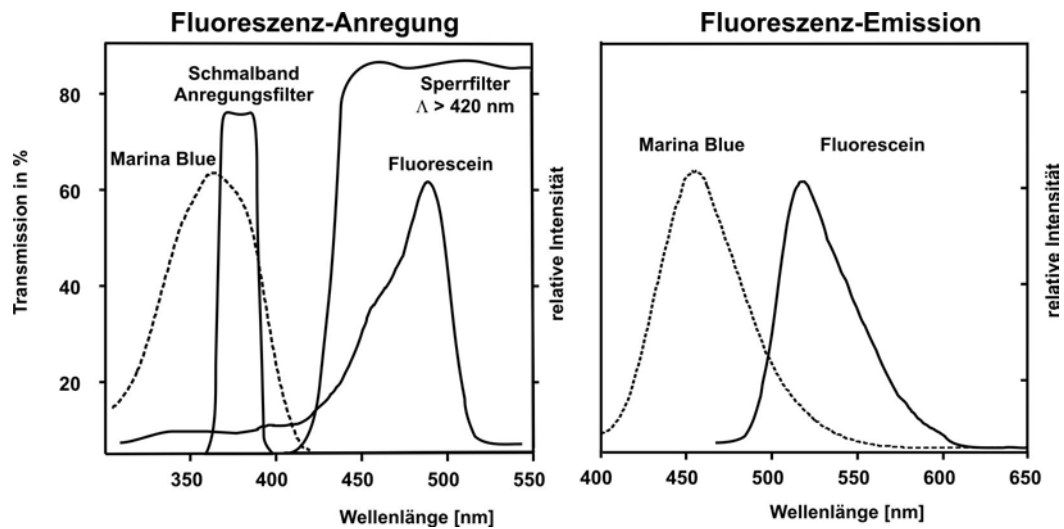


Abb. 64: Auswahl der Fluoreszenzfarbstoffe: (Links) Anregungsspektren und Transmissionsspektren des Anregungsfilters und des Sperrfilters für Wellenlängen kleiner 420nm. (Rechts) Emissionsspektren - Marina Blue[®] DHPE und Fluorescein;

Testmessungen ergeben, dass es sich bei Fluorescein um ein geeignetes Fluorophor handelt. Obwohl das Anregungsspektrum ein Maximum von 496nm zeigt, absorbiert Fluorescein auch im Bereich um 360nm noch ausreichend, um ein detektierbares Fluoreszenzsignal zu liefern (Abb. 64 links). Zusätzlich zu den Anregungsspektren der beiden Fluoreszenzmarker zeigt die Abbildung die Transmissionsspektren der verwendeten Filter im Mikroskop. Das grüne Emissionslicht des Fluoresceins mit einem Maximum von 519nm ist deutlich von der blauen Fluoreszenz des Lipidmarkers zu unterscheiden (Abb. 64 rechts), wobei die Emissionen beider Fluoreszenzmarker den Sperrfilter passieren können.

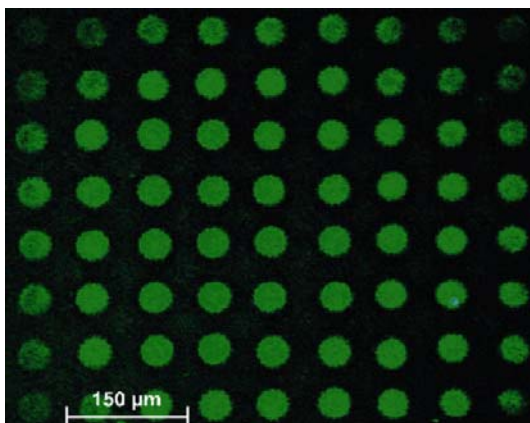


Abb. 65: Fluoresceinmarkierte Pufferlösung in Mikroporen, die mit einer p-LDS verschlossen ist (Anregung 360nm).

Für die experimentellen Untersuchungen wird eine mit Fluorescein markierte Pufferlösung (1 μ g/ml) in die Mikroporen eingespült. Die Lipidschicht wird aufgestempelt, ist jedoch nicht markiert. Danach wird mit einer fluoresceinfreien Pufferlösung gespült, um Markerreste aus der Durchflusszelle zu spülen. Die Fließgeschwindigkeit der Pufferlösung beträgt 3ml/min. Die Fluoreszenzmessung (Abb. 65) erfolgte wenige Sekunden nach dem Aufstempeln des Lipids.

Die Fluoreszenzmessung (Abb. 65) erfolgte wenige Sekunden nach dem Aufstempeln des Lipids.

Schließt das Lipid eine Mikropore vollständig ab, bleibt die Fluoreszenzintensität konstant. Um das Ausbleichen des Fluoresceins zu minimieren, wird der Shutter für jeweils 1ms zur Messung geöffnet. Wird die Mikropore nur zum Teil bzw. gar nicht vom Lipid überspannt, verringert sich die Fluoreszenzintensität bzw. zeigt die Pore kein Signal bei 519nm, da der Fluoreszenzmarker ausgewaschen wird.

Die Quantifizierung der Fluoreszenz-Intensitäten des Fluoresceins ermöglicht, Aussagen darüber zu treffen, ob sich die p-LDS genau auf dem Porenrand oder weiter unten in der Pore befindet. Abb. 65 enthält keinen Hinweis darauf, dass die Überspannung der Poren uneinheitlich stattfindet. Die Mikroporen, die mit geringerer Intensität an den Randbereichen des Bildes auftreten, sind auf die ungleichmäßige Ausleuchtung der Bildfläche zurückzuführen. Mit der Stempelmethode lässt sich damit das Lipid porenüberspannend auf der mikrostrukturierten Sensor-Arrayoberfläche aufbringen. Der fluoreszenzmarkierte Puffer bleibt in den Poren. Ob es sich bei der Lipidschicht um eine p-LDS handelt oder um eine Multischicht, kann mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden.

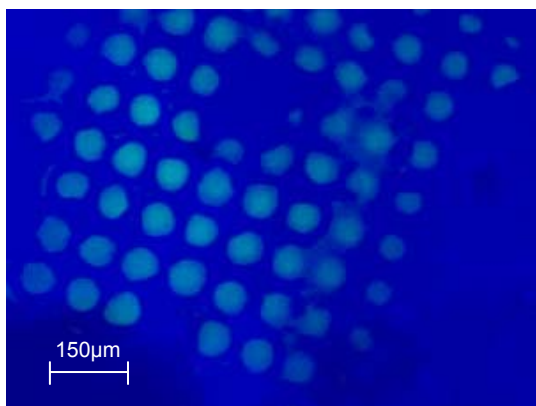


Abb. 66: Fluoreszenzaufnahme mit markiertem Lipid und markiertem Puffer innerhalb der Mikroporen.

Mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Lipid lassen sich nun Aussagen zu Defekten innerhalb der Lipidschicht treffen und Schichtdickenunterschiede des Lipids detektieren. Das vorangegangene Experiment wird nun mit der fluoreszenzmarkierten Lipidlösung (3% Marina Blue[®] DHPE) wiederholt. Abb. 66 zeigt die Fluoreszenzsignale

beider Marker. Die Mikroporen sind unter dem Lipid deutlich sichtbar. Die weitere Auswertung der Fluoreszenzaufnahme mit der Software Analysis (Fa. Soft Imaging System) trennt beide Fluoreszenzsignale. Durch die Wellenlängenseparation wird ein Bild der puffergefüllten Poren und ein weiteres von der Lipidschicht generiert. Das Ergebnis zeigen die Bilder A) und B) in der Abb. 67. Das Bild A) zeigt den Emissionswellenlängenbereich von 500nm bis 530nm. Deutlich sichtbar ist, dass die Poren unterschiedliche Fluoreszenzintensität besitzen. Dies liegt entweder an Defekten in der Lipidschicht oder an einer unterschiedlichen Höhe, in der die Lipidschicht in den Poren aufgespannt ist.

Aus Abb. 67 B), aufgenommen in einem Emissionswellenlängenbereich von 440nm bis 470nm, geht hervor, dass die Mikrostruktur von Lipid bedeckt ist. Zwei größere Defekte sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der linke Lochdefekt führt vorerst nicht zur Öffnung der angrenzenden Mikropore. Im unteren Bildbereich erscheint die Lipidschicht in ihrer Schichtdicke inhomogen. Ein Grund kann das Absetzen des Stempels beim Lipidauftrag sein. Die Fluidität des Lipids wirkt den Schichtdickenunterschieden durch den Prozess des Spritens entgegen.

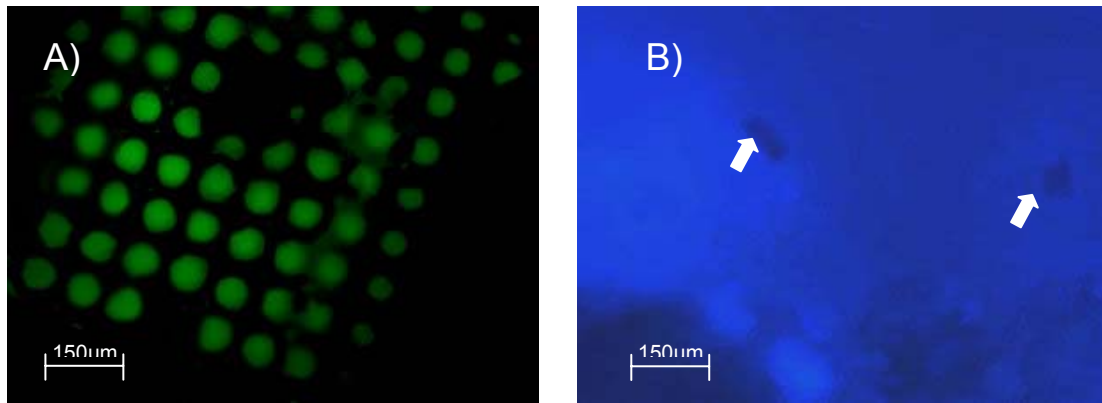


Abb. 67: Fluoreszenzaufnahmen nach Trennung der Fluoreszenzkomponenten: A) Fluorescein-Markierung und B) Markierung mit Marina Blue® DHPE.

Nach einer Minute wird die Probe erneut vermessen. Es sind deutlich weniger Mikroporen sichtbar (Abb. 68). Zudem zeigt sich in der kontrastverstärkten Fluoreszenzaufnahme des Fluoresceins (Abb. 68B), dass markierter Puffer die Poren teilweise verlässt und sich auf der Polymeroberfläche verteilt. Die Lipidschicht scheint in diesen Bereichen nicht mehr fest am Chitosan zu haften. Die ebenfalls kontrastverstärkte Fluoreszenzaufnahme von Marina Blue® DHPE zeigt die Lipidschicht (Abb. 68C), die die Polymermatrix großflächig bedeckt. Wird zukünftig die Adhäsion zwischen dem Lipid und den Polymerstegen verbessert, könnte das teilweise Auslaufen von Lösung aus den Poren reduziert werden.

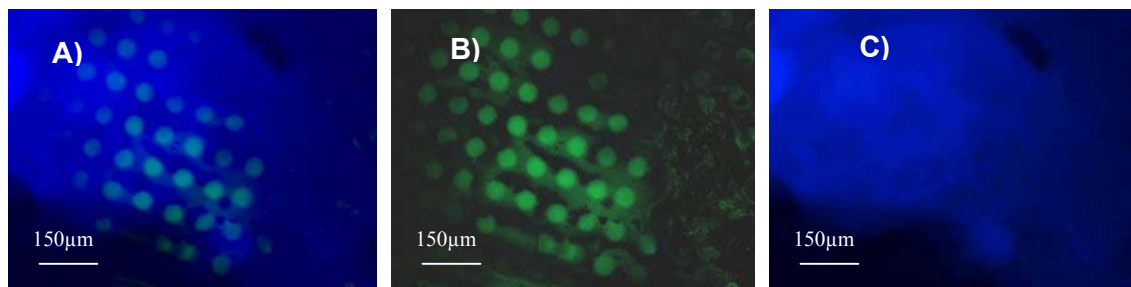


Abb. 68: A) Fluoreszenzaufnahme nach einer Minute Spülen in Ringer-Puffer mit 3ml/min und Bilder nach Trennung beider Fluoreszenzsignale B) Fluorescein-Fluoreszenz und C) Fluoreszenz von Marina Blue® DHPE.

Damit wird gezeigt, dass sich eine porenüberspannende Lipidschicht auf dem Sensor-Array aufbringen lässt.

5.4.3 Haltbarkeit der porenüberspannenden Lipiddoppelschicht

Die Stabilität der p-LDS hängt einerseits von der mechanischen Belastung ab, insbesondere unter Durchflussbedingungen, und andererseits vom Durchmesser der Mikroporen, der vom Lipid überspannt wird. In der Literatur wird für p-LDS ein weiter Bereich der Haltbarkeit angegeben. Mit maximal 18 Stunden Haltbarkeit für Poren mit einem Durchmesser von 10-20nm erweist sich diese Art der LDS als wesentlich robuster als die BLM, die lediglich bis zu einer Stunde haltbar ist [295]. Die Angaben beziehen sich nicht auf Durchflussbedingungen.

Die Stabilität unter Durchflussbedingungen ist eine wichtige Kenngröße der Lipidschicht, da der später integrierte Ionenkanal mit wechselnden Lösungen angeströmt werden soll. Der Transport von Liganden zur Aktivierung des Proteins bzw. deren Abtransport stellen wichtige Funktionsschritte des Sensor-Arrays dar.

