

**Inaugural – Dissertation**  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich – Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom – Chemiker Jacques Blümmel  
aus Mannheim-Neckarau  
Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2005



**Entwicklung biofunktionalisierter  
Nanostrukturen an Grenzflächen zur  
Untersuchung der Kinetik des  
molekularen Motorproteins Eg5**

Gutachter: Prof. Dr. Joachim P. Spatz  
Prof. Dr. Jürgen Wolfrum



**Inhaltsverzeichnis**

1	Zusammenfassung .....	4
2	Summary.....	6
3	Einleitung .....	8
4	Kenntnisstand .....	9
4.1	Polyethylenglykole als proteinresistente Oberflächenbeschichtung .....	9
4.2	Techniken der Strukturierung auf Oberflächen.....	12
4.2.1	Konventionelle Methoden .....	12
4.2.2	Nicht-konventionelle Methoden.....	13
4.3	Grundlagen der Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS).....	15
4.3.1	Funktionsprinzip.....	15
4.3.2	Chemische Verschiebung .....	16
4.3.3	Multiplettaufspaltung .....	17
4.3.4	Quantitative Analyse .....	17
4.4	Biologischer Hintergrund .....	21
4.4.1	Das Cytoskelett.....	21
4.4.2	Mikrotubuli.....	22
4.4.2.1	Aufbau, Struktur und dynamische Eigenschaften .....	22
4.4.2.2	Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) .....	26
4.4.2.3	Motorproteine .....	27
4.5	Aufgabenstellung und Strategie .....	32
5	Experimenteller Teil.....	35
5.1	Allgemeine Angaben .....	35
5.2	Analysemethoden .....	37
5.2.1	NMR-Spektren .....	37
5.2.2	Massenspektroskopie.....	37
5.2.3	Mikroskopie.....	37
5.2.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	38
5.2.5	Röntgen-Photoelektronen-Spektren .....	38
5.3	Analyse der XPS-Signale .....	39
5.3.1	Normierung.....	39
5.3.2	Untergrundkorrektur.....	40
5.3.3	Signalanpassung .....	40
5.4	Bestimmung der Mikrotubuligeschwindigkeit .....	41
5.5	Synthese der Substrate.....	41

5.5.1	(3-Triethoxysilyl-propyl)-carbamidsäure-( $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol)-ester .....	41
5.5.2	N-3-Triethoxysilylpropyl-N'- $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol-harnstoff.....	43
5.5.3	1-[2-( $\omega$ -methoxypolyethylenglykol-750)-ethylamino)-3-(3-triethoxysilyl- propoxy)-propan-2-ol (6).....	45
5.6	Probenpräparation und Chemisorptionsversuche auf Gold .....	46
5.6.1	Präparation der Goldsubstrate.....	46
5.6.2	Chemisorptionsversuche auf Goldoberflächen.....	46
5.7	Probenpräparation und Chemisorptionsversuche auf Silizium und Glas.....	46
5.7.1	Präparation der Silizium- bzw. Glasoberflächen .....	47
5.7.2	Anbindung von GOPTMS bzw. GOPTES.....	47
5.7.3	PEG-Kopplung.....	47
5.7.4	Anbindung von mPEG-triethoxysilanen auf Glas und Silizium.....	48
5.7.5	Avidinadsorption.....	48
5.8	Probenpräparation und Chemisorptionsversuche auf PDMS.....	48
5.8.1	Beschichtung von Glas mit PDMS .....	48
5.8.2	Partielle Funktionalisierung von PDMS mit GOPTES und PEG.....	48
5.9	Mikrostrukturierung von Glas mittels Photolithographie.....	49
5.10	Nanostrukturierung von Glas und Silizium .....	49
5.10.1	Darstellung der mizellaren Goldlösungen.....	49
5.10.2	Präparation der großflächiger Goldnanostrukturen.....	50
5.10.3	Präparation micro-nano-strukturierter Glas- bzw. Siliziumoberflächen.....	50
5.11	Zelladhäsionsexperimente.....	51
5.11.1	Zelladhäsionsexperimente auf unstrukturierten Glasoberflächen .....	51
5.11.2	Zelladhäsionsexperimente auf PDMS .....	51
5.11.3	Zelladhäsionsexperimente auf Goldnanostrukturen.....	51
5.11.4	Fixieren der Zellen und Anfärben der Aktinfasern und des Vinculins.....	52
5.12	Experimente mit Motorproteinen.....	52
5.12.1	Herstellung der Mikrotubuli.....	52
5.12.2	Herstellung polaritätsmarkierter Mikrotubuli .....	53
5.12.3	Anbindung von Mikrotubuli an Goldnanopartikel via Eg5 .....	53
5.12.4	Fixierung von Mikrotubuli aus 5.12.3 .....	54
5.12.5	Motility Assays mit Eg5 .....	54
5.12.6	Trapezexperimente mit Mikrotubuli und Eg5 auf Goldmikrostrukturen.....	54

---

6	Ergebnisse und Diskussion.....	56
6.1	Proteinresistenz durch Erzeugung polyethylenglykolterminierter Oberflächen .....	56
6.1.1	Passivierung mit funktionalisierten Polyethylenglykolen durch Kopplungsreaktionen an der Oberfläche .....	56
6.1.2	Passivierung mit Polyethylenglykolen durch Selbstaggregation auf der Oberfläche .....	58
6.1.2.1	Passivierung mit mPEG-Urethanen (1) und (2) .....	58
6.1.2.2	Passivierung mit mPEG-Harnstoffen (3)-(5).....	61
6.1.2.3	Passivierung mit mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin (6).....	66
6.1.3	Untersuchung der proteinresistenten Eigenschaften der Polyethylenglykolschichten mittels Zelladhäsion.....	67
6.1.4	Untersuchung der proteinresistenten Eigenschaften der Polyethylenglykolschichten mittels XPS.....	69
6.1.5	Übersicht über sämtliche dargestellten Polyethylenglykolschichten und deren protein- und zellresistenten Eigenschaften.....	70
6.2	Chemisorption auf Gold .....	74
6.2.1	$\beta$ -Mercapto-N-polyethylenglykol-propionsäureamid .....	74
6.2.2	11-Mercaptoundecansäure.....	75
6.2.3	Anbindung von Avidin auf Gold.....	75
6.2.3.1	Kovalente Anbindung von Avidin an Gold.....	75
6.2.3.2	Affine Anbindung von Avidin an Gold.....	76
6.3	XP-Untersuchungen monomizellarer Filme.....	77
6.4	Übertragung auf Goldnanostrukturen.....	79
6.4.1	Experimente mit Wild Type Ref52 Zellen .....	80
6.4.2	Motility Assays mit Eg5 und Mikrotubuli auf Goldnanostrukturen.....	82
6.4.2.1	Mikrotubuli binden an Eg5-funktionalisierte Goldstruktur.....	82
6.4.2.2	Anforderungen an die Versuchsanordnung.....	88
6.4.2.3	Einfluss der Goldpunktdichte auf die Mikrotubulianbindung.....	92
6.4.2.4	Einfluss der Salzkonzentration auf die Mikrotubuligeschwindigkeit.....	95
6.4.2.5	Einfluss der Goldpunktdichte auf die Mikrotubuligeschwindigkeit .....	98
6.4.2.6	Trapezartige gliding assays mit Eg5 und Mikrotubuli .....	105
7	Abkürzungsverzeichnis und Konventionen.....	108
8	Danksagung .....	110
9	Literaturverzeichnis .....	112

## 1 Zusammenfassung

Motorproteine transportieren Makromoleküle oder Molekülverbände durch Umwandlung von chemischer in mechanische Energie. Homotetramere Motorproteine der Kinesin-5-Familie sind essentiell an der Bildung des Spindelapparats während der Mitose beteiligt. Ihre Fähigkeit, Mikrotubuli zu vernetzen, erschwerte bislang gängige Untersuchungsmethoden. In dieser Arbeit wurde erstmals das Motorprotein Eg5 durch seine systematische Dichteveränderung auf Oberflächen untersucht. Möglich wurde dies durch die Entwicklung eines neuen Verfahrens auf der Basis nanostrukturierter und biofunktionalisierter Grenzflächen.