Für die Konstruktion der Durchflusszelle ergibt sich, dass eine parallele laminare Anströmung des Sensor-Arrays bei Fließgeschwindigkeiten bis 5ml/min die Lipidschichten auf dem Träger belässt. Wird eine höhere Fließgeschwindigkeit gewählt oder die Sensoroberfläche senkrecht angeströmt, werden die Lipidschichten weggespült. Die Durchflusszelle aus Teflon besitzt ein Zellvolumen von ca. 100 μ l. Sie ist so konstruiert, dass sich der Einlass ins Zellvolumen 1mm oberhalb der Lipidschicht befindet. Der Auslass befindet sich senkrecht an der Oberseite der Durchflusszelle. Das Totvolumen der Zelle wird durch diese Führung der Flüssigkeit gering gehalten. Die Manipulation erfolgt durch eine verschließbare Öffnung an der Oberseite der Zelle.

Die Bestimmung der Haltbarkeit der gestempelten porenüberspannenden Lipidschichten wird an drei Porengrößen durchgeführt. Zu Vergleichszwecken wird die 50%-Stabilität eingeführt. Sie wird als die Zeitdauer definiert, nach der die Fluorescein-Fluoreszenz auf 50% des Ausgangswertes abgesunken ist. Nach dem Aufstempeln des Lipids auf die Sensor-Arrayoberfläche wird der Durchfluss des markerfreien Puffers auf 1ml/min abgesenkt und damit die Tendenz des Lipids, sich vom Chitosan zu lösen.

Abb. 69 zeigt die 50%-Stabilität in Abhängigkeit vom Porendurchmesser. Der Durchmesser der Mikroporen beträgt 50 μ m, 20 μ m und 3 μ m. Der dargestellte Mittelwert bildet sich aus jeweils drei Sensor-Arrays pro Durchmessergröße, die mindestens 25 mit Lipid verschlossene Einzelporen aufweisen.

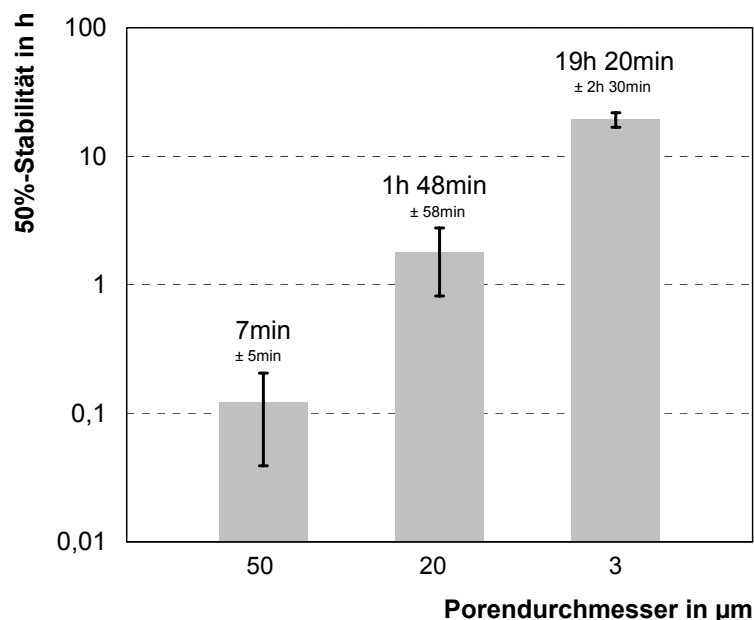


Abb. 69: 50%-Stabilität der p-LDS mit STA in Abhängigkeit vom Porendurchmesser.

Die untersuchten p-LDS zerreißen über einzelnen Poren, bleiben aber in anderen Bereichen stabil und undurchlässig. Der Prozess des Zerreißens wird spontan und in einem einzigen Schritt

beobachtet. Es können vorher keine dynamischen Veränderungen an der porenüberspannenden Lipidschicht, wie ein Ausdünnen, beobachtet werden.

Die 50%-Stabilität enthält neben der eigentlichen Haltbarkeit der Lipidschichten auch Informationen zum Ausbleichverhalten des Markers und zum Auswaschen aus den Mikroporen. Um den Einfluss des Ausbleichens des Fluoreszenzmarkers zu minimieren, wird jede Probe maximal fünf mal für jeweils 1ms belichtet. Die Geschwindigkeit des Auswaschens aus den Poren ist diffusionsbestimmt und verläuft bei einer der Matrixschichtdicke entsprechenden Diffusionsstrecke von rund 400nm aus der Pore heraus innerhalb weniger Mikrosekunden.

Die indirekte Bewertung der Haltbarkeit der p-LDS mit markierter Puffer-Lösung zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom überspannten Porendurchmesser. Poren mit geringerem Durchmesser besitzen eine höhere Haltbarkeit. Wie die Ergebnisse in Abb. 69 zeigen, weisen die gestempelten Lipidschichten auf der mikrostrukturierten Chitosan-Oberfläche eine Haltbarkeit von maximal 22h bei den Poren mit einem Durchmesser von 3µm auf. Haltbarkeit und Ausbildungswahrscheinlichkeit sind gegenüber der BLM wesentlich verbessert.

Zusammenfassend erfolgt die Bewertung der Verschmelzung der biologischen Komponenten von LDS und Ionenkanal mit der Polymermatrix:

- ▷ Die Oberfläche der Polymermatrix muss eine hydrophile Oberfläche aufweisen, die die Ausbildung einer homogenen LDS im Puffermedium gestattet. Die Veränderung der Oberflächeneigenschaften des PMMA erfolgt durch Beschichtung. Als Beschichtungsmaterialien eignen sich gequollene Biopolymerschichten, wie Chitosan. Die Defekthäufigkeit in der auf der Beschichtung gebildeten LDS ist gering und es werden auf der Matrix dicht verschlossenen Mikroporen erwartet.
- ▷ Die Beschichtung der Polymermatrix mit dem Biopolymer Chitosan verläuft ohne Abscheidung in den Mikroporen durch einen optimierten Spin-coating-Prozess.
- ▷ Mit der entwickelten Stempeltechnik lassen sich auf der Multischicht-Matrix porenüberspannende Lipidschichten erzeugen, deren Haltbarkeit bei maximal 22Stunden liegt.
- ▷ Die Integration der Ionenkanäle kann in die bereits aufgespannte Lipidschicht durch die Fusion der p-LDS mit Proteoliposomen erfolgen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Grenzflächen und deren Eigenschaften mit hoher Aufmerksamkeit betrachtet werden müssen. Nicht nur die Hydrophilie, sondern insbesondere die Lipophilie der Stegoberflächen der Matrix und die Porengröße sind Parameter, die die Auswahl des verwendeten Lipids, dessen Auftragsverfahren und die Haltbarkeit der LDS sehr stark beeinflussen. Große Oberflächenrauigkeit der Matrix vergrößert die Defekthäufigkeit in der aufliegenden LDS.

Der gezielte Einbau der Ionenkanäle mit einer bevorzugten Richtung des Proteins durch Proteoliposomenseparation ermöglicht eine Bindung von Liganden am Ionenkanal und damit die Aktivierung des Proteins. Die durch den Ionenkanal hindurchgeströmten Ionen können dann optisch detektiert werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Nutzung biomolekularer Erkennungsmechanismen als analytisches Prinzip verschafft dem Ionenkanalsensor-Array gegenüber herkömmlichen Sensoren außerordentliche Vorteile durch die hohe Sensitivität und Selektivität.

Die Konzeption des Ionenkanalsensor-Arrays orientiert sich an den Anforderungen des nikotinischen Acetylcholin Rezeptors (nAChR) als Ionenkanal, um seine Funktionsfähigkeit zu erhalten. Die Ausarbeitung der Konzeption erfolgt durch Bildung mathematischer Modelle insbesondere zur Aktivierung des ligandgesteuerten Ionenkanals. Im Sensor-Array ist der nAChR in einer Lipiddoppelschicht (LDS) über einer Mikropore mit einem Durchmesser von $3\mu\text{m}$ und einer Höhe von 300nm positioniert.

Die technische Umsetzung des Sensor-Arrays erfolgt unter Auswahl von PMMA als mikrostrukturierbarem Polymer zur Erzeugung der Mikroporen-Matrix. Die Herstellung erfolgt durch Lithographie mit ultravioletter Strahlung an einem Multischichtsystem.

Als maßgebliche Charakterisierungstechniken für die Polymermatrix werden für die physikalischen Eigenschaften das SPR-Imaging, für chemische das FTIR-Imaging und für die topologischen das AFM kombiniert. Es zeigt sich, dass trotz des optimierten Lithographie-Prozesses innerhalb der Mikroporen eine ungleichmäßig verteilte Menge an Rückständen bleibt, die die Sensitivität der optischen Detektion reduziert. Bei der Erzeugung von Poren mit minimaler Rückstandsmenge kommt ein Mehrschichtsystem aus Gold/Agarose/PMMA zum Einsatz. Jede Schicht erfüllt dabei eine wichtige Rolle und ist auf die anderen Schichten abgestimmt. Die Agarose dient im Schichtsystem als Adhäsionsblocker zwischen PMMA und Goldoberfläche.

Die Polymermatrix wird mit dem Biopolymer Chitosan beschichtet. Die gequollene Chitosanschicht dient als Vermittler zwischen künstlicher Polymermatrix und biologischer Funktionseinheit aus nativem Lipid und Ionenkanalprotein. Es erfolgt keine zusätzliche chemische Bindung mit Komponenten der Lipiddoppelschicht (LDS), um die Fluidität der LDS nicht zu vermindern.

Die entwickelte Stempeltechnik als Lipidauftragsverfahren ermöglicht ein porenüberspannendes Verschließen der Mikroporen mit einer LDS. In den Poren wird durch die Stempeltechnik kein Lipid abgeschieden, um die Sensitivität im Ionenkanalsensor-Array nicht zu reduzieren. Das mikroporöse Detektionsvolumen mit Porendurchmessern von $3\mu\text{m}$ bis $50\mu\text{m}$ wird von der LDS dicht abgeschlossen. Mit Hilfe von dualer Fluoreszenzmikroskopie wird der Nachweis erbracht, dass die LDS die Poren überspannt und diese dicht abschließt. In den Mikroporen befindet sich physiologische Lösung, um den nativen Zustand des Ionenkanals zu gewährleisten. Zur Charakterisierung der p-LDS und deren Haltbarkeit wird ein fluoreszenzmikroskopisches Verfahren eingeführt, das unter Durchflussbedingungen zwei verschiedene Marker bei einmaliger Belichtung detektiert. Die gemessene Haltbarkeit der p-LDS beträgt maximal 22 Stunden und entscheidet über die Stabilität des Ionenkanalsensor-Arrays.

Der Einbau des Ionenkanals in die Polymermatrix erfolgt, nachdem die LDS erfolgreich aufgespannt wurde. Der nAChR wird durch Fusion von nativen Proteoliposomen mit der p-LDS im Bereich der Mikroporen integriert. Affinitätschromatographische Trennung der Proteoliposomen mit einer bevorzugten Einbaurichtung des nAChR im Liposom stellt die Voraussetzung dar, um den Einbau der Ionenkanäle richtungsbevorzugt mit der Ligandenbindungsstelle außerhalb der Mikroporen in die p-LDS durchzuführen.

Zur Detektion der Konzentrationsänderung der Metallionen wird ein markierungsfreies Verfahren entwickelt und eingesetzt. Die Detektion der Aktivierung des Ionenkanals erfolgt optisch mittels SPR-Imaging, das hochsensitive, parallele Messungen ohne weitere Markermoleküle gestattet. Die Aktivierung des Kanalproteins wird durch die Bindung zu Liganden ausgelöst. Dann öffnet sich der Ionenkanal und Metallionen strömen in die Mikropore der PMMA-Matrix. Die hierdurch verursachte Konzentrationsänderung bedingt eine Änderung des Dielektrizitätswertes der Lösung in der Mikropore und wird detektiert. Basierend auf dem Prinzip der optischen Messung, werden im Array-Format tausende Aktivierungen parallel ausgelesen. Der Funktionsnachweis des Ionenkanalsensor-Arrays wird am Beispiel von Kalium-Ionen erbracht, die durch den nAChR strömen.

Ein lokales Aufkonzentrieren der durch den Ionenkanal geströmten Metallionen an der mit SA-beschichteten 2-(Benzyl-sulfid)-18-Krone-6 Goldoberfläche des Porengrundes führt zu einer Erhöhung der Sensitivität des Detektionsverfahrens um 20 %. Insbesondere für die Ionenkonzentrationsänderungen im Bereich von Einzelkanalaktivitäten des nAChR wird damit ein Funktionsnachweis möglich. Die Ergebnisse der Messungen besitzen eine sehr hohe biologische Relevanz, da das spezifische Anbinden eines Liganden an den Ionenkanal indirekt und das Ergebnis der daraus resultierenden Aktivierung direkt gezeigt werden.

Im Organismus strömen bei der Aktivierung des Kanalproteins mehrere Ionenarten gleichzeitig durch einen aktivierten Ionenkanal. Durch die Optimierung der SA-Schicht zu Komplexierung der Metallionen in den Mikroporen kann die Frage Beantwortung finden, ob sich die Nachweisgrenze des Sensor-Arrays verringern und gleichzeitig die Ionen-Detektion selektiv gestalten lässt.