Finales Ziel dieser Arbeit war es, eine kontrollierte Anbindung des Motorproteins Eg5 auf einer biokompatiblen Oberfläche zu ermöglichen, um sein biologisches Verhalten quantitativ zu untersuchen. Für eine kontrollierte Anbindung der Biomoleküle auf einer Oberfläche mussten sowohl proteinadhäsive wie auch proteinresistente Bereiche mit hoher Symmetrie generiert werden. Erstere wurden mittels quasi-hexagonaler Goldnanostrukturen auf Glas und letztere durch Funktionalisierung der noch freien Glasoberfläche mit Polyethylenglykol (PEG) erzeugt. Diese PEG-Schicht sollte zum einen gute proteinresistente Eigenschaften vorweisen und zum anderen möglichst dünn sein, um eine Biofunktionalisierung der Goldnanopartikel zu gewährleisten. Die Goldpartikeldurchmesser (5-7 nm) wurden der Größe einer Motordomäne des Proteins angepasst. Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit einer Mehrfachbelegung eines Goldpunktes mit Eg5 minimiert.

Zentrale Frage zur Entwicklung geeigneter Oberflächen war die Generierung proteinresistenter Filme. Hierfür wurden unterschiedliche PEG-Funktionalisierungen durchgeführt und ihre Schichtzusammensetzung und -dicke untersucht. Dabei zeigten sich deutliche Vorteile einer Funktionalisierung mittels PEG-Alkoxysilylderivaten im Gegensatz zur Kopplung von PEG an aktivierte Oberflächen zur Herstellung dünner Filme (< 2.5 nm). Im Hinblick auf die Proteinresistenz der erzeugten PEG-Schichten konnte zudem gezeigt werden, dass besonders im Falle dünner Filme Packungsdichten wie auch Präparationsmethoden maßgeblichen Einfluss auf ihre zellabstoßenden Eigenschaften haben. Zudem wurde anhand von Zelladhäsionsexperimenten verdeutlicht, dass mit zunehmender Schichtdicke des PEGs größere Abschirmung eingebetteter Goldnanostrukturen erfolgte.

Im Mittelpunkt der Anwendung stand die Fragestellung, ob und in welcher Form die Partikeldichte das Verhalten des Motorproteins beeinflusst. Hierfür wurde Eg5 auf Goldnanostrukturen mit unterschiedlichen Partikelabständen (45, 58, 73, 90, 110 nm) eingebettet in eine PEG-Matrix immobilisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Eg5-



Anbindung zum einen spezifisch auf diesen Partikeln erfolgt und zum anderen die Menge des immobilisierten Proteins in direktem Zusammenhang mit der vorgegebenen Partikeldichte steht. Die ermittelten Gleitgeschwindigkeiten von Mikrotubuli, welche aktiv durch Eg5 unter ATP-Verbrauch transportiert wurden, stiegen mit zunehmender Motorkonzentration auf der Oberfläche. Weiterhin konnte bei geringen Goldpunktdichten (110 nm Abstände) eine Zunahme der Gleitgeschwindigkeit mit wachsender Länge der Mikrotubuli beobachtet werden. Dieses Verhalten steht im Einklang mit der Dichteabhängigkeit der Nanopartikel: *Je mehr Eg5 am Transport der Mikrotubuli beteiligt sind, umso schneller werden sie, bis eine Sättigung erreicht ist.* Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass es sich bei Eg5 um ein nicht prozessives Motorprotein handelt, d. h. nach jedem getätigten Schritt auf dem Filament löst es sich ab. Weitere Geschwindigkeitserhöhungen konnten durch Anheben der Salzkonzentration in den verwendeten Puffern erzielt werden, wobei die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Eg5-Oberflächenkonzentration gewahrt wurde.

Diese Studie verknüpft anorganische Oberflächen mit organischen Beschichtungen zur Untersuchung biologischer Systeme mittels physikalischer Methoden. Sie eröffnet durch diese Symbiose der Naturwissenschaften neue Möglichkeiten in der Erforschung von Motorproteinen. Ebenso ist die Erweiterung auf andere molekulare Biosysteme wie DNA oder Enzyme denkbar.

## 2 Summary

Many motor proteins function as carriers of macromolecules and molecular assemblies by transforming chemical into mechanical energy. Among these proteins, members of the kinesin-5 family are able to cross-link microtubules; for this reason, kinesin-5 motors play an essential role in spindle formation during cell division. However, *in vitro* assays to investigate the behaviour have been limited by the cross-linking properties up to now. Therefore, nanostructured and biocompatible interfaces allow, for the first time, to successfully examine the behaviour of the molecular motor Eg5, a member of the kinesin-5 family, in dependence of its surface density.

Final goal of this thesis was the controlled binding of the molecular motor protein Eg5 on biocompatible interfaces to study quantitatively biological behaviour. To achieve the controlled binding of biomolecules both protein adsorbing and repelling areas were arranged in an highly ordered array. Thus, hexagonal gold nano dot patterns on glass were used as anchor points for proteins whereas the space in between the gold dots was passivated with a protein resistant polyethylene-glycole (PEG) film. This film was supposed to be thin enough to enable biofunctionalisation of the nano particles. Particle sizes (5-7 nm in diameter) were adapted to the dimension of single motor domains to minimise the probability of multiple functionalisation.

Development of suitable interfaces was based on generation of protein resistant films. Therefore, several PEG systems were investigated. Functionalisation with PEG was done in two different ways: with PEG after surface activation and with PEG alkoxy silane derivatives. The latter case showed big advantages in creating thin films (< 2.5 nm). For these thin films packing densities and preparation methods strongly influenced cell resistant properties. Furthermore, in cell adhesion experiments increasing PEG layer thickness caused higher shielding of the embedded nano structure.

The main interest of the application was to determine how the density of the gold nano dots would influence biological behaviour of the molecular motor protein Eg5. Therefore, Eg5 was immobilized on gold arrays with different particle separations (45, 58, 73, 90, 110 nm) embedded in a protein resistant PEG matrix. This biofunctionalisation was showed to be specific to the gold particles. Thus, the amount of coupled Eg5 was related to the dot density. The gliding velocities of microtubules increased with the density of the gold dots and the surface concentration of Eg5 respectively. Furthermore, using high particle separation (110 nm) the motor velocities increased with microtubule length. This is in agreement with

the particle density effect: *The more Eg5 are involved in microtubules transport, the faster they are until a maximum speed is reached.* With these results, Eg5 is supposed to be a non processive motor, i. e. the motor detaches from the filament after each step. A second velocity driving effect was observed with changing salt concentration in used buffers. However, the particle density effect on velocity was maintained.