Für den Einsatz als Sensor-Array spielt die Stabilität der Lipidschicht eine wichtige Rolle. Zukünftig kann die Stabilität durch membranverträgliche Trägernetze unter der LDS wirkungsvoll erhöht und die Robustheit des Sensor-Arrays damit gesteigert werden. Die Trägernetze für das Lipid werden auf der Sensor-Arrayoberfläche über die Poren gespannt. Anschließend wird die Lipidschicht ohne Verlust der biomimetischen Eigenschaften aufgestempelt. Als Materialien für die stabilisierenden Trägernetze könnten Actin-Fasern [296], Hydrogele [297] oder Bola-Lipide [298] eingesetzt werden.

Eine weitere Strategie zur Stabilisierung der Lipidschicht ist die Quervernetzung, entweder innerhalb der Lipidschicht oder durch Armierungen im wässrigen Medium außerhalb der Lipidschicht. Die Größe der Netzmaschen muss an den Proteindurchmesser des Ionenkanals angepasst werden.

Weiterführende Arbeiten sind zum einen auf die Integration des Ionenkanalsensor-Arrays in ein mikrofluidisches System und die Kopplung mit Analyseautomaten ausgerichtet. Eine Notwen-

digkeit ist hierfür die Entwicklung von robusten automatisierten Auswertroutinen. Der Einsatz in Hochleistungsdurchsatzverfahren wird damit zukünftig möglich sein.

Der Einsatz des Ionenkanalsensor-Arrays orientiert sich an der jeweiligen analytischen Fragestellung und kann vom sogenannten Ligand fishing bis zur technischen Nutzung des intrinsischen Verstärkungsfaktors für den nAChR in einer Größenordnung von 10^6 in biologischen Bauteilen reichen. Die Grundlagenforschung im Bereich der Biomembranen und ihrer Komponenten würde durch den Einsatz des variablen Ionenkanalsensor-Arrays angetrieben, insbesondere bei der Erkennung von biologisch relevanten Membraneigenschaften zur Erstellung einsatzfähiger Membran-Modelle.

Der Preis und die Rentabilität des Sensor-Arrays sind für den Anwender entscheidende Kriterien. Wird zu dem natürlichen Ionenkanal ein synthetischer schaltbarer Kanal eingesetzt, ließe sich das Sensor-Array regenerieren. Dabei darf der synthetische Kanal die Funktionsfähigkeit des natürlichen Kanalproteins nicht beeinträchtigen. Die Ionen strömen dann durch den natürlichen Kanal in die Mikropore ein und können mit Hilfe des synthetischen Kanals wieder ausgeschleust werden.

7 Anhang

7.1 Brechungsindex der Salzlösungen

Tabelle 9: Natrium- und Kaliumchlorid-Lösungen in Reinstwasser (Abbe-Refraktometer); Thermosta-
tierung bei 4°C.

Salz-Lösung	Konzentration [mol/l]	MW _{Brechungsindex}	STA [10 ⁻⁵]
KCl	0,0010344	1,334	3,33
	0,51215	1,3392	8,16
	1,14181	1,3451	7,5
	2,11908	1,3541	2,0
NaCl	0,0011024	1,334	8,37
	0,39789	1,3381	8,37
	0,79567	1,3422	5,0
	1,51	1,3405	4,79
Reinstwasser	0	1,3337	8,86

7.2 Optische Lithographie

Tabelle 10: Parameter für die PMMA-Mikrostrukturierung.

Sub- strat	Gold-Bedampfungsrate	PMMA- Schicht	Strahler	Poren- durch- messer	Belichtungszeit [min] Entwicklungszeit in 1:1 MIBK:ISO
Glas	50 nm (0,05 nm/s)	Spin-coating: 1500U/min, 500U/s ² , 40s	UV, D ₂ -Lampe	<10µm	15 30s
				>10µm	30-60 3min

7.3 Elektronenstrahl-Lithographie

Tabelle 11: Belichtungsparameter der Elektronenstrahlolithographie.

Substrate: SF 6 Prismen (gleichschenkelig)					
Metallschichtpräparation:		Schichtdicke in nm		Aufdampfrate in nm/s	
Gold		50		0,1	
PMMA-Schicht: 800 nm und 300 nm					
Prismenhalter: Aluminium; Substrat ohne zusätzliche Ableitung					
Belichtungsparameter:					
Arbeitsabstand WD = 4 mm; Strukturfeld 400 x 400µm (Vergrößerung 210); Strahlstrom 130,1 µA; Blende 3					
Beschleunigungsspannung	Verweilzeit in ms	Stepsize in µm	Dosen (Schrittweite 0,5-1)	Form	Durchmesser bzw. Kantenlänge der Mikrostrukturen in µm
15	0,005-0,015	0,024	1 bis 3	Rechteck	10x20
15	0,012-0,024	0,024	1 bis 4	Quadrat	40
20	0,005-0,015	0,024	1 bis 4,5	Rechteck	50x75
20	0,005-0,015	0,024	1 bis 20	Quadrat	20
20	0,012-0,024	0,024	1 bis 8	Kreis	30
20	0,012-0,030	0,024	1 bis 4	Kreis	25
30	0,005-0,010	0,037	0,5 bis 2	Rechteck	50x75
30	0,010-0,025	0,030	0,5 bis 3	Quadrat	20
Entwicklung:					
Entwickler	Mischungsverhältnis	Entwicklungszeit in s	Stoppen	Trocknen	
MIBK:ISO	1:3	30	ISO	Trockenblasen mit N ₂	
Nachentwicklung:					
MIBK:ISO	1:1	120	ISO	Trockenblasen mit N ₂	
Nachentwicklung 2:					
MIBK:ISO	1:1	180	ISO	Trockenblasen mit N ₂	

7.4 Ionenstrahl-Ätzen

Tabelle 12: Ionenstrahl-Ätzen mit unterschiedlicher Beschleunigungsspannung und Dosis.

Substrate: BK 7 Prismen (gleichschenkl.)				
Metallschichtpräparation:		Schichtdicke in nm		Aufdampfrate in nm/s
Silber		45		0,1
PMMA-Schicht: 800 nm				
Ag-Implantation				
Proben- Nr.	Beschleunigungsspannung in keV		Dosis in Ionen/cm ²	
1	30		5x10 ¹⁶	
2	50		5x10 ¹⁶	
3	70		5x10 ¹⁶	
4	30		5x10 ¹⁷	
5	50		5x10 ¹⁷	
6	70		5x10 ¹⁷	
Entwicklung:				
Entwickler	Mischungsverhältnis	Entwicklungszeit in s	Stoppen	Trocknen
MIBK:ISO	1:1	300	ISO	Trocknenblasen mit N ₂

7.5 Clusteranalyse des FTIR-Bildes im Porenbereich der PMMA-Matrix

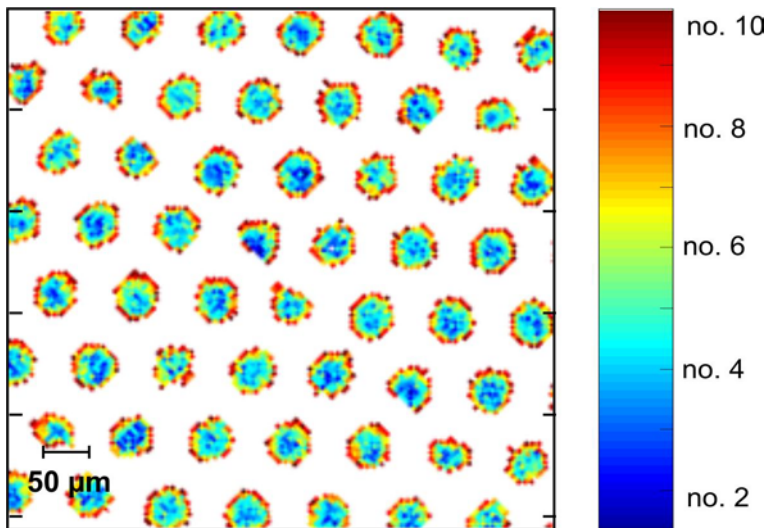


Abb. 70: Darstellung der Clusterkarte. Nummerierung der Zentroid-Spektren nach Clusteranalyse mit 10 Clustern im Bereich der Poren erfolgt entsprechend der E_R -Wertmaximum. No. 1 bezeichnet Cluster mit geringstem E_R -Wertmaximum.

7.6 Adhäsionsblockerschichten

Tabelle 13: Präparation der PMMA-Schichten mit Adhäsionsblocker.

Substrat: SF 10 Prismen (60°) 50 nm Gold-Schicht aufgedampft (0,05 nm/s bei 40°C)				
Adhäsions-Blockerschichten:				
Verbindung	Lösung w/V % im LSM	Spin-coating w in U/min / a in U/s ² / t in s	Temperung in °C / t in h	Reflektometrische Schichtdicke in nm
Polyethylenglycol	-	1000/500/40	-	< Nachweisgrenze
Glycerin	-	1000/500/40	-	< Nachweisgrenze
Dextran	1 % in Wasser	1000/500/40	120/2	~110
Agarose	1 % in Wasser	3000/500/40	120/3	~130
PMMA-Schicht:				
PMMA 950 K	2,5 % in Chlor- benzol	1500/500/40	120/2	~300

Die zweistufige Entwicklung wird in der Reihenfolge I, II durchgeführt. Zwischen den Stufen wird die Matrix mit N₂ trockengeblasen.

Tabelle 14: Entwicklung der Adhäsionsblockerschicht.

Verbindung	Entwicklung I in MIBK:ISO 1:1 in min; 20 s Spülen in ISO	Entwicklungszeit II in Reinstwasser (T in °C)	Temperung in °C / t in h
Polyethylenglycol	3	24 h (RT)	120/2
Dextran	3	30 s bis 3 min (RT)	120/2
Glycerol	3	24 h (RT)	120/2
Agarose	3	3 h (100°C)	120/2

7.7 Präparation der Biopolymerschichten

Tabelle 15: Beschichtung der PMMA-Sensor-Arrayoberfläche mit Agarose und Chitosan zur Erhöhung der Lipidverträglichkeit.

Biopolymer	Agarose	Chitosan
Konzentration:	1% in Wasser (90°C)	3% w/w in Essigsäure 1%v/v
Spin-coating:	1500U/min, 500U/s ² , 40s	
Vorkonditionierung:	Trocknen: 1h bei 100°C	Trocknen 1h bei 100°C, 24h in Phosphatpuffer pH=8, Spülen mit Reinstwasser
Aufbewahrung	Reinstwasser oder Trocken im Exikkator über Kieselgel	

7.8 Lipidpräparation

Tabelle 16: Bildung von p-LDS und Vesikelbildung
(Kategorien: ++ sehr häufig, + häufig, - kaum, -- nicht beobachtet).

Zusammensetzung:	Aufstreichen		Stempeln	
	Bildung einer p-LDS	Vesikelbildung	Bildung einer p-LDS	Vesikelbildung
Oktan	--	++	+	+
Dekan	+	++	++	-
Chloroform	--	++	++	+
Squalen	+	+	++	--

7.9 Restmaterial in den Mikroporen

Anhand der Verteilung der Weisswerte im SPR-Bild kann innerhalb der Mikroporen eine Aussage zu Rückständen am Porenboden und daraus resultierend zur Sensitivität der jeweiligen Pore bei der SPR-Messung getroffen werden. Nicht dargestellt sind Werte ab 250, die der PMMA-Phase zugeordnet werden.

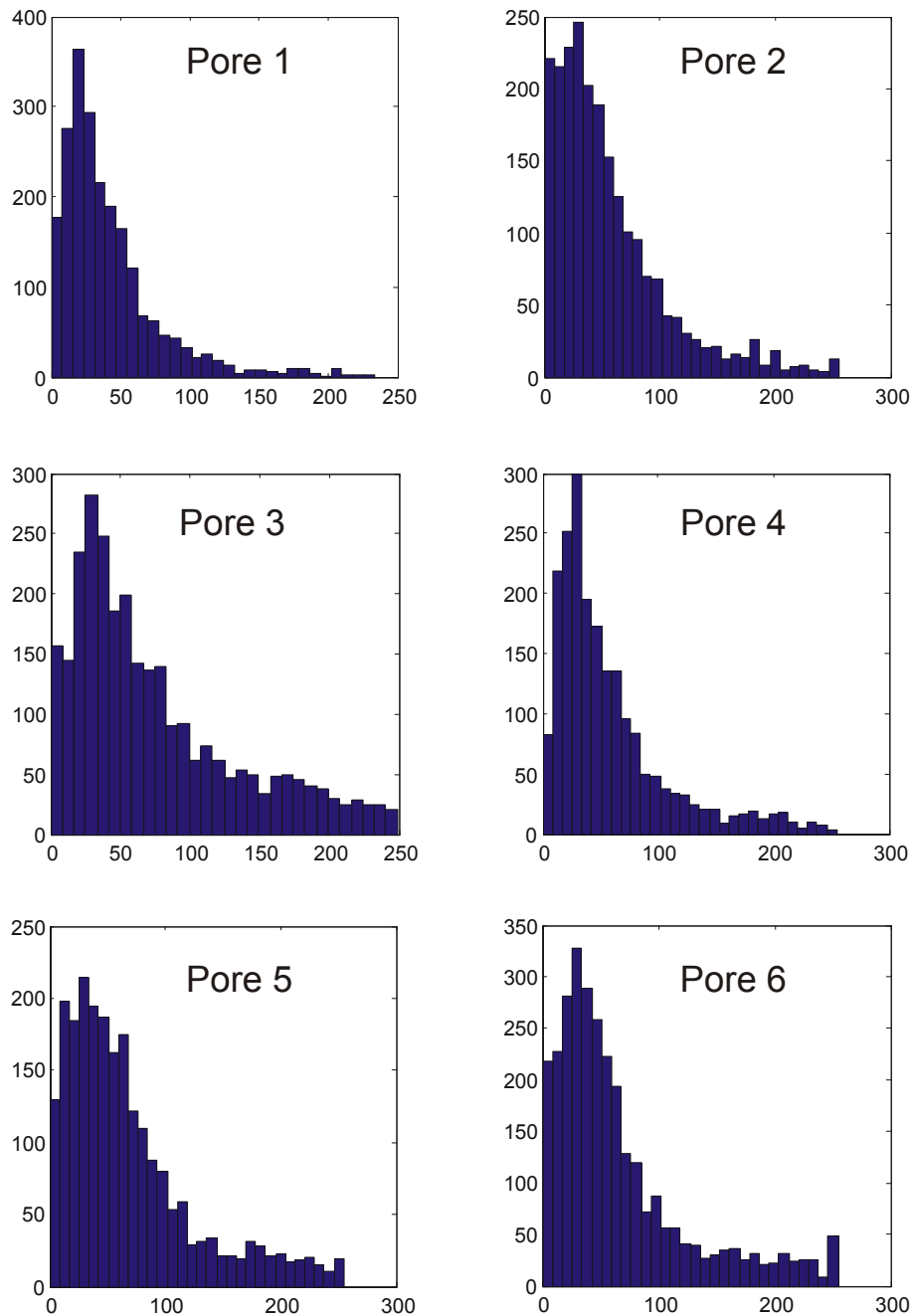


Abb. 71: Histogramme der ausgewählten Porenbereiche für die Poren 1 bis 6

7.10 Adsorption der 2-(Benzylsulfid)-18-Krone-6 auf Gold

Zur Adsorption in der PMMA-Mikrostruktur wird kein Ethanol als Lösemittel verwendet, da bei den relativ langen Adsorptionszeiten, die die Bildung der SA-Schicht benötigt, die Mikrostruktur nicht stabil ist. Es kommt zu partiellen Ablöseprozessen des PMMA. Der Test verschiedener unpolarer Lösemittel ergab, dass Oktan die PMMA-Schicht nicht destabilisiert. SA-Schichten werden erfolgreich in den Mikroporen adsorbiert.

Die Zeitdauer für die Bildung der SA-Schichten umfasst einen sehr weiten Bereich. Neben dem Adsorptionsprozess findet noch ein sehr viel langsames Umordnen innerhalb der adsorbierten Schichten statt. Diese spielt jedoch in der vorliegenden Arbeit keine Rolle, da keine dichtgepackten, homogenen Schichten erzeugt werden müssen. Die Adsorptionszeiten werden so gewählt, dass Schichten adsorbiert werden unter minimaler Verweilzeit in der Adsorptionslösung.

Die Adsorption erfolgt für 24h aus einer Thiol-Lösung mit der Konzentration von 1mM in wasserfreiem Ethanol bei RT. Veränderte Adsorptionsbedingungen werden explizit angegeben. Die Thiol-Lösung wird bei RT in einem Teflongefäß über die Probe gepumpt (1ml/min).

Tabelle 17: Dauer der Adsorption in 1mM S-funktionalisierter Kronenether-Lösung in Ethanol, bis deutlich messbare IRRAS-Intensitäten im Bereich der CH-Valenzschwingen für den Aromatenrest bzw. der CH₂-Gruppen detektiert werden können.

Temperatur in °C	Adsorptionszeit in h
4	120
20	24
30	24
50	keine Adsorption beobachtet

Nach der Adsorption werden die Proben 2mal mit Ethanol abgespült und anschließend mit Stickstoff getrocknet. Ein Spülen mit Wasser ist nicht geeignet, da auch der S-funktionalisierte Kronenether nur sehr schlecht in Wasser löslich ist. Erfolgreiche Adsorption wird anhand der Spektren mit FT-IRRAS auf der Goldoberfläche angezeigt. Bei niedriger Temperatur verlängert sich der Adsorptionsprozess (Tabelle 17). Da der S-funktionalisierte Kronenethers oxidationsempfindlich ist, wird bei RT möglichst kurz adsorbiert.

8 Material und Methoden

8.1 Chemikalien

2-Aminoethanol	z.A.	Sigma Aldrich
Agarose	Elektrophorese, Geliertemperatur: 40-43°C	Fluka
BEE	2-Butoxy-2-Ethoxyethanol	Sigma Aldrich
Benzylchlorid	z.A.	Merck
CaCl ₂	z.A.	Merck
Cellusolve	2-Ethoxy-Ethanol	Fluka
Chitosan	2-Amino-2-deoxy-(1->4)- β -D-glucopyranan bzw. Poly-(1,4- β -D-glucopyranosamin), M _R ~ 400 000 g/mol; mittelmol.	Fluka
Chlorbenzol	z.A.	Fluka
Chloroform	z.A.	Merck
Dextran	aus <i>Leuconostoc</i> spp., M _R ~ 71 400 g/mol	Sigma Aldrich
Ethanol	z.A.	Merck
Ethylacetat	reinst	Merck
Ethylenchlorid	z.A.	Merck
Fluorescein-Natrium	z.A.	Merck
Glycerol	z. A.	Fluka
Gold	Feingold, 20g	Merck
ISO	Isoopropanol, z.A	Fluka
KCl	z.A.	Merck
Lipoid S75	z.A.	Lipoid
Lösemittel	MIBK, MEK, Methanol, Ethanol, ISO, Cellosolve, BEE, Morpholin, 2-Aminoethanol, Chlorbenzen alle z. A.	Merck
Marina Blue® DHPE	1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3- Phosphoethanolamin	Molecular Probes
MEK	Methylethylketon, z.A.	Fluka
Methanol	z.A.	Fluka
Methylenchlorid	z.A.	Merck
MgCl ₂	z.A.	Merck
MIBK	Methylisobutylketon, z.A.	Fluka
Morpholin	z.A.	Fluka
Na	reinst	Merck
NaCl	z.A.	Merck
NaH	z.A.	Merck
NaH ₂ PO ₄	z.A.	Merck
NaOH	z.A.	Merck
n-Dekan	z.A.	Merck
PMMA 50 K	4 % in Chlorbenzol	Allresist

PMMA 950 K	2,5%, 5 % und 9% in Chlorbenzol	Allresist
Polyethylenglycol	$M_R \sim 400$ g/mol	Fluka
Silber	100g	Merck
Squalen	z.A.	Merck
Tetraethylglycolditosilat	z.A.	Merck
THF	Tetrahydrofuran, z. A.	Merck
Thioglycerol	z.A.	Merck

8.2 Puffer-Systeme

System	Zusammensetzung	Konzentration [mM]
Phosphat-Puffer (Sörensen)	KH_2PO_4 : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,58M:2mM auf pH-Wert 8,0
Ringer-Puffer	NaCl : KCl : CaCl_2 : MgCl_2 : NaH_2PO_4	375:7,5:4,5:3:7,5 mit 1M NaOH auf pH-Wert 7,0 eingestellt

8.3 Substrate

Material	Form	Brechungsindex n (633 nm) nach [299]
SF6	Halbzylinderdurchmesser 1cm x 3cm Zylinderlänge Prisma, 90° gleichschenkl., 1 cm ²	1,7988
BK7	Prisma, 90° gleichschenkl., 1 cm ²	1,5151
SF10	Prisma, 60° gleichseitig, 1 cm ²	1,7231
Saphir	Halbzylinderdurchmesser 1cm x 3cm Zylinderlänge	1,7304

8.4 Präparation des Sensor-Arrays

8.4.1 Reinigung der Glas-Träger

Die Glas-träger werden im Ultraschallbad für 5min bei maximaler Leistung gereinigt und anschließend in Ethanol und mit Reinstwasser gespült. Alte Metall- und Lackschichten werden mit Piranha-Lösung (H_2SO_4 : H_2O_2 , 3:1) abgeätzt. Spülen mit Reinstwasser schließt sich an.

8.4.2 Aufdampfen von Metallschichten

Die Beschichtung der Substrate mit Metallen erfolgte in einer Bedampfungsanlage (Eigenbau am Institut) mit elektrothermischer Metaldampferzeugung. Das Substrat wird zu Beginn auf 200°C aufgeheizt, um adsorbierte Oberflächenverbindungen zu entfernen. Erst nach Abkühlen des Substrates auf 40°C wird mit der Metallschichtabscheidung begonnen. Der Druck zur Beschichtung liegt im Bereich von 10^{-6} Torr. Die abgeschiedene Schichtdicke wird permanent über einen Schwingquarz bestimmt. Bei den Beschichtungen der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine Aufdampfrate von 0,5 bis 0,8kÅ/s als optimal zur Erzeugung möglichst homogener Schichten mit gleichmäßiger Metall-Clustergrößenverteilung.

8.4.3 Reflektometrische Schichtdickenmessung und Spin-coating-Verfahren

Reflektometer FTPadvanced [Sentech, Deutschland]

Software: ThicknessMeasurement [Sentech, Deutschland]

Zur kontaktlosen Schichtdickenbestimmung transparenter bzw. semitransparenter Schichten wird das Reflexionsspektrum im Wellenlängenbereich von 400nm bis 920nm aufgezeichnet. Zur Berechnung wird ein Mehrschichtsystem der Materialien: Glas/Gold/PMMA vorgegeben. Die Berechnung erfolgt automatisch über die Levenberg-Marquardt-Methode. Der Brechungsindex von PMMA wurde zuvor ellipsometrisch ermittelt und beträgt 1,492 bei 632,8nm.

Spin-coater RC5 [Karl Suss, Frankreich]

Die Beschichtung der Substrate erfolgt durch das Spin-coating-Verfahren. Die Präparation erfolgte bei konstanter Beschleunigung von 500U/min/s und einer Spindauer von 40s. Nach der Beschichtung werden die PMMA-Filme bei 180°C getempert, um Filmspannungen zu verringern.

8.4.4 Mikrostrukturierung der PMMA-Schichten

8.4.4.1 Optische Lithographie

Deuterium-Halogen Strahler [Top Sensor Systems, Germany], 100W

Hg-Lampe und Xe-Lampe [Optocon Oceans Optics, Germany]

UV-durchlässige Quarzfaser [Optocon Oceans Optics, Germany]

Belichtungsapparat (Eigenbau): Im Kontaktmodus wird ein TEM-Netz auf der Probe platziert und mit einer Lochblende fixiert. Die Faser wird senkrecht auf die Lochblende (d= 0,25mm, Lochdurchmesser 2mm) aufgesetzt. Zur Homogenisierung der Strahlintensität wird die licht-sensitive Schicht über eine gekoppelte fünfadrig UV-durchlässige Faser (je 400 µm) belichtet.

8.4.4.2 Elektronenstrahl-Lithographie

LEO Gemini DSM 982 [Zeiss, Germany] mit Lithographieeinheit ELPHY [Raith, Germany]

8.4.4.3 Ionenstrahl-Lithographie

3-MV-Tandetron (Hochstromversion) [High Voltage Engineering Europa Amersfoort, Niederlande] mit Cs-Sputterquelle 860-C [HVEE Amersfoort, Niederlande], Germanium-Maske mit variabler Porengröße von 5-150µm

8.4.5 Plasma-Ätzen, Hydrophilisierung der PMMA-Oberfläche

Plasma cleaner/sterilizer PDC-32G [HARRICK, U.K.]

Drehschieber-Vakuumpumpe Typ RZ 2 [Vacuubrand GmbH, Germany]

Die belichteten und entwickelten Proben werden einem Sauerstoff- bzw. Luftplasma für unterschiedliche Zeiten (1min bis 10min) bei maximaler Geräteleistung (high) ausgesetzt und anschließend sofort charakterisiert. Die Proben werden zentral innerhalb der Hochfrequenzspule

des Plasma-Cleaners platziert. Die Evakuierung der Probenkammer erfolgte mit einer Vakuumpumpe bei einem Druck von $4 \cdot 10^{-4}$ mbar.

8.5 Mikroskopische Verfahren

8.5.1 Auflicht-und Fluoreszenz-Mikroskopie

Inverses Mikroskop IX 70 [Olympus, Deutschland]

Objektive: LC PlanFL 60x/ 0.70 Ph2; C PlanFL10x/ 0.30 PhC; Uplan 4x/ 0.13;
LC Ach40x/ 0.55 Ph2; CAP-G 0.5±0.5

Hg-Dampfbrenner: U-LH 100HG, Fluoreszenzfilter: U-MNU-2 (Anregung 360-370nm, Emission: BA 420nm)

Software: Analysis [Soft Imaging System GmbH]

Fluoreszenzmarker: Marina Blue[®] DHPE [Molecular Probes, Germany]

Fluorescein [Merck, Deutschland]

Lipidmischung: 1,5mg Lipoid S75, 0,22mg Cholesterin und 3% Marina Blue[®] DHPE in 100µl Lösemittel (Dekan, Chloroform, Squalen [Merck, Deutschland])

8.5.2 Elektronenraster-Mikroskopie

LEO Gemini DSM 982 [Zeiss, Deutschland]

8.5.3 Atomfeldkraft-Mikroskopie (AFM):

DME Dual Scope Microscope Rasterscope C-21, Software: DualScope(tm)/Rasterscope(tm) SPM [DME-Danish Micro Engineering A/S, Deutschland]

Kontaktlos, Force: 0,16nN, Speed: 25µm/s

8.6 Spektroskopische Verfahren

8.6.1 FTIR-Imaging

Die Referenzierung der Proben erfolgt anhand der reinen Goldschicht auf dem Glassubstrat. Die frisch bedampfte Goldschicht weist eine hohe Oberflächenreaktivität auf und kann deshalb in der Zeit, die für den lithographischen Prozess notwendig ist oder die für die Messung benötigt wird, verschiedenste Verbindungen aus der Umgebung adsorbieren. Bei den Untersuchungen werden die Referenzproben deshalb bis zur Messung unter Argon gelagert.