This study combines inorganic interfaces with organic coatings for biological investigations using physical methods. As such, the symbiosis of natural sciences enables new applications in motor protein research. Future investigations on other biological systems (e. g. Enzymes, DNA) are conceivable.

### 3 Einleitung

Aktive Bewegung ist eine der Eigenschaften, die das Leben definieren und Entwicklung möglich macht. An dieser biologischen Bewegung sind so genannte Motorproteine maßgeblich beteiligt. Diese transportieren Makromoleküle oder Molekülverbände indem sie chemische Energie in mechanische umwandeln. Seit Entdeckung der molekularen Motoren und durch die Entwicklung hochsensitiver und dynamischer Analyseverfahren hat sich ein weites Forschungsfeld zur Ergründung dieser einzigartigen Proteine entwickelt. In den letzten Jahren ist das Interesse an der Kinesin-5-Familie immer mehr gestiegen. Es handelt sich hierbei um homotetramere Motorproteine, die essentiell an der Bildung des Spindelapparats während der Mitose beteiligt sind. Eg5, ein Vertreter dieser Familie, ist seit einigen Jahren ein viel versprechendes Angriffsziel in der Krebsforschung. Im Hinblick darauf ist es jedoch notwendig, Grundlagenforschung bezogen auf dieses Motorprotein zu betreiben, um dieses besser zu verstehen. Zwei Charakteristika erschweren bislang gängige Untersuchungsmethoden, sowohl in Lösung als auch auf Oberflächen: Zum einen hat Eg5 die Eigenschaft, Mikrotubuli zu vernetzen und zum anderen physisorbiert es unkontrolliert auf Oberflächen. Ist man in der Lage, dieses Motorprotein spezifisch und konzentrationskontrolliert auf einer Oberfläche zu immobilisieren, so kann sein biologisches Verhalten unabhängig von seinen vernetzenden Eigenschaften studiert werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dieser Problematik. Es wird die Entwicklung biokompatibler Oberflächen vorgestellt. Diese basieren auf Goldnanstrukturen, die hälftig in eine proteinresistente Matrix eingebettet sind. Mit Hilfe dieser Grenzflächen wird das Motorprotein Eg5 erstmals erfolgreich durch seine systematische Dichtevariation auf Oberflächen untersucht. Prinzipiell stellen biofunktionalisierte Nanostrukturen an Grenzflächen ein universelles Werkzeug zur quantitativen Bestimmung der Kinetik und der Kraft von molekularen Motoren dar.

## 4 Kenntnisstand

### 4.1 Polyethylenglykole als proteinresistente Oberflächenbeschichtung

Polyethylenglykolbeschichtungen sind von großem medizinischem und biologischem Interesse, da sie unspezifische Adsorption von Proteinen verhindern können. Dieser proteinresistente Charakter in wässrigen Lösungen beinhaltet verschiedene mögliche Faktoren.<sup>1-3</sup> Nach dem Modell der sterischen Repulsion bewegen sich die langen PEG-Polymere rasch in Wasser und stoßen dadurch die sich nähernden Proteine ab.<sup>3</sup> Untersuchungen haben gezeigt, dass mit einer Erhöhung der Oberflächendichte, d.h. der Anzahl der pro Flächeneinheit gebundenen PEG-Moleküle, eine Verbesserung der Proteinresistenz einhergeht. Eine dichtere Anbindung bewirkt eine Bildung von Polymerbürsten, welche durch Streckung der PEG-Polymere verursacht wird und somit den Effekt der sterischen Barriere maximiert.<sup>2</sup> Nach der Theorie der Volumeneinengung (*engl.*: volume restriction theory), bei der das sich nähernde Objekt nicht durch die Polymerschicht auf der Oberfläche durchdrungen werden kann, wird die Volumenverkleinerung durch Kompression der Polymerschicht berücksichtigt. Damit verbunden ist eine Abnahme der Entropie der Makromoleküle, da ihre Einzelsegmente weniger Konformationen im komprimierten als im entspannten Zustand einnehmen können.<sup>3</sup> Im Gegensatz hierzu berücksichtigt die Theorie des Ausschlussvolumens (*engl.*: excluded-volume theory) ein mögliches durchdringen der sich nähernden Oberflächen. Die dabei auftretende Enthalpieänderung sowie die Entropieabnahme (s. o.) bewirken eine Zunahme oder Abnahme der freien Energie.<sup>3</sup> Auf das wässrige PEG-Protein-System angewandt ergibt sich durch eine solche Proteinannäherung eine Verdrängung von Wassermolekülen aus der PEG-Schicht und eine Kompression der Schicht selbst. Damit verbunden sind Enthalpiezunahme und Entropieabnahme und somit eine Zunahme der freien Energie. Daher werden Proteine nicht adsorbiert sondern abgestoßen.<sup>3</sup>

Die Oberflächenbedeckung  $\Gamma$  [ng/mm<sup>2</sup>] der PEG-Moleküle steht in direktem Zusammenhang mit der gemessenen Schichtdicke  $d$  und der Dichte  $\rho$  der PEG-Schicht:<sup>2</sup>

$$\Gamma = d\rho$$

Die Packungsdichte  $\Sigma$  [PEG-Ketten/nm<sup>2</sup>] ergibt sich aus:<sup>2</sup>

$$\Sigma = \Gamma N_A (10^{-21}) / M_n = 602.3 \Gamma / M_n$$

mit der Avogadrokonstanten  $N_A$  und Zahlenmittel des Molekulargewichts  $M_n$  (g/mol).

Den Abstand der einzelnen Ankerpunkten  $D$  [nm] (*engl.* grafting points) erhält man schließlich mittels:<sup>2</sup>

$$D = (4/\pi\Sigma)^{1/2}$$

Theoretische Arbeiten von de Gennes<sup>4</sup> ermöglichen mit Hilfe der oben ermittelten Packungsdichte  $\Sigma$  qualitative Aussagen über die Beschaffenheit der PEG-Filme. Voraussetzung sind ungeladene Polymerketten, welche an einem Ende an einer Oberfläche befestigt sind, und ein gutes Lösungsmittel. Hierfür beträgt der Flory-Radius:

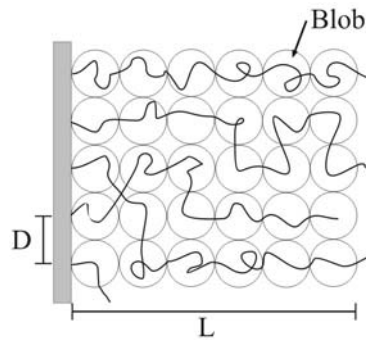
$$R_F = \alpha N^{3/5}$$

wobei  $\alpha$  die Größe des Monomers und  $N$  die Anzahl der Monomere im Polymer bezeichnen. Ist der Abstand der Ankerpunkte  $D$  der Polymerketten größer als der Flory-Radius, so bilden sich einzelne kugelförmige Polymersphären aus. Im Fall von  $D < R_F$  jedoch, wie es für hohe Packungsdichten nötig ist, welche für PEGs bessere Proteinresistenz<sup>2</sup> bewirken, unterteilt sich die Polymerketten in so genannte „Blobs“ (Abbildung 4-1) der Größe  $D$  und einer Monomerenzahl  $g_D$ , wobei folgende Gleichung gilt:

$$D = \alpha g_D^{3/5}$$

Die resultierende Schichtdicke  $L$  der sich im Lösungsmittel teilweise entfaltenen Polymerketten entspricht dann:

$$L \approx (N / g_D) D$$



**Abbildung 4-1:** Stark gestreckte oberflächengebundene Polymere in einem guten Lösungsmittel. Die Ketten sind hauptsächlich entlang der Oberflächennormalen gestreckt.<sup>4</sup>