IR-Mikroskop IR-Scope II; FPA-Detektor 64x64 [Bruker Hyperion]

Messparameter:

Apertur: 12 mm

Meßkanal: IRSCOPE, Reflexion, Background: reine Goldoberfläche

Scannergeschwindigkeit:	variabel
Scans:	21
Auflösung:	4 l/cm
Acquisition Mode:	Single Side
Apodizationsfunktion	Blackmann-Harris 3-Term
Phasenauflösung:	16
Phasenkorrektion	Mertz / No Peak Search
Zero Filling Factor	1
High Frequency Limit	3900
Low Frequency Limit	0

8.6.2 SPR-Spektroskopie

Laserdiode	ACM03/1751 [Power Technologies Inc.], USA, Wellenlänge 353nm,
Substrat	Halbzylinder Saphir [Schott AG, Germany], Teflon-Durchflusszelle Eigenbau mit quadratischem Probenraum ($V=1\text{ml}^3$) und senkrechter Anströmung der Probenoberfläche,
Schlauchpumpe	MC-MS CA4/6 [Ismatec Labortechnik Analytik, Schweiz], Fließgeschwindigkeit 2ml/min
Kamera	Panasonic GP MF 622 (Bildaufnahmeelement: 782(H)x582(V) Pixel, Bildgröße: 7,95(H)x6,45(V)mm),
Software	Kappa ImageBase Control [Kappa opto-electronics GmbH, Germany] und Matlab 6.0

8.6.3 SPR-Imaging

Laser	He-Ne LKG 7653-8 [Lasos Lasertechnik GmbH, Germany], Ausgangsleistung 25mW, Wellenlänge 632,8nm,
Substrat	Glasprismen [Schott AG, Germany],
Schlauchpumpe	MC-MS CA4/6, s.o. (Fließgeschwindigkeit 0,1-5ml/min)
Kamera	Panasonic GP MF 622, s.o.,
Software	Kappa ImageBase Control, s.o. und Matlab 6.0

Durchflusszelle mit zylindrischem Probenraum ($V=0,5\text{ ml}^3$) Eigenbau mit paralleler Anströmung der Probenoberfläche,

Die Aufnahme der SPR-Bilder erfolgte bei einem Einstrahlwinkel des Lichtes, der den maximalen Kontrast zwischen Polymerschicht und den mit Reinstwasser gefüllten Poren aufweist. Die Referenzierung erfolgte durch Differenzbildung der Einzelbilder, mit s- und p-polarisiertem Licht aufgenommen.

Tabelle 18: SPR-Methode und Substrate

Probe:	Methode	Prismenmaterial
Wasser- bzw. wässrige Salz-oder Pufferlösungen	SPR-Imaging	SF10
Wasser- bzw. wässrige Salz-oder Pufferlösungen	SPR-Spektroskopie	SF6 (Saphir)
Luft	SPR-Imaging	BK7
PMMA	SPR-Imaging	BK7
Adsorbierte Kronenether	SPR-Spektroskopie SPR-Imaging	SF6 (Saphir)
Komplexierung durch adsorbierte Kronenether	SPR-Spektroskopie SPR-Imaging	SF6 (Saphir)

8.7 Kontaktwinkelmessung

Tropfenkonturanalyse-System DSA 10/DO 3020 [Krüss, Germany]

Die Bestimmung des punktuellen Benetzungsverhaltens an Festkörperoberflächen erfolgt im sessile-Drop-Modus. Abgesetzt werden jeweils $10 \times 20 \mu\text{l}$ -Tropfen an verschiedenen Stellen der Oberfläche. Die Winkelbestimmung pro Tropfen erfolgt dreifach.

8.8 Synthese von 2-(Mercaptomethyl)-18-Krone-6

S-Benzyliertes Diol

Ausgangsmaterial ist das kommerziell erhältliche Thioglycerol, das mit Benzylchlorid zum entsprechenden S-Benzylierten Diol umgesetzt wird.

Zu einer 0,165mol (6,94g) NaOH Lösung in 95%-igem Ethanol wird unter N_2 -Spülung erst 0,144mol (12ml) Thioglycerol und anschließend 0,144mol (16,6ml) Benzylchlorid zugegeben. Es wird 4h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird im Vakuum aufkonzentriert. Die Reaktionsmischung wird mit 50ml Wasser verdünnt und 3 mal mit je 50ml Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase über MgSO_4 getrocknet, wird im Vakuum erneut aufkonzentriert und dann in der Kugelrohrdestille getrennt (162°C bei 1,1Torr). Es werden 22g (Ausbeute: 80%) des farblosen Öls erhalten.

Benzyl-Thiolariat-Ether

Im zweiten Reaktionsschritt wird der Thiolariat-Ether durch Cyclisierungsreaktion des S-Benzylierten Diols mit Tetraethylenglycolditosylat umgesetzt. Das Produkt ist der Benzyl-Thiolariat-Ether.

Bei Raumtemperatur werden 9,67g (16,8mmol) Tetraethylenglycolditosylat (95%, getrocknet) in getrocknetem THF (25ml) unter Argon gelöst. Dazu werden 3,05g (15,4mmol) des S-Benzylierten Diols und in ca. 45ml getrocknetem THF gelöste 1,64g NaH (55% in Öl, 37,5mmol) gelöst. Die Mischung wird 15h unter Rückfluss erhitzt und anschließend im Vakuum eingengt. Mit 20ml Wasser wird der Rückstand verdünnt und $3 \times$ mit je 20ml Ethylenchlorid

rid extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeengt. Aufreinigung des Rohproduktes erfolgt über Kieselgel-Säulenchromatographie (Eluent: Ethylacetat). Das Produkt, ein farbloses Öl, wird mit einer Ausbeute von 60% erhalten.

IR: 3060, 3028, 2868, 1690, 1496, 1454, 1352, 1296, 1248, 1128, 992, 948, 848, 768, 702 cm^{-1}

$^1\text{H NMR}$: $\delta = 2,57$ (2H, d, $J = 5,8$ Hz), 3,57-3,78 (23H, m), 3,76 (2H, s, SCH_2Ar), 7,20-7,33 (5H, m), (200 MHz; CDCl_3)

MS: m/z 400,2 (berechnete molare Masse: 400,19 g/mol)

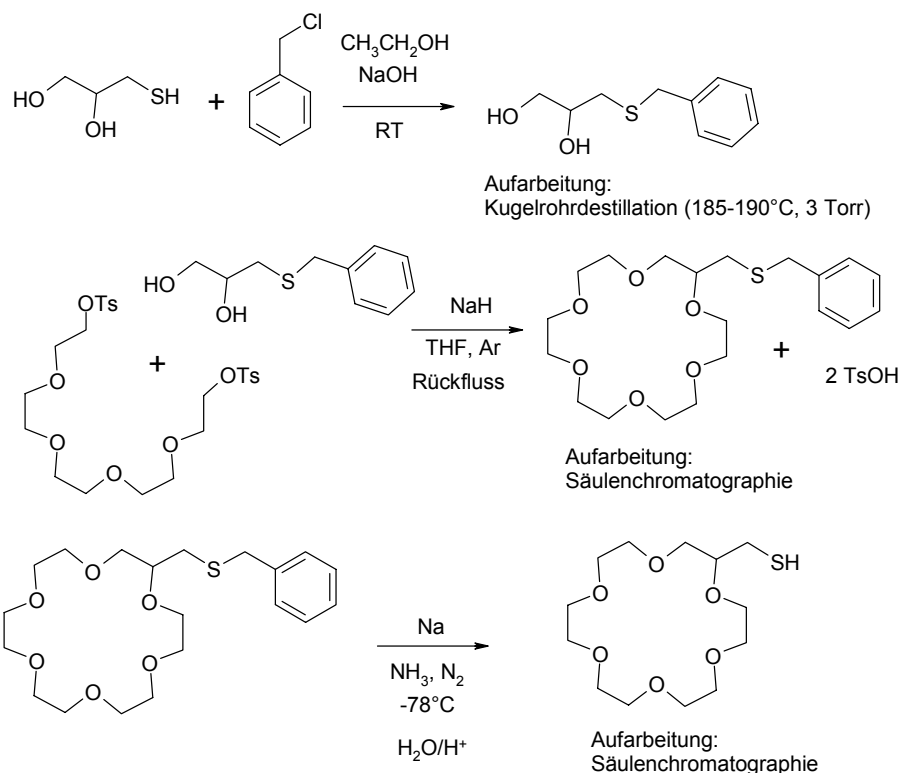


Abb. 72: Reaktionsschema mit Produktaufarbeitung:

2-(Mercaptomethyl)-18-Krone-6

Im letzten Schritt wird die Benzyl-Gruppe vom Benzyl-Thiolariat-Ether mittels Na in flüssigem Ammoniak abgespalten.

In einem Dreihalskolben werden 187mg (0,467mmol) in ca. 1ml Butanol gelöst. Bei Kühlung auf -78°C (Trockeneis) werden zu der Lösung 50ml NH_3 kondensiert. Bei dieser Temperatur wird, nachdem eine klare Lösung erhalten wurde, 370mg (16mmol) Na zugegeben. Die blaue Reaktionslösung wird eine halbe Stunde unter N_2 gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wird Ammoniumchlorid zugegeben. Überschüssiger Ammoniak wird mit N_2 ausgetrieben. Der Rückstand wird mit 10ml konzentrierter Salzsäure angesäuert und 3× mit je 20ml Methylchlorid und 10× mit je 10ml extrahiert. Das im Vakuum aufkonzentrierte Rohprodukt wird an Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Eluent: Methylchlorid/Methanol 10:1 v/v) und ergibt bei einer Ausbeute von 60% 83mg des gelben Öls als Produkt.

IR: 2866, 2554 (SH), 2360, 2342, 2240, 1964, 1727, 1644, 1470, 1454, 1352, 1296, 1249, 1110, 988, 948, 848, 841, 732 cm^{-1}

^1H NMR: $\delta = 1,56$ (1H, t, $J = 8,3$ Hz), 2,61-2,79 (2H, m), 3,56-3,78 (23H, m), (200 MHz; CDCl_3)

MS: m/z 310,2 (berechnete molare Masse: 310,15 g/mol)

8.9 FT-IRRAS-Messungen - Externe gerichtete Reflexion

IR-Spektrometer IFS 88 [BRUKER, Deutschland]

Messparameter: 2000 Scans, Auflösung 2 cm^{-1} , Apertur 2,5 mm

Selbstadsorbierte (SA) Thiol- und Thioetherschichten werden in Reflexion mit streifendem Einfall gemessen. Ein Einfallswinkel des IR-Strahles von 83° erweist sich als optimal, da durch den längeren Lichtweg bei größeren Winkeln die Wechselwirkung mit der Analytschicht größer wird. Als Apodisationfunktion wird die Blackman-Harris 4-Term Funktion verwendet.

Untersuchungen zur Referenzierung der Proben mit einer selbst adsorbierten Naphthalinthiol-Schicht zeigen, dass sie bessere Ergebnisse liefert für Analyten ohne Arylfunktion als eine frisch bedampfte Goldschicht auf Glas.

Literatur und Quellen

- [1] Torres, J.; Stevens, T.; Samsó, M.; Trends in Biochemical Sciences (2003), 28(3), 137-144
- [2] Neher, E.; EMBO Journal (1992), 11(5), 1673-1679
- [3] Sugawara, M.; Hirano, A.; Bühlmann, P.; Umezawa, Y.; Bull. Chem. Soc. Jpn. (2002), 75, 187-201
- [4] Cooper, M. A.; Journal of Molecular Recognition (2004), 17(4), 286-315
- [5] Cowan, W.; Harter, D.; Kandel, E.; Annual review of neuroscience (2000), 23, 343-391
- [6] Entschladen, F.; Bioforum (2003), 11, 710-711
- [7] Eray, M.; Dogan, N.; Reiken, S.; Sutisna, H.; Van Wie, B.; Koch, A.; Moffett, D.; Silber, M.; Davis, W.; BioSystems (1995), 35, 183-188
- [8] Heyse, S.; Vogel, H.; Sängler, M.; Sigrist, H.; Protein Science (1995), 4, 2532-2537
- [9] Berzina, T.; Troitsky, V.; Vakula, S.; Riccio, A.; Gambacorta, A.; De Rosa, M.; Dante, S.; Maccioni, E.; Rustichelli, F.; Application of Langmuir-Blodgett technique for depositing thin films of lipids; Electronics and Biotechnology Advanced (EL.B.A.) Forum Series (1996), 2(Molecular Manufacturing), 77-88
- [10] Sasaki, D.; Stevens, Mark J. MRS Bulletin (2006), 31(7), 521-526
- [11] Friedrich, S.; Integration und Nachweisfunktion von natürlichen Ionenkanälen in Lipid/Polymer-Matrizes, Dissertation, TU Dresden, Dresden, Deutschland (1999)
- [12] Labarca, P.; Latorre, R.; Methods in Enzymology (1992), 207(Ion Channels), 447-463
- [13] Lundbaek, J.; Journal of Physics: Condensed Matter (2006), 18(28), 1305-1344
- [14] Lundbaek, J.; J. Physics: Condensed Matter (2006), 18(2), S1305-S1344
- [15] Cascio, M.; Biochim. Biophys. Acta (2005), 1711(2), 142-153
- [16] Lundbaek, J.; Andersen, O.; Biophys. J. (1999), 76, 889-895
- [17] Killian, A.; Nyholm, T.; Curr. Opinion Struc. Biol. (2006), 16, 473-479
- [18] McIntosh, T.; Simon, S.; Ann. Rev. Biophys. Biomol. Structure (2006), 35, 177-198
- [19] May, S.; Eur. Biophys. J. (2000), 29, 17-28
- [20] Lindblom, G.; Quist, P.-O.; Curr. Opinion in Colloid & Interface Sci. (1998), 3, 499-508
- [21] Ion Channels : A Practical Approach, Williams, A.; Ed. Ashley, R. H.; (1995), 43-69
- [22] Finkelstein, A.; Methods in enzymology (1974), 32(Part B), 489-501
- [23] Matsuno, N.; Murawsky, M.; Ridgeway, J.; Cuppoletti, J.; Biochim. Biophys. Acta (2004), 1665, 184-190
- [24] Schmidt, E.; Liebermann, T.; Kreiter, M.; Jonczyk, A.; Naumann, R.; Offenhäuser, A.; Neumann, E.; Kukul, A.; Maelicke, A.; Knoll, W.; Biosensors & Bioelectronics (1998), 13, 585-591