Fick *et al.*<sup>11</sup> untersuchten mittels Neutronenbeugung in D<sub>2</sub>O das Quellverhalten eines Polyethylenglykolderivats (MG 2180) auf Gold. Sie konnten einen Anstieg der Schichtdicke von  $\sim 25 \text{ \AA}$  auf  $\sim 70 \text{ \AA}$  nachweisen. Dies entspricht 1.5 Wassermolekülen pro Ethylenglykoleinheit. Die Theorie von de Gennes<sup>4</sup> ergibt mit der gemessenen Schichtdicke in trockenem Zustand bei einer Dichte des PEGs<sup>16</sup> von  $1.2 \text{ g/cm}^3$  für die Dicke des Films in einem guten Lösungsmittel  $53 \text{ \AA}$ . Die berechnete Schichtdicke liegt unterhalb der experimentell ermittelten. In dieser Arbeit werden sämtliche Anwendungen der PEG-Schichten auf Oberflächen, sei es mit Zellen (Fibroblasten) oder mit molekularen Motoren (Eg5), in salzhaltigen wässrigen Lösungen durchgeführt (Zellmedien oder Puffer). In Gegenwart von Salzen kommt es in PEG-Filmen zu einem Aussalzeffekt, d.h. Kationen koordinieren mit den Sauerstoffatomen der Ethylenglykoleinheiten. Folglich werden Wassermoleküle aus der gequollenen PEG-Schicht verdrängt und der Quellgrad wird reduziert.<sup>5</sup> Erschwerend kommt hierbei hinzu, dass dieser Aussalzeffekt nicht direkt von der Ionenstärke sondern auch von der Art des Salzes abhängt,<sup>5,6</sup> ein Effekt, der bei Proteinen schon im 19. Jh. entdeckt wurde.<sup>7</sup> Somit wird in dieser Arbeit die berechnete Kettenlänge  $L$  in einem guten Lösungsmittel nach de Gennes<sup>4</sup> als Richtwert für qualitative Aussagen über die Schichtdicke in gequollenem Zustand herangezogen.

Die Anbindung der PEG-Filme auf ein Substrat lässt sich mit verschiedenen Methoden bewerkstelligen. Mit Ankergruppen<sup>8-10</sup> versehene PEGs lassen sich beispielsweise direkt auf das Substrat aufbringen.<sup>11-15</sup> Über einen Zweistufenmechanismus<sup>16-18</sup>, bei dem zunächst eine Aktivierung der Oberfläche durch Einführung einer reaktiven Gruppe durchgeführt wird, der dann die Umsetzung mit (aktiviertem) PEG folgt, sind ebenfalls Funktionalisierungen möglich. Eine weitere Funktionalisierungsmethode beruht auf ionischen Wechselwirkungen zwischen negativ geladenen Oberflächen und positiv geladenen PEG-Derivaten.<sup>19-21</sup> Physisorption des gewünschten PEGs auf der Oberfläche ist ebenfalls ein gängiges Verfahren, jedoch besteht hier das Problem des nachträglichen Ablösens.<sup>1</sup>

Proteinresistenz lässt sich ferner mit kurzkettigen Oligoethylenglykolen (OEG) erzielen, jedoch lässt sich diese Eigenschaft nicht mehr über die Theorie der sterischen Repulsion erklären. Da diese Systeme in dieser Arbeit nicht angewendet wurden, wird hier lediglich auf die Literatur verwiesen.<sup>22,23</sup>

## 4.2 Techniken der Strukturierung auf Oberflächen

### 4.2.1 Konventionelle Methoden

Die gängigsten Methoden zur Erzeugung von Strukturen auf Oberflächen sind einerseits die Lithographie und andererseits diverse Ätztechniken.<sup>24</sup> Bei der Lithographie unterscheidet<sup>25</sup> man zwischen optischer Lithographie, Röntgenstrahlolithographie, Elektronenstrahlolithographie und Ionenstrahlolithographie.

Mit der Elektronenstrahlolithographie sind unter geeigneten Bedingungen Strukturen unter 10 nm möglich.<sup>24,26</sup> Sie lässt sich ebenfalls mit unkonventionellen Methoden kombinieren (Kapitel 4.2.2).

Untersuchungen von Grunze *et al.*<sup>25-27</sup> haben gezeigt, dass Biphenylmonolagen sowohl auf Silizium-(111)- wie auch auf Gold-(100)-Oberflächen ein interessantes Verhalten unter Bestrahlung mit energiearmen Elektronen ( $< 1$  keV) aufweisen: Es lassen sich Strukturen erzeugen, die auf eine Vernetzung der Biphenyle zurückzuführen sind. Der Vernetzungsgrad ist von der Energiedosis der Elektronen abhängig. Werden substituierte Biphenyle verwendet, die eine Nitro- oder eine Nitrilgruppe als Kopfgruppe aufweisen, so wird diese bei dem Vernetzungsvorgang bis zur Aminogruppe reduziert. Untersuchungen auf Gold haben gezeigt, dass eine vollständige Reduktion der Nitrogruppe bei einer Energiedosis von  $40\,000\ \mu\text{C}/\text{cm}^2$  erreicht ist. Auf diese Weise ist es möglich, durch Bildung dieser reaktiven Aminogruppe, auf den erzeugten Strukturen unterschiedliche Moleküle wie Säureanhydride, Proteine u.v.a. anzubinden.

Mittels Elektronenlithographie wurden bereits ca. 20 nm breite aminoterminierte (d.h. chemisch definierte) Linien inmitten einer umgebenden Matrix aus nitroterminierten Molekülen auf aromatischen SAM-Oberflächen (*engl.*: self assembled monolayer; selbst aggregierende Monolagen) hergestellt.<sup>28</sup> Ähnliche Strukturen ließen sich ebenfalls auf aromatischen, nitroterminierten SAM-Oberflächen auf Siliziumoxid realisieren.<sup>29,30</sup>



### 4.2.2 Nicht-konventionelle Methoden

Diese Techniken basieren auf Selbstorganisation einzelner Moleküle bzw. von Molekülverbänden oder Clustern.<sup>24</sup> Mit den nicht-konventionellen Methoden sind kleinere Strukturen als mit konventionellen Mitteln realisierbar.<sup>24</sup> Beispiele sind Dip-pen Nanolithographie, Blockcopolymer Lithographie und chemische Lithographie.<sup>31</sup> Die in dieser Arbeit zur Anwendung kommende Methode wurde von Spatz *et al.* entwickelt.<sup>24</sup> Hierbei werden Nanopartikel verschiedener Metalle bzw. Metalloxide<sup>32-35</sup> (Au, Ag, Pd, Ni, Co) mit Hilfe eines durch anionische Polymerisation hergestellten Diblock-Copolymers (siehe Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3) auf unterschiedlichen Substraten (Glas, SiO<sub>2</sub>, GaAs, SrTiO<sub>3</sub>)<sup>24</sup> abgeschieden und mittels Plasma (Argon, Sauer- oder Wasserstoff, Chlor)<sup>24</sup> das organische Polymer von der Oberfläche geätzt (Abbildung 4-4).

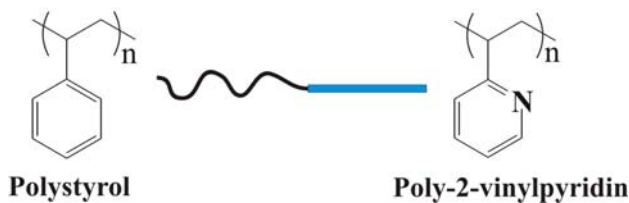


Abbildung 4-2: Ein Diblock-Copolymer besteht aus zwei chemisch verschiedenen Polymeren, welche kovalent an einer Stelle verbunden sind. Hier Polystyrol (PS) und Poly(2-vinylpyridin) (P2VP).

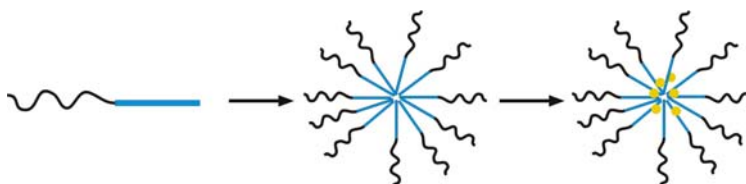


Abbildung 4-3: Das Diblock-Copolymer bildet in einem bestimmten Konzentrationsbereich in unpolaren Lösungsmitteln Mizellen aus, in denen sich die unpolaren Polystyrolketten nach außen und die polaren Poly-2-vinylpyridineinheiten ins Innere orientieren. Der polare Kern lässt sich nun mit Metallsalzen beladen.

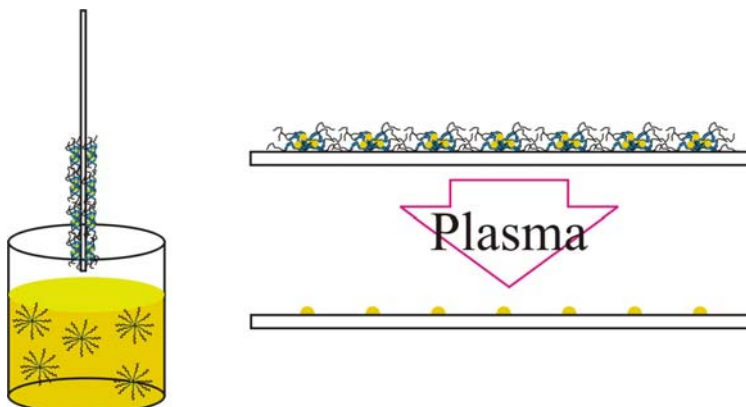
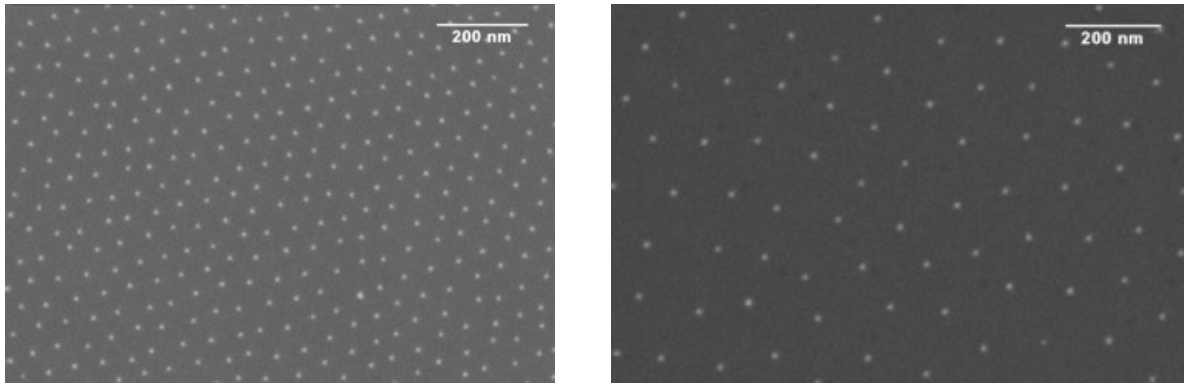


Abbildung 4-4: Das Aufbringen der beladenen Mizellen auf das Substrat wird dessen Eintauchen in die Polymerlösung bewerkstelligt. Durch anschließende Plasmabehandlung wird das Polymer weggeätzt und die Nanostruktur gebildet.

Es entstehen Nanostrukturen, die eine Vielzahl von Anwendungen ermöglichen.<sup>24</sup> Abbildung 4-5 zeigt zwei Beispiele solcher Nanostrukturen.



**Abbildung 4-5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zweier Goldnanopartikelstrukturen; [links] generiert mittels [PS(500)-*b*-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0.5</sub>(270)], Goldpartikeldurchmesser 5±1 nm; [rechts]: generiert mittels [PS(1780)-*b*-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0.5</sub>(525)], Goldpartikeldurchmesser 10±1 nm.**

Die Größe der Metallcluster ist im Bereich von 1 bis 15 nm variabel. Weiterhin kann der Abstand zwischen den einzelnen Partikeln je nach Herstellungsbedingungen und Polymerkettenlängen zwischen 30 und 200 nm<sup>a</sup> variiert werden.<sup>24</sup> Im Falle von Goldnanoclustern auf SiO<sub>2</sub> oder Glas sind die Partikel so fest gebunden, dass sie weder durch Spülen mit verschiedenen Lösungsmitteln noch durch die Behandlung im Ultraschallbad von der Oberfläche abtrennbar sind.<sup>24</sup>

Größere Abstände erhält man durch Kombination der hier vorgestellten Technik mit der Photo-<sup>24</sup> oder Elektronenstrahlolithographie.<sup>31,36</sup> Durch Bestrahlung der monomizellaren Schicht aus Polymer und Metallvorläufer mit Elektronen (1 keV, 10000 μC/cm<sup>2</sup>) bilden sich im Polymer der Mizellen Radikale, die entweder einer Rekombination und Quervernetzung<sup>37,38</sup> unterliegen oder bei Luftkontakt zu Carbonsäuren, Ketonen oder Aldehyden oxidiert werden.<sup>39</sup> Die Mizellen in nicht bestrahlten Bereichen können durch Behandlung der Oberfläche im Ultraschallbad mit DMF abgelöst werden (lift-off).<sup>31,36</sup> Wahrscheinlich sind die chemisch veränderten Bereiche der bestrahlten Mizellen auf Grund von Wechselwirkungen mit der hydrophilen Oberfläche weniger gut löslich und verbleiben deswegen auf dem Substrat.<sup>31</sup> Die Größe der fixierten Strukturen ist vom Mizellendurchmesser abhängig.<sup>31</sup> Durch anschließende Behandlung im Wasserstoffplasma erhält man Goldcluster in den bestrahlten Bereichen (Abbildung 4-6). Voraussetzung für eine Bestrahlung im Elektronenrastermikroskop ist eine Oberfläche aus einem leitfähigen Material wie z.B. Silizium, das die Elektronen abführen kann. Besitzt das Substrat – wie z.B. Glas – keine