- [25] Anzai, K.; Ogawa, K.; Ozawa, T.; Yamamoto, H.; *J. Biochem. Biophys. Methods* (2001), 48, 283-291
- [26] Puu, G.; Artursson, E.; Gustafson, I.; Lundström, M.; Jass, J.; *Biosensors & Bioelectronics* (2000), 15, 31-41
- [27] Hanke, W.; Methfessel, C.; Wilmsen, U.; Boheim, G.; *Bioelectr. & Bioenerg.* (1984), 12, 329-337
- [28] Madden, T.; *Chemistry and Physics of Lipids* (1986), 40, 207-222
- [29] Joubert, J.; Elandaloussi, E.; Wysocki, R.; Saavedra, S.; Abstracts of Papers, 229th ACS National Meeting, San Diego, CA, USA (2005) Coll-017
- [30] Zizi, M.; Roman, I.; Method combines the phage display methodology with the surface plasmon resonance (SPR) technology for screening and selecting membrane protein ligands. *Eur. Pat. Appl.* (2006)
- [31] Slavik, R.; Homola, J.; Brynda, E.; *Biosens. Bioelectron.* (2002), 17, 591-595
- [32] Sakmann B.; Neher E.; *Annual review of physiology* (1984), 46, 455-472
- [33] Mathes, C.; *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (2006), 10(2), 319-327
- [34] Vogel, H.; Abstracts of Papers, 222nd ACS National Meeting (2001), Chicago, IL, USA
- [35] Sinclair, J.; Pihl, J.; Olofsson, J.; Karlsson, M.; Jademark, K.; Chiu, D.; Orwar, O.; *Anal. Chem.* (2002), 74(24), 6133-6138
- [36] Szunerits, S.; Bouffier, L.; Calemczuk, R.; Corso, B.; Demeunynck, M.; Descamps, E.; Defontaine, Y.; Fiche, J.-B.; Fortin, E.; Livache, T.; Mailley, P.; Roget, A.; Vieil, E.; *Electroanalysis* (2005), 17(22), 2001-2017
- [37] Baxter, D.; Kirk, M.; Garcia, A.; Raimondi, A.; Holmqvist, M.; Flint, K.; Bojanic, D.; Distefano, P.; Curtis, R.; Xie, Y., *J. Biomol. Screening* (2002), 7(1), 79-85
- [38] www.molecularprobes.com (am 21.02.2007)
- [39] Warrior, U.; Cambridge HealthTech Institut's Eight Annual High Throughput Technologies (2005); Philadelphia PA, USA
- [40] Farinas, J.; *Anal. Biochem.* (2001), 295, 138-142
- [41] Biran, I.; Walt, D.; *Anal. Chem.* (2002), 74, 3046-3054
- [42] Xu, J.; Wang, X.; Ensign, B.; Li, M.; Wu, L.; Guia, A.; Xu, J.; *Drug Discovery Today* (2001), 6(24), 1278-1287
- [43] Cornell, B.; Braach-Maksvytis, V.; King, L.; Osman, P.; Raguse, B.; Wiczorek, L.; Pace, R.; *Nature* (1997), 387, 580-583
- [44] Heyse, S.; Ernst, O.; Dienes, Z.; Hofmann, K.; Vogel, H.; *Biochemistry* (1998), 37, 507-522
- [45] Brennan, J.; Besanger, T.; Rupcich, N.; 31st Northeast regional Meeting of Am. Chem. Soc. (2003), Saratoga Springs, NY, USA,

- [46] Lorigan, G.; Dave, P.; Tiburu, E.; Damodaran, K.; Abu-Baker, S.; Karp, E.; Gibbons, W.; Minto, R.; *J. Am. Chem. Soc.* (2004), 126, 9504-9505
- [47] Smirnov, A.; Poluektov, O.; *J. Am. Chem. Soc.* (2003), 125, 8434-8435
- [48] Yoshina-Ishii, C.; Boxer, S.; *J. Am. Chem. Soc.* (2003), 125, 3696-3697
- [49] Boxer, S., Abstracts of Papers, 227th ACS National Meeting (2004), Anaheim, CA, USA,
- [50] Wu, Z.; Tang, J.; Cheng, Z.; Yang, X.; Wang, E.; *Anal. Chem.* (2000), 72, 6030-6033
- [51] Fang, Y.; Frutos, A.; Lathiri, J.; *J. Am. Chem. Soc.* (2002), 124(11), 2394-2395 und U.S. Pat. Appl. Publ. (2004), US. 2002-300954
- [52] Tantra, R.; Copper, J.; *Sensors Actuators B: Chemical* (2002), B82(2-3), 233-240
- [53] Groves, J.; Ulman, N.; Cremer, P.; Boxer, S.; *Langmuir* (1998), 14, 3347-3350
- [54] Yamazaki, M.; Ulman, M.; Nguyen, L.; Boxer, S.; *US Pat. Appl. Publ.* 0096418 (2003)
- [55] Morigaki, K.; Baumgart, T.; Jonas, U.; Offenhäusser, A.; Knoll, W.; *Langmuir* (2002), 18, 4085-4089
- [56] Keusgen, M.; *Naturwissenschaften* (2002), 89, 433-444
- [57] Umezawa, Y.; Ozawa, T.; Sato, M.; *Anal. Sci.* (2002), 18, 503-516
- [58] Ehrat, M.; Duvencak, G.; Krebach, G.; Oroszlan, P.; Paulus, A.; *Chimia* (1997), 51, 705-713
- [59] Homola J.; *Analytical and bioanalytical chemistry* (2003), 377(3), 528-39
- [60] Dostalek, J.; Ladd, J.; Jiang, S.; Homola, J.; *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors* (2006), 4 (Surface Plasmon Resonance Based Sensors), 177-190
- [61] Homola, J.; Yee, S.; Gauglitz, G.; *Sensors and Actuators B* (1999), 54, 3-15
- [62] Mutschler, T.; Kieser, B.; Frank, R.; Gauglitz, G.; *Anal. Bioanal. Chem.* (2002), 374, 658-664
- [63] Raether, H.; *Physics of Thin Films* (1977), 9, 145-261
- [64] *Surface Plasmons*, Ed. Raether, H.; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1988)
- [65] *Handbook of optical constants of solids*, Ed. Palik, E. D.; Academic Press, Boston, USA (1985)
- [66] Kretschmann, E.; *Z. Physik* (1969), 221, 346-361
- [67] Earp, R.; Dessy, R.; *Chemical Analysis* (1998), 148(Commercial Biosensors), 99-164
- [68] Lamprecht, B.; Krenn, J. R.; Schider, G.; Ditlbacher, H.; Salerno, M.; Felidj, N.; Leitner, M.; Aussenegg, F. R.; *Appl. Phys. Letters* (2001), 79, 51-53
- [69] Aust, E.; Ito, S.; Sawodny, M.; Knoll, W.; *Trends Polym. Sci.* (1994), 2(9), 313-323
- [70] Smith, E. A.; Corn, R. M.; *Applied Spectroscopy* (2003), 57(11), 320A-332A
- [71] Lee, H. J.; Yan, Y.; Marriott, G.; Corn, R. M.; *J. Physiol.* (2005), 563, 61-71
- [72] Steiner, G.; *Anal. Bioanal. Chem.* (2004), 379, 328-331

- [73] Immunoassays, Ed. Raem, A. M., Rauch, P.; Spektrum Akademischer Verlag, München, Deutschland (2006), S. 115ff.
- [74] Salamon, Z.; Macleod, H.; Tollin, G.; *Biochim. Biophys. Acta* (1997), 1331, 131-152
- [75] Guedon, P.; Livache, T.; Martin, F.; Lesbre, F.; Roget, A.; Bidan, G.; Levy, Y.; *Anal. Chem.* (2000), 72, 6003.
- [76] Lahiri, S.; Jonas, A.; Frutos, G.; Kala, P.; Fang, Y.; *Biomed. Microdev.* (2001), 3, 157-161
- [77] Wegner, H.; Lee, J.; Corn, R.; *Anal. Chem.* (2002), 74, 5161.
- [78] Nelson, B.; Grimsrud, T.; Liles, M.; Goodman, R.; Corn, R.; *Anal. Chem.* (2001), 73, 1-8
- [79] Hänel, C.; Gauglitz, G.; *Anal. Bioanal. Chem.* (2002), 372, 91-100
- [80] Salamon, Z.; Tollin, G.; *Soc. Vac. Coaters, 41st Ann. Techn. Conference Proc.* (1998), 238-242
- [81] Haemers, S.; Koper, G.; van der Leeden, M.; Frens, G.; *Langmuir* (2002), 18, 2069-2074
- [82] Ekgasit, S.; Stengel, G.; Knoll, W.; *Anal. Chem.* (2004), 76, 4747-4755
- [83] Duschl, C.; Liley, M.; Lang, H.; Ghandi, A.; Zakeeruddin, S.; Stahlberg, H.; Dubochet, J.; Nemetz, A.; Knoll, W.; Vogel, H.; *Materials Science and Engineering* (1996), C4(1), 7-16
- [84] *Encyclopedia of Life Science*, John Wiley & Sons, 2006, www.els.net (am 19.06.2003)
- [85] Salzer, R.; Li, J.; Rautenberg, C.; Friedrich, S.; *Macromolecular Symposia* 164 (2001), 239-245
- [86] Galzi, J.-L.; Revah, F.; Bessin, A.; Changeux, J.-P.; *Annu. Rev. Pharmacol.* (1991), 31, 37-72
- [87] Changeux, J.-P.; *Fidia Research Neuroscience Award Lectures*, Raven Press, New York, USA, (1990), Volume 4, 21-168
- [88] *Heterogene Katalyse*, Schlosser, E.-G., Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland (1972)
- [89] *Heterogene Katalyse in der chemischen Technik*, Krypilo, P.; Wendlandt, K.-P.; Vogt, F.; Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, Deutschland (1993), 1. Aufl.
- [90] *Physikalische Chemie*, Atkins, P. W.; VCH-Verlag, Weinheim, Deutschland (1990), 2. korr. Auflage
- [91] Brody, J.; Yager, P.; Goldstein, R.; Austin, R.; *Biophys. J.* (1996), 71, 3430-3441
- [92] Roy, J.; *Thesis for Master of Technology*, Indian Institute of Technology, Delhi (2002)
- [93] Kobayashi, H.; Ikeda, H.; Imamura, S.; Kobayashi, K.; Mitsuma, Y.; Minami, M.; Ishida, O.; Hirose, M.; Kobayashi, K. *Am. J. of Ophthalmology* (2000), 130(3), 310-321
- [94] Frazer, R.; Byron, R.; Osborne, P.; West, K.; *J. Long-Term Effects of Med. Impl.* (2005), 15(6), 629-639
- [95] Fink B.; Mitchell G.; Hill R.; *Optometry and vision science: official publication of the American Academy of Optometry* (2006), 83(10), 740-744