<sup>a</sup> noch nicht veröffentlichte Daten. Mit freundlicher Genehmigung von Theobald Lohmüller, Max Planck Institut für Metallforschung, Stuttgart.

ausreichende Leitfähigkeit, so kann diese durch das Aufdampfen eines nur wenige Monolagen dicken Graphitfilms auf die Oberfläche hergestellt werden.<sup>36</sup>

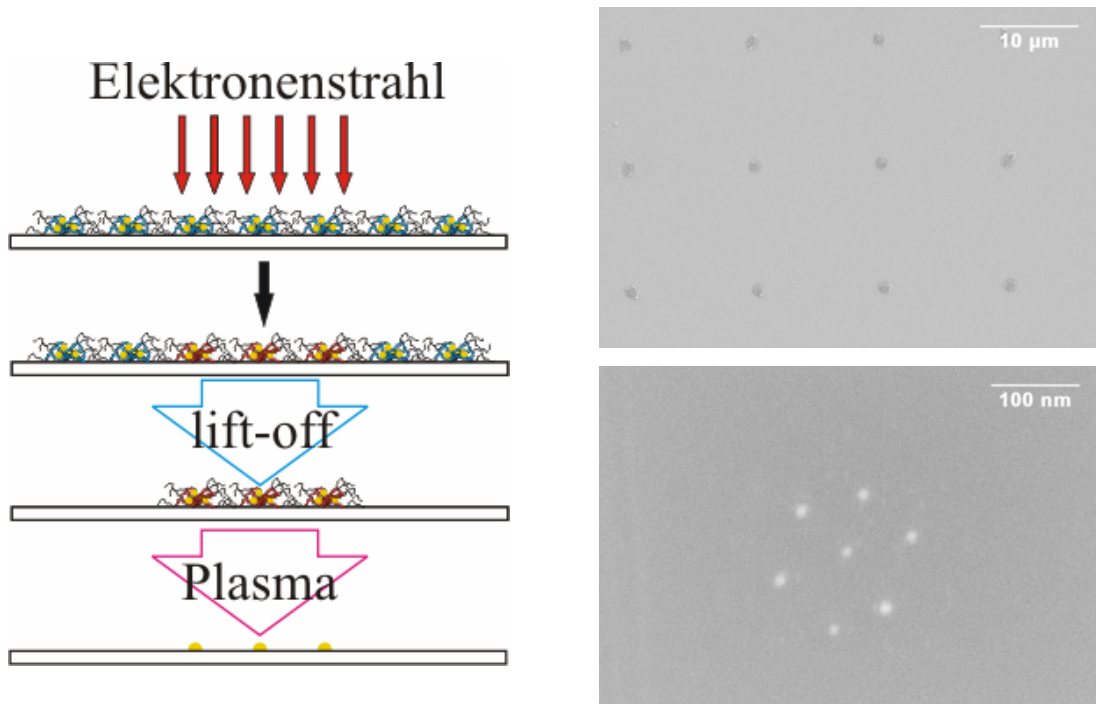


Abbildung 4-6: [links]: Schematische Darstellung der Mikro-nano-Strukturierung: mit Elektronen bestrahlte Mizellbereiche (1 kV, 10000 µC/cm<sup>2</sup>) bleiben nach dem lift-off (DMF, Ultraschallbad) auf dem Substrat zurück und bilden nach der Plasmabehandlung (Wasserstoff) die Nanostruktur; [rechts oben]: mit Elektronen fixierte Mizellen auf Silizium nach dem lift-off; [rechts unten]: Unterstruktur nach Plasmabehandlung.

## 4.3 Grundlagen der Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie (XPS)

### 4.3.1 Funktionsprinzip

Wird eine Oberfläche mit Röntgenstrahlen der Energie  $E = h\nu$  bestrahlt, so werden kernnahe Elektronen mit der Bindungsenergie  $E_B$  aus den Oberflächenatomen freigesetzt. Hierbei muss die Bindungsenergie des jeweiligen Elektrons geringer sein als die Energie der Röntgenstrahlen ( $h\nu > E_B$ ). Die emittierten Elektronen besitzen nach der Einstein'schen Formel die kinetische Energie:

$$E_{\text{kin}} = h\nu - E_B$$

Die kinetische Energie der freigesetzten Photoelektronen wird detektiert und ermöglicht so die Ermittlung der Ionisierungsenergie des Ursprungsatoms, woraus sich sowohl das jeweilige Element wie auch seine chemische Umgebung bestimmen lassen.

### 4.3.2 Chemische Verschiebung

Die Bindungsenergie eines Elektrons ist sowohl von der Art des Atoms, aus dem es stammt, wie auch von dessen chemischen Umgebung abhängig. In einem Molekül etwa verringern elektroneivere Substituenten die Elektronendichte des Atoms und erhöhen somit seine effektive Kernladung. Dies hat zur Folge, dass es zu einer stärkeren Anziehung der kernnahen Elektronen und somit zu einer höheren Bindungsenergie  $E_B$  kommt, was sich im XP-Spektrum durch Signale bei geringerer kinetischer Energie äußert. Gegenteilig wirken elektropositivere Substituenten. Die Änderung der Bindungsenergie kann im Bereich einiger eV liegen.

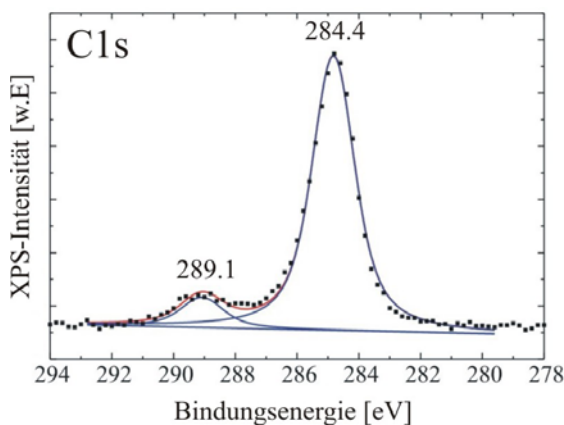


Abbildung 4-7: C1s-XP-Detailspektren von 11-Mercaptoundecansäure auf Gold

Abbildung 4-7 zeigt den Ausschnitt eines XP-Spektrums im Messbereich der Bindungsenergie von Kohlenstoff-1s-Elektronen. Die hier untersuchte Verbindung 11-Mercaptoundecansäure  $[\text{HS}-(\text{CH}_2)_{10}\text{-COOH}]$  enthält zwei Sorten von Kohlenstoffatomen mit unterschiedlichen Oxidationsstufen. Der Peak bei geringerer Bindungsenergie (284.4 eV) entspricht dem aliphatischen, der bei höherer (289.1 eV) dem acidischen Kohlenstoff.