- [96] Einführung in die Technologie der Elektrotechnik – Elektronik; Eigler, H.; Beyer, W.; VEB Verlag Technik Berlin, Deutschland (1985), S. 173ff
- [97] Flack, W.; Soong, D.; Bell, A.; Hess, D.; J. Appl. Phys. (1984), [56], 1199-1217
- [98] www.mse.arizona.edu/faculty/birnie/coatings (am 01.09.2006)
- [99] Meyerhofer, D.; J. Appl. Phys. (1978), 49, 3993-3999
- [100] www.microchem.com (am 02.11.2004)
- [101] Zhang, J.; Tan, K.; Gong, H.; Polym. Testing (2001), 20, 693-701
- [102] Springham, S.; Osipowicz, T.; Sanchez, J.; Gan, L.; Watt, F.; Nucl. Instrum. Method. Phys. Res. B (1997), 130, 155-159
- [103] Yu, L.; Koh, C.; Lee, J.; Koelling, K.; Polym. Eng. Sci. (2002), 42(5), 871-888
- [104] Zhao, X.; Xia, Y.; Whitesides, G.; J. Mater. Chem. (1997), 7, 1069-1074
- [105] Kim, E.; Xia, Y.; Whitesides, G.; Nature (1995), 376, 581-584
- [106] Xia, Y.; Whitesides, G.; Angew. Chem. (1998), 110, 568-594
- [107] Kumar, A.; Whitesides, G.; Appl. Phys. Lett. (1993), 63, 2002-2004
- [108] Zhao, X.; Xia, Y.; Whitesides, G.; Adv. Mater. (1996), 8, 837-840
- [109] Lee, H.; Jung, G.; Microelectr. Eng. (2005), 77, 168-174
- [110] Pflöging, W.; Hanemann, T.; Bernauer, W.; Torge, M.; Laser Applications in Microelectronic and Optoelectronic Manufacturing VI, Proceedings of SPIE (2001), 4274, 331-345
- [111] Snow, E.; Park, D.; Campbell, P.; Appl. Phys. Lett. (1996), 69, 269-275
- [112] Xu, J.; Drehlich, J.; Nadgorny, E.; Langmuir (2004), 20, 1021-1025
- [113] Ballauff, M.; Polymer Brushes (2004), 231-248
- [114] Murray, M.; Scheinfen, M.; Isaacson, M.; Adesida, I.; J. Vac. Sci. Technol. B (1985), 3, 367-372
- [115] Takigawa, T.; Wada, H.; Ogawa, Y.; Yoshikawa, R.; Mori, I.; Abe, T.; J. Vac. Sci. Technol. B (1991), 9, 2981-2994
- [116] Madou, M.; Liga and Moulding, The CRC Handbook of MEMS (2001), 340-382
- [117] Osipowicz, T.; van Kann, J.; Sum, T.; Sanchez, J.; Watt, F.; Nuclear Instruments and Methods in Physics Research (2000), 161-163, 83-89
- [118] Lawes, R.; Arthur, G.; Schneider, A.; Design, Characterization and Packaging for MEMS and Microelectronics II, Proceedings of SPIE (2001), 4593, 145-155
- [119] van Kann, J.; Sanchez, J.; Xu, B.; Osipowicz, T.; Watt, F.; Nuclear Instruments and Methods in Physics Research (1999), 158, 179-184
- [120] Okudaira K. K.; Morikawa E.; Hasegawa S.; Sprunger P. T.; Saile V.; Seki K.; Harada Y.; Ueno N.; J. Electron Spec. Rel. Phenom. (1998), 88-91 und 913-917

- [121] Handbook of Polymer Degradation, Ed. Hamid, S. H.; Macel Dekker, Inc.; New York, Basel, (2000), 573-605
- [122] Reichmanis, E.; Wilkins, C.; Microelectronic Polymers, Ed. M. S. Htoo, Marcel Dekker; Inc., New York, Basel, (1989), 2-55
- [123] Bowden, M.; Eds. Thompson, L. F.; Willson, C. G.; Frechet, J. M.; ACS, (1984), 39-125
- [124] Caykara, T.; Guven, O.; Polymer Degradation and Stability (1999), 65(2), 225-229
- [125] Moore, J.; Choi, J.; Radiation Effects on Polymers, Eds. R. L. Clough; S. W. Shalaby; ACS Symposium Series 475; ACS, Washington, DC, USA (1991), 157-192
- [126] Akmal, N.; Usmani, A.; Handbook of Polymer Degradation, Ed. Hamid, S. H.; Macel Dekker, Inc.; New York, Basel, (2000), 485-515
- [127] McCord, M.; Rooks, M.; Handbook of Microlithography, Micromachining and Microfabrication, Ed. Rai-Choudhury, P.; SPIE Optical Engineering Pr., London, UK (1997), Vol. 1, Kap. 2, 139-251
- [128] Küper, S.; Stuke, M.; Appl. Phys. (1989), A 49, 211-215
- [129] Introduction to Microlithography; Eds. Thompson, L. F.; Wilson, C. G.; Browden, M. J.; ACS, USA, (1997)
- [130] The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication; Ed. Campbell, S. A.; Oxford University Press Inc., USA (2003)
- [131] De Carlo, F.; Song, J.; Mancini, D.; J. Vac. Sci. Technol. (1998), 16(6), 3539-3542
- [132] Mikrosystemtechnik für Ingenieure; Ed. Menz, W.; Mohr, J.; VCH-Wiley, Deutschland (1997) 2. erw. Aufl. und Piotter, V.; Hanemann, T.; Ruprecht, R.; Thies, A.; Haußelt, J.; Proc. SPIE (2004), Vol. 3223, 91-99
- [133] Handbook of Microlithography, Micromachining, and Microfabrication, Volume 1: Microlithography, Ed. P. Rai-Choudhury; SPIE Press Monograph (1997), Vol. PM39;
- [134] Love, J.; Wolfe, D.; Jacobs, H.; Whitesides G.; Langmuir (2002), (17), 6005-6012
- [135] Oro, J.; Wolfe, J.; J. Appl. Phys. (1982), 53(11), 7379-7385
- [136] Leggett, G.; Vickerman, J.; Appl. Surf. Sci. (1992), 55, 105-115
- [137] Emmoth, B.; Mladenov, G.; J. Appl. Phys. (1983), 54(12), 7119-7123
- [138] Hiraoka, H.; Pacansky, J.; J. Vac. Sci. Technol. (1981), 19(4), 1132-1135
- [139] Baglin, J.; Metallized Plastics 5&6: Fundamental and Applied Aspects (1998), 365-387
- [140] Microsystem Technology, Eds. Menz, W.; Mohr, J.; Paul, O.; VCH-Wiley, Deutschland (2001)
- [141] www.arche.pse.edu (am 23.04.2005)
- [142] www.cvispectralproducts.com (am 22.04.2005)
- [143] www.molecularkinetics.com (am 15.01.2005)
- [144] www.amd.com (am 25.10.2005)

- [145] Liu, Y.; Wu, W.; Guan, Y.; Ying, P.; Li, C.; Langmuir (2002), 18, 6229-6232
- [146] Shin, H.; Jung, Y.; Oh, T.; Chang, T.; Lee, D.; Noda, I.; Langmuir (2002), 18, 5953-5958
- [147] Kobayashi, K.; Araki, K.; Imamura, Y.; Bull. Chem. Soc. Jpn. (1989), 62, 3421-3425
- [148] Konstadinidis, K.; Thakkar, B.; Chakraborty, A.; Potts, L. W.; Tannenbaum, R.; Tirrell, M.; Langmuir (1992), 8, 1307-1317
- [149] Berquier, J. M.; Proc. Symp. Chem. Mod. Surf., Pennsylvania, USA (1993), 210-219
- [150] Papirer, E.; Perrin J.; Nanse, G.; Fioux, P.; Eur. Polym. J. (1994), 30, 985-991
- [151] Grohens, Y.; Auger, M.; Prud'Homme, R.; Schultz, J.; J. Polym. Sci. B: Polymer Phys. (1999), 37, 2985-2995
- [152] Sondag, A.; Raas, M.; Polymer (1991), 32, 2917-2920
- [153] Berquier, J. M.; Arribart, H.; Langmuir (1998), 14, 3716-3719.
- [154] Nagai, H.; J. Appl. Polymer Sci. (1963), 7, 1697-1714
- [155] www.imtek.de/anwendungen (am 15.01.2005)
- [156] Mohr, J.; Ehrfeld, W.; Münchmeyer, D.; Stutz, A.; Makromol. Chem. (1989), 24, 231-251
- [157] Dobisz, E.; Brandow, S.; Mitterender, J.; J. Vac. Sci. Technol. (2000), 18, 107-111
- [158] www.mstonline.de/mikrosystemtechnik/technologien (am 16.06.2003)
- [159] Papanu, J.; Hess, D.; Soane, D.; Tell, A.; J. Electrochem. Soc. (1989), 136, 3077-3083
- [160] Ueberreiter, K.; Ed. J. Crank; G. S. Park, Academic Press; (1968), 220-256
- [161] Pethrick, R.; Rankin, K.; J. Mater. Chem. (1998), 8, 2599-2603
- [162] Khoury, M.; Ferry, D.; J. Vac. Sci. Technol. (1996), 14, 75-79
- [163] Bernstein, G.; Hill, D.; Superlattices and Microstructures (1992), 11(2), 237-240
- [164] Greeneich, J.; J. Electrochem. Soc. (1975), 122, 970-76
- [165] Greeneich, J.; J. Electrochem. Soc. (1974), 121, 1669-1671
- [166] Yasin, S.; Hasko, D.; Ahmed, H.; J. Vac. Sci. Technol. (1999), 17, 3390-3393
- [167] Ryan, J.; Hoole, A.; Broers, A.; J. Vac. Sci. Technol. (1995), 13(6), 3035-3039
- [168] Chen, W.; Ahmed, H.; J. Vac. Sci. Technol. (1993), 11(6), 2519-2523
- [169] Liu, R.; Vasile, M.; Beebe, D.; J. Micromech. Sys. (1999), 8 (2), 146-151
- [170] Pantenburg, F.; Achenbach, S.; Mohr, J.; Microsystem Technologies (1998), 4, 89-93
- [171] Dobisz, E.; Brandow, S.; Snow, E.; Bass, R.; J. Vac. Sci. Technol. (1997), 15(6), 2318-2322
- [172] Cheng, C.; Chen, R.; J. Micromech. Microeng. (2001), 11, 692-696
- [173] Köhler, U.; Guber, A.; Bier, W.; Hecke, M.; Sensors Actuators (1996), 53, 361-363
- [174] Chai, J.; Lu, F.; Li, B.; Kwok, D.; Langmuir (2004), 20(25), 10919-10927

- [175] Grace, J.; Gerenser, L.; *J. Dispersion Sci. Technol.* (2003), 24, 305-310
- [176] Friedrich, J.; Unger, W.; Lippitz, A.; Koprinarov, I.; Kühn, G.; Weidner, S.; Vogel, L.; *Metallized Plastics: Fundamental and Applied Aspects* (1998), 5&6, 271-293
- [177] Groening, P.; Kuettel, O.; Collaud-Coen, M.; Dietler, G.; Schlapbach, L.; *Appl. Surf. Sci.* (1995), 89(1), 83-91
- [178] Hook, T.; Gardella, J.; *J. Mater. Res.* (1987), 2(1), 117-131
- [179] Kupfer, H.; Ostwald, R.; *Metallized Plastics: Fundamental and Applied Aspects* (1998), 5&6, 85-96
- [180] Lee, D.; Condrate, S.; *Asian J. Spectr.* (2001), 5, 165-175
- [181] Somerday, B.; Goods, S.; Shediach, R.; Yang, N.; Clift, M.; 4. International Conference on High Aspect Ratio Microstructure Technology (HARMST '01) (2001)
- [182] Eltekov, Y.; *Pure & Appl. Chem.* (1989), 61, 1987-1992
- [183] Dan, N.; *Langmuir* (2000), 16(8), 4045-4048
- [184] Burkstrand, J.; *J. Appl. Phys.* (1981), 52, 4795-4800
- [185] Kim, D.; Jo, W.; *Macromol. Chem. Phys.* (2001), 202, 3065-3071
- [186] Kim, D.; Kim, K.; Jo, W.; Kim, J.; *Macromol. Chem. Phys.* (2000), 201, 2699-2712
- [187] Papirer, E.; Perrin, J.; Nanse, G.; Fioux, P.; *Eur. Polym. J.* (1994), 30, 985-991
- [188] Mallik, R.; Pritchard, R.; Horley, C.; Comyn, J.; *Polymer* (1985), 26, 551-556
- [189] Hall, J.; Hansma, P.; *Surface Science* (1978), 76, 61-76
- [190] Chakraborty, A.; Shaffer, J.; Adriani, P.; *Macromolecules* (1991), 24, 5226-5229
- [191] Johnson, H.; Granick, S.; *Science* (1992), 255, 966-969
- [192] Shaffer, J.; Chakraborty, A.; *Macromolecules* (1993), 26, 1120-1136
- [193] Grohens, Y.; Brogly, M.; Labbe, C.; Schultz, J.; *Eur. Polymer. J.* (1997), 33, 691-697
- [194] Douglas, J.; Schneider, H.; Frantz, P.; Granick, S.; *J. Phys.* (1997), 9, 7699-7718
- [195] Enriquez, E.; Schneider, H.; Granick, S.; *J. Polymer Science (B) Polymer Physics* (1995), 33, 2429-2437
- [196] Johnson, H.; Granick, S.; *Macromolecules* (1990), 23, 3367-3374
- [197] Berquier, J.; Arribart, H.; *Langmuir* (1998), 14, 3716-3719
- [198] Patnaik, A.; Li, C.; *Journal of Applied Physics* (1998), 83, 3049-3056
- [199] Brooksby, P.; Fawcett, W.; *Electr. Chim. Acta* (2003), 48(7), 807-817
- [200] Whelan, C.; Cecchet, F.; Baxter, R.; Zerbetto, F.; Clarkson, G.; Leigh, D.; Rudolf, P.; *J. Phys. Chem. B* (2002), 106, 8739-8746
- [201] Saliba, N.; Parker, D.; Koel, B.; *Surf. Sci.* (1998), 410, 270-284
- [202] Krozer, A.; Rodah, M.; *J. Vac. Sci. Technol. A* (1997), 15, 1704-1710

- [203] Serizawa, T.; Hamada, K.; Kitayama, T.; Fujimoto, N.; Hatada, K.; Akashi, M.; *J. Am. Chem. Soc.* (2000), 122, 1891-1899
- [204] Spatz, J.; Mössmer, S.; Hartmann, C.; Möller, M.; Herzog, T.; Krieger, M.; Boyen, H.; Ziemann, B.; Kabius, M.; *Langmuir* (2000), 16(15), 407-415
- [205] Tadd, E.; Bradley, J.; Tannenbaum, R.; *Langmuir* (2002), 18, 2378-2384
- [206] Shi, M.; Lemontagne, B.; Selmani, A.; Martinu, L.; *J. Vac. Sci. Technol.* (1994), 12, 44-50
- [207] Khan Malek, C.; Das, S.; *J. Vac. Sci. Technol. B* (1998), 16, 3543-3546
- [208] Lüttge, R.; Adam, D.; Burkhardt, F.; Hoke, F.; Schacke, H.; Schmidt, M.; Wolf, H.; Schmidt, A.; *Microelectronic Engineering* (1999), 46, 247-250
- [209] Lee, H.; Georgson, M.; Lindgren, M.; *Trends in Optics and Photonics, optical interference coatings* (2001), MF2, 1-3
- [210] de Gennes, P.; *Adv. Coll. Int. Sci.* (1987), 27, 189-209
- [211] Tsviline, D.; Stepanyuk, V.; Levanov, N.; Hergert, W.; Katsnelson, A.; *Comput. Phys. Commun.* (1999), 121, 747-754
- [212] Steiner, G.; Zimmerer, C.; Salzer, R.; *Langmuir* (2006), 22(9), 4125-4130
- [213] Muthukumar, M.; *Journal of Chemical Physics* (2004), 120(19), 9343-9350
- [214] Khokhlov, A.; Zeldovich, K.; Kramarenko, E.; *NATO Science Series, II: Mathematics, Physics and Chemistry* (2001), 46 (Electrostatic Effects in Soft Matter and Biophysics), 283-316
- [215] Bakker, W.; Verboom, W.; Reinhoudt, D.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1994), 71-72
- [216] Craig, A.; Katakya, R.; Matthews, R.; Parker, D.; Furguson, G.; Lough, A.; Adams, H.; Bailey, N.; Schneider, H.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1990), 1523-1531
- [217] Flink, S.; Boukamp, B.; van den Berg, A.; van Veggel, F.; Reinhoudt, D.; *J. Am. Chem. Soc.* (1998), 120, 4652-4657
- [218] Faulkner, L., *Chemtracts: Analytical and Physical Chemistry* (1989), 1(3), 169-72
- [219] Ulman, A.; Kang, J.; Shnidman, Y.; Liao, S.; Jordan, R.; Choi, G.-Y.; Zaccaro, J.; Myerson, A.; Rafailovich, M.; Sokolov, J.; Fleischer, C.; *Reviews in Molecular Biotechnology* (2000), 74(3), 175-188
- [220] Sasaki, S.; Shionoya, M.; Koga, K.; *J. Am. Soc.* (1985), 107, 3371-3372
- [221] Nabeshima, T.; Tsukada, N.; Haruyama, T.; Yano, Y.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (1995), 68, 227-229
- [222] Flink, S.; van Veggel, F.; Reinhoudt, D.; *J. Phys. Chem. B* (1999), 103, 6515-6520
- [223] Breccia, P.; Cacciapaglia, R.; Mandolini, L.; Scorsini, C.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (1998), 1257-1261
- [224] Major, R.; Zhu, X.; *J. Am. Chem. Soc.* (2003), 125(28), 8454-8455

- [225] Poirier, G.; *Chem. Rev.* (1997), 97(4), 1117-1127
- [226] Xu, J.; Li, H.; *Journal of Colloid and Interface Science* (1995), 176(1), 138-149
- [227] Yamada, R.; Uosaki, K.; *Langmuir* (1998), 14(4), 855-861
- [228] Nabeshima, T.; Tsukada, N.; Nishijima, K.; Ohshiro, H.; Yano, Y.; *J. Org. Chem.* (1996), 61, 4342-4350
- [229] Nabeshima, T.; Nishijima, K.; Tsukada, N.; Furusawa, H.; Hosoya, T.; Yano, Y.; *J. Chem. Soc., Chem Commun.* (1992), 1092-1094
- [230] Stamou, D.; Musil, C.; Ulrich, W.-P.; Leufgen, K.; Padeste, C.; David, C.; Gobrecht, J.; Duschl, C.; Vogel, H.; *Langmuir* (2004), 20, 3495-3497
- [231] Schmelmer, U.; Jodan, R.; Geyer, W.; Eck, W.; Götzhäuser, A.; Grunze, M.; Ulman, A.; *Angewandte Chemie, International Edition* (2003), 42(5), 559-563
- [232] Garg, N.; Friedman, J.; Lee, T.; *American Chemical Society* (2000), 4266-4271
- [233] Jennings, E.; Laibinis, P.; *ACS* (1997), 5208-5214
- [234] Shannon, R.; *Acta Crystallogr., Sect. A* (1976), 32, 751-767
- [235] *Kontakte (Merck, Darmstadt)*, 2/86, 28
- [236] Gamboa, J.; Palomo, C.; *Synthesis* (1986), 52-54
- [237] Morales, A.; de Juan, E.; Fernandez-Carvajal, A.; Martinez-Pinna, J.; Poveda, J.; Encinar, J.; Ivorra, I.; Gonzalez-Ros, J.; *J. Mol. Neuroscience* (2006), 30(1-2), 5-6
- [238] Fong, T.; McNamee, M.; *Biochemistry* (1986), 25(4), 830-840
- [239] Benda, A.; Benes, M.; Marecek, V.; Lhotsky, A.; Hermens, T.; Hof, M.; *Langmuir* (2003), 19, 4120-4126
- [240] Weng, K.; Stalgren, J.; Duval, D.; Risbud, S.; Frank, C.; *Langmuir* (2004), 20(17), 7232-7239
- [241] Zhang, L.; Longo, M.; Stroeve, P.; *Langmuir* (2000), 16, 5093-5099
- [242] Cheng, Y.; Bushby, R.; Evans, S.; Knowles, P.; Miles, R.; Ogier, S.; *Langmuir* (2001), 17, 1240-1242
- [243] Osborn, T. D.; Yager, P.; *Langmuir* (1995), 11, 8-11
- [244] Peterman, M.; Ziebarth, J.; Braha, O.; Baylay, H.; Fishman, H.; Bloom, D.; *Biomedical Microdevices* (2002), 231-236
- [245] Tien, H. T.; Barish, R. H.; Gu, L.-Q.; Ottova, A. L.; *Anal. Sciences* (1998), 14, 3-18
- [246] Chandler, E.; Smith, A.; Burden, L.; Kasianowicz, J.; Burden, D.; *Langmuir* (2004), 20, 898-905
- [247] Ogier, S.; Bushby, R.; Cheng, Y.; Evans, S.; Jenkins, T.; Knowles, F.; Miles, R.; *Langmuir* (2000), 16, 5696-5701
- [248] Römer, W.; Lam, Y.; Fischer, D.; Watts, A.; Fischer, W.; Göring, P.; Wehrspohn, R.; Gösele, U.; Steinem, C.; *JACS* (2004), 126, 16267-16274

- [249] Anrather, D.; Smetazko, M.; Saba, M.; Alguel, Y.; Schalkhammer, T.; J. Nanosci. Nanotechnol. (2004), 4(1/2), 1-22
- [250] Peterson, I.; Beddow, J.; Membrane Sci. Technol. Ser. (2003), 7, 735-765
- [251] Groves, J.; Curr. Opin. Drug Discov. and Develop. (2002), 5(4), 606-612
- [252] Hennesthal, C.; Steinem, C.; J. Am. Chem. Soc. (2000), 122, 8085-8086
- [253] Cornell, B.; Optical Biosensors (2002), 457-495
- [254] Favero, G.; D'Annibale, A.; Campanelle, L.; Santucci, R.; Ferri, T.; Anal. Chim. Acta (2002), 460, 23-34
- [255] Knoll, W.; Frank, C.; Heibel, C.; Naumann, R.; Offenhausser, A.; Ruhe, J.; Schmidt, E.; Shen, A.; Sinner, E.; Rev. Mol. Biotechnol. (2000), 74(3), 137-158
- [256] Pantoja, R.; Sigg, D.; Blunck, R.; Bezanilla, F.; Heath, J. R.; Biophys. J. (2001), 81, 2389-2394
- [257] Drexler, J.; Steinem, C.; J. Phys. Chem. B (2003), 107 (40), 11245-11254
- [258] Ikematsu, M.; Iseki, M.; Sugiyama, Y.; Mizukami, A.; J. Electroanal. Chem. (1996), 403, 61-68
- [259] Sinner, E.; Knoll, W.; Curr. Opin. Chem. Biol. (2001), 5(6), 705-711
- [260] Krishna, G.; Schulte, J.; Cornell, B.; Pace, R.; Wiczorek, L.; Osman, P.; Langmuir (2001), 17, 4858-4866
- [261] Janshoff, A.; Steinem, C.; Anal. Bioanal. Chem. (2006), 385, 433-451
- [262] Römer, W.; Steinem, C.; Biophys. J. (2004), 86, 955-965
- [263] Mennicke, U.; Salditt, T.; Langmuir (2002), 18, 8172-8177
- [264] Graneli, A.; Rydström, J.; Kasemo, B.; Höök, F.; Langmuir (2003), 19, 842-850
- [265] Schuster, B.; Pum, D.; Sara, M.; Braha, O.; Bayley, H.; Sleytr, U.; Langmuir (2001), 17(2), 499-503
- [266] Shao, Y.; Jin, Y.; Wang, J.; Wang, L.; Zhao, F.; Dong, S.; Biosensor Bioelectronics (2005), 20, 1373-1379
- [267] Steltenkamp, S.; Müller, M.; Deserno, M.; Hennesthal, C.; Steinem, C.; Janshoff, A.; Biophys. J. (2006), 91, 217-226
- [268] Sapuri, A.; Baksh, M.; Groves, J.; Langmuir (2003), 19, 1606-1610
- [269] www.probes.invitrogen.com (am 25.01.2005)
- [270] Friedrich, J.; Geng, S.; Unger, W.; Lippitz, A.; Erdmann, J.; Gorsler, H.; Wöll, C.; Schertel, K.; Surface and Coatings Technology (1995), 74-75, 664-669
- [271] Oehr, C.; Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sec. B (2003), 208, 40-46
- [272] Hegemann, D.; Brunner, H.; Oehr, C.; Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sec. B (2003), 208, 282-289

- [273] Egitto, F.; Matienzo, L.; IBM J. Res. Dev. (1994), 38, 423-427
- [274] Groning, P.; Coen, M.; Schlapbach, M.; Chimia (2001), 55, 171-176
- [275] Johansson, B.; Larsson, A.; Ocklind, A.; Ohrlund, A.; J. Appl. Polym. Sci. (2002), 86, 2618-2623
- [276] Wilson, D.; Pond, R.; Williams, R.; Interface Sci. (2000), 8, 389-392
- [277] Jordan, R.; Foertig, A.; Purrucker, O.; Tanaka, M.; Gleixner, R.; Abstracts of Papers, 232nd ACS National Meeting, San Fransisco, CA; (2006)
- [278] Ottova, A.; Tvarozek, V.; Tien, H.; Membrane Science and Technology Series (2003), 7, 917-961
- [279] Baumgart, T.; Offenhäuser, A.; Langmuir (2003), 19, 1730-1737
- [280] Ide, T.; Yanagida, T.; Biochem. Biophys. Res. Comm. (1999), 265, 595-599
- [281] Fernandes, R.; Wu, L.-Q.; Chen, T.; Yi, H.; Rubloff, G.; Ghodssi, R.; Bentley, W.; Payne, G.; Langmuir (2003), 19, 4058-4062
- [282] Koh, W.; Revzin, A.; Pishko, M.; Langmuir (2002), 18, 2459-2462
- [283] Blake, T.; De Conink, J.; Langmuir (2004), 20, 2977-2978
- [284] White, S.; Biochim Biophys. Acta (1974), 356, 8-16
- [285] Li, J.; Ding, L.; Wang, E.; Dong, S.; J. Electroanal. Chem. (1996), 414, 17-21
- [286] Simonsen, A.; Bagatolli, L.; Langmuir (2004), 20, 9720-9728
- [287] Mozafari, M.; Cell. Mol. Biol. Lett. (2005), 10, 711-719
- [288] Vitas, A.; Diaz, R.; Gamazo, C.; Antimicrob. Agents & Chemotherapy (1996), 146-151
- [289] Richter, R.; Berat, R.; Brisson, A.; Langmuir (2006), 22, 3497-3505
- [290] Szoka, F.; Ann. Rev. Biophys. Bioeng. (1980), 9, 467-508
- [291] An introduction to. "Ultrathin Organic Films" from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly, Ulman, A. Academic Press, Inc., San Diego, USA (1991)
- [292] Puu, G.; Tjaernhage, T.; Resent Research Developments in Analytical Biochemistry (2002), 2, 217-227
- [293] Dahmane, T.; Diplomarbeit, TU Dresden, Institut für Analytische Chemie, Deutschland (2003)
- [294] Zimmerer, C.; Steiner, G.; Salzer, R.; Patent eingereicht am 01.10.2005
- [295] Schmidt, C.; Mayer, M.; Vogel, H.; Angew. Chem., Int. Ed. (2000), 39, 3137-3140
- [296] Li, S.; Palmer, A.; Langmuir (2004), 20, 7917-7925
- [297] Arndt, K.-F.; Schmidt, T.; Menge, H.; Macromol. Symp. (2001), 164, 313-322
- [298] www.bunsen.de/jdc/woche31.html (am 03.06.2004)
- [299] www.schott.com/german/productdb.html (am 20.02.2007)

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, den 21.05.2007

Cordelia Zimmerer