### 4.3.3 Multiplettaufspaltung

Einige XPS-Peaks treten nicht als ein einzelnes Signal auf, sondern als ein Multiplettsignal. Für das Auftreten von Multiplettstrukturen sind zwei Prozesse verantwortlich:

#### *a) Spin-Bahn-Kopplung:*

Hierbei kommt es zu einer Wechselwirkung des Spins ( $s$ ) eines ungepaarten, kernnahen Elektrons mit dem Bahndrehimpuls ( $l$ ) des Orbitals. Der hieraus resultierende Gesamtbahndrehimpuls ( $j$ ) ist durch  $j = l + s$  gegeben.<sup>40</sup>

Da der Elektronenspin sowohl parallel ( $s = 1/2$ ) als auch antiparallel ( $s = -1/2$ ) zum Bahndrehimpuls ausgerichtet sein kann, gibt es zwei unterschiedliche Energiezustände.

Beispielsweise ergibt sich für das Au4f-Signal mit dem Bahndrehimpuls  $l = 3$  ein Gesamtbahndrehimpuls von  $j = 7/2$  bei paralleler und  $j = 5/2$  bei antiparalleler Ausrichtung des Elektronenspins  $s$ . Da es sich bei  $j = 7/2$  bzw.  $j = 5/2$  um zwei verschiedene Energiezustände handelt, kommt es zu einer Dublettaufspaltung des XPS-Signals. Diese beiden Signale werden als Au4f<sub>7/2</sub>- und Au4f<sub>5/2</sub>-Peaks bezeichnet. Der energetische Unterschied beträgt in diesem Fall etwa 3.7 eV.

Das Intensitätsverhältnis dieser beiden Signale wird durch die Besetzungswahrscheinlichkeit der verschiedenen Zustände bestimmt, welche wiederum durch die Multiplizität  $M = 2j + 1$  beschrieben wird. Es ergibt sich folglich für die Au4f-Signale ein Intensitätsverhältnis von 4 : 3.

Die Stärke der Spin-Bahn-Kopplung steigt mit der Ordnungszahl  $Z$  der Atome ( $\propto$  zu  $Z^4$ ) an. Diese Abhängigkeit wird deshalb auch Schweratomeffekt genannt.<sup>41</sup>

#### *b) Spin-Spin-Kopplung:*

Dieser Effekt tritt nur bei paramagnetischen Atomen oder Molekülen auf. Es kommt zu einer Wechselwirkung des austretenden Elektrons mit dem magnetischen Moment des zurückbleibenden ungepaarten Elektrons. Hierbei kommt es zu einer Aufspaltung der Signale.

### 4.3.4 Quantitative Analyse

Neben der qualitativen Analyse der chemischen Zusammensetzung von Festkörperoberflächen über die Lage der Signale lassen sich durch Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie auch quantitative Aussagen treffen.<sup>42</sup> Unter der Annahme, dass die Ionisationswahrscheinlichkeit eines kernnahen Elektronenniveaus praktisch unabhängig vom

Valenzzustand eines Elements ist (Koopman'sches Theorem), verhält sich die Signalintensität  $I_i$  eines Elements  $i$  proportional zu dessen Anteil in der Probe. Einen quantitativen Zugang zu der Messgröße der Signalintensität gibt folgender Ausdruck:

$$I_i = \sigma_i(h\nu) \cdot D(E_i) \int_{\gamma=0}^{\pi} \gamma \int_{\phi=0}^{2\pi} \phi L_i(\gamma) \int_x \int_y J_o(x, y) T(x, y, z, \phi, E_i) \cdot \int_z N_i(x, y, z) \cdot \exp[-d / \lambda_i(E_i) \cos \theta] dx dy dz d\phi d\gamma$$

$\sigma_i(h\nu)$	Wirkungsquerschnitt für die Emission eines Photoelektrons
$D(E_i)$	Empfindlichkeit des Detektors
$T$	Energieniveau des Rumpfelektrons
$\gamma$	Winkel zwischen Einfall- und Ausgangsrichtung der Röntgenstrahlung
$\phi$	Azimutwinkel (für die Rotation um die Analysatorenachse)
$L_i(\gamma)$	Winkelabhängigkeit der Photoemission (berücksichtigt die räumliche Ausdehnung der Orbitale)
$J_o(x, y)$	Fluss der Primärelektronen auf der Oberfläche $xy$
$x, y, z$	kartesische Koordinaten der Probenoberfläche
$T$	Transmission des Energieanalysators
$N_i(x, y, z)$	Teilchendichte von $i$ an der Stelle $x, y, z$
$d$	Dicke der vermessenen Schicht
$\lambda_i$	Abschwächungslänge der Photoelektronen
$\theta$	Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Analysatorachse

Da einige Parameter quantitativ nur schwer zugänglich sind (z.B. Detektorempfindlichkeit  $D(E_i)$  oder Photonenfluss  $J_o$ ) ist die angeführte Gleichung für eine numerische Auswertung zu komplex. Werden einige Variablen konstant gehalten, so vereinfacht sich die Formel.<sup>43</sup> Vernachlässigbar auf Grund ihres geringen Einflusses sind die Einflüsse durch die räumliche Ausdehnung der Atomorbitale  $L_i$  und der Öffnungswinkel des Analysators  $\phi$ . Die Integration über  $x$  und  $y$  vereinfacht sich, weil die bestrahlte Fläche relativ groß ist und gleichmäßig ausgeleuchtet wird. Unter der Annahme, dass die Photoelektronen unter den gleichen Bedingungen gemessen werden, kann mit relativen Signalintensitäten gerechnet werden und

die Bestimmung absoluter Intensitäten entfällt. Hieraus ergibt sich nach der Integration eine einfachere Gleichung für die Signalintensität:

$$I_i = \sigma_i \cdot N_i \cdot \lambda_i(E_i) \cdot T(E_i) [1 - \exp(-d_i / \lambda_i \cos \theta)]$$

Der Faktor  $[1 - \exp(-d_i / \lambda_i \cos \theta)]$  folgt aus der Summe aller Atome der Schicht mit der Dicke  $d$  von  $d = 0$  bis  $d = d_i$ . Der Wirkungsquerschnitt  $\sigma_i$  und die Abschwächungslänge  $\lambda_i$  ebenso wie die mittlere Ausdringtiefe oder effektive Abschwächungslänge können der Literatur entnommen werden<sup>44,45</sup>. Letztere lassen sich auch über Extrapolation bestimmen.<sup>23</sup> Die Detektionswahrscheinlichkeit von Elektronen unterschiedlicher Energie wird durch die Transmissionsfunktion  $T(E_i)$  berücksichtigt und muss für jede XPS-Anlage nur einmal ermittelt werden, solange an der apparativen Anordnung nichts verändert wird.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt die Intensitätsabnahme elektromagnetischer Strahlung beim Durchdringen von Materie definierter Zusammensetzung und Dicke:

$$I_x = I_x^0 \cdot e^{-\varepsilon cd}$$

$I_x$	Intensität nach der Transmission
$I_x^0$	Intensität vor der Transmission
$\varepsilon$	Absorptionskonstante des Mediums
$c$	Konzentration
$d$	Schichtdicke des Mediums

Für die Photoelektronen-Abschwächung in der Röntgen-Photoelektronen-Spektroskopie wird das Lambert-Beer'sche Gesetz in folgender Weise angewandt:

$$I_i = I_i^0 \cdot e^{-d/\lambda \cdot \cos \theta}$$

wobei gilt:

$$I_i^0 = \sigma_i \cdot N_i \cdot \lambda_i(E_i)$$

$I_i^0$  bezeichnet die Signalintensität einer unendlich dicken Referenzprobe der Reinsubstanz,  $d$  für die Dicke der abschwächenden Schicht,  $\theta$  den Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Analysatorachse und  $\lambda$  die Abschwächungslänge. Im Rahmen dieser Arbeit wurden

sämtliche Messungen bei konstantem Winkel ( $\theta = 0^\circ$ ) durchgeführt, wodurch sich die obige Gleichung nochmals durch den Wegfall des Terms  $\cos\theta$  vereinfacht.

$$I_i = I_i^0 \cdot e^{-d/\lambda}$$

Im Fall von inselartiger Bedeckung eines Moleküls **A** mit der Dicke  $a_A$  auf einem Substrat **i** lässt sich der Bedeckungsgrad  $\Theta_A$  folgendermaßen ermitteln:

$$I_i = I_i^0 \cdot [(1 - \Theta_A) + \Theta_A \cdot \exp(-a_A/\lambda)]$$

Zur Untersuchung verschiedener Molekülspezies auf Oberflächen existieren zwei Modelle, welche die Grenzfälle der möglichen Molekülanordnungen beschreiben:

*1) Schichtmodell:*

Grundlage dieses Modells ist eine streng geordnete, dicht gepackte Schicht aus chemisorbierten Molekülen, welche die gleiche Ausrichtung wie auch Anordnung haben.<sup>46</sup> Auf diese Methode soll nicht näher eingegangen werden, da sie in dieser Arbeit keine Verwendung fand.

*2) Statistisches Modell:*

Bilden zwei Verbindungen A und B auf einem Substrat eine Schicht, die zwar homogen (mit gleicher Schichtdicke **d**) ist, jedoch auf der statistischen Verteilung dieser beiden beruht, so können die Intensitätsverhältnisse der Signale von A und B über die folgende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{N_A}{N_B} = \frac{I_A}{I_B} \cdot \frac{\sigma_B}{\sigma_A} \cdot \frac{\lambda_B}{\lambda_A}$$

Soll beispielsweise die C:N-Stöchiometrie einer Schicht bestimmt werden, so setzt man in diese Gleichung für  $A = C$  und für  $B = N$ , sowie die aus der Literatur bekannten Werte für die Abschwächungslängen  $\lambda$  und die Wirkungsquerschnitte  $\sigma$  ein.

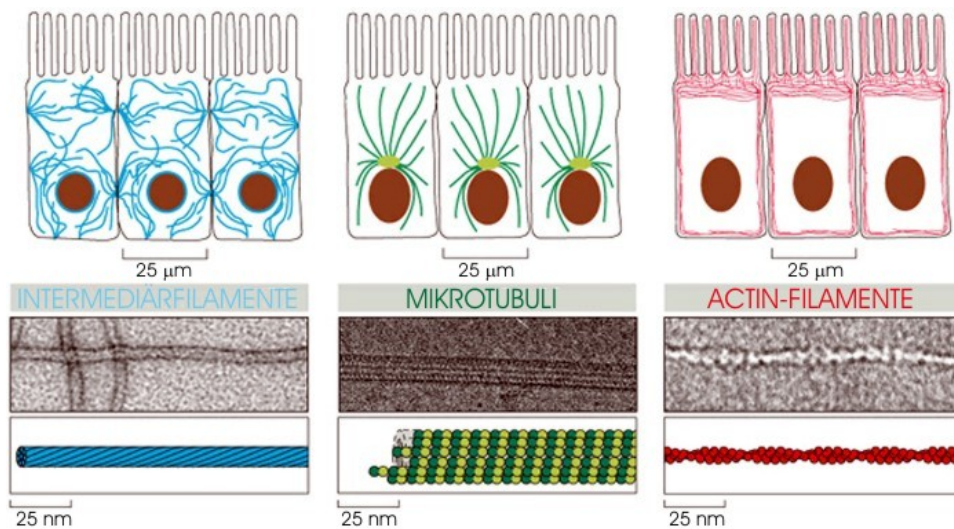


## 4.4 Biologischer Hintergrund

### 4.4.1 Das Cytoskelett

Das Cytoskelett ist ein komplexes Geflecht aus Proteinfilamenten, welches sich durch das ganze Cytoplasma von Eukariotenzellen erstreckt. Es befähigt die Zelle, verschiedene Formen anzunehmen und koordinierte, gerichtete Bewegung auszuführen. Seine hochdynamischen Eigenschaften, welche für Form, Teilung, Bewegung und Reaktion auf die Umgebung verantwortlich sind, unterscheiden es von einem Knochenskelett. Zudem gewährt es die Möglichkeit des aktiven Transportes innerhalb der Zelle z.B. von Organellen oder Chromosomen während der Mitose.<sup>47</sup>

Es werden drei Haupttypen von Proteinfilamenten unterschieden:



**Abbildung 4-8: Drei Haupttypen von Proteinfilamenten: Intermediärfilamente, Mikrotubuli und Aktinfilamente.**<sup>57</sup>

Bei den Aktin-Filamenten (Mikrofilamenten) handelt es sich um polare Homopolymere mit einem Durchmesser von ca. 9 nm, deren Grundbaustein Aktin in zwei Formen vorkommt, dem monomolekularem G-Aktin und dem polymeren filamentösen F-Aktin. Beide Aktinformen weisen ATPase-Aktivität (ATP = Adenosin-5'-triphosphat) auf.<sup>48</sup> Neben der mechanischen Stützfunktion können sich durch vielfältige Wechselwirkungen mit dem Protein Myosin auch kontraktile Einheiten bilden und somit Bewegungsvorgänge in der Zelle ermöglichen (z.B. Cytoplasmaströmungen und Aus- oder Einstülpungen der Zellmembran).<sup>49</sup> Intermediärfilamente mit ihrem Durchmesser von 8 bis 10 nm sind eine Gruppe verschiedener Filamente, die alle aus ihren eigenen Untereinheiten aufgebaut sind (z. B. Cytokeratine,

Vimentin, Desmin, Lamin). Zwei dieser Dimere lagern sich antiparallel zu einem Tetramer zusammen, die durch eine gestaffelte Kopf-an-Kopf-Anordnung so genannte Protofilamente aufbauen. Acht dieser Protofilamente bilden schließlich das Intermediärfilament, welches auf Grund des symmetrischen Aufbaus keine Polarität besitzt.<sup>48</sup> Hauptaufgabe der Intermediärfilamente besteht darin, mechanische Belastungen aufzufangen. Daher findet man sie vor allem in Epithelien, in denen sie quer durch die Zelle von Membran zu Membran ziehen und so die Zelle stabilisieren.<sup>47</sup> Mikrotubuli sind aus Tubulin aufgebaute Röhren mit einem Durchmesser von ca. 25 nm und haben wie die Aktinfilamente eine Polarität.<sup>48</sup> Mikrotubuli bilden die Leitstruktur für die Bewegung der Organellen in der Zelle<sup>50</sup> und Aufteilung der replizierten Chromosomen während der Mitose, ebenso sind sie Hauptbestandteil der Cilien.<sup>47</sup>

## 4.4.2 Mikrotubuli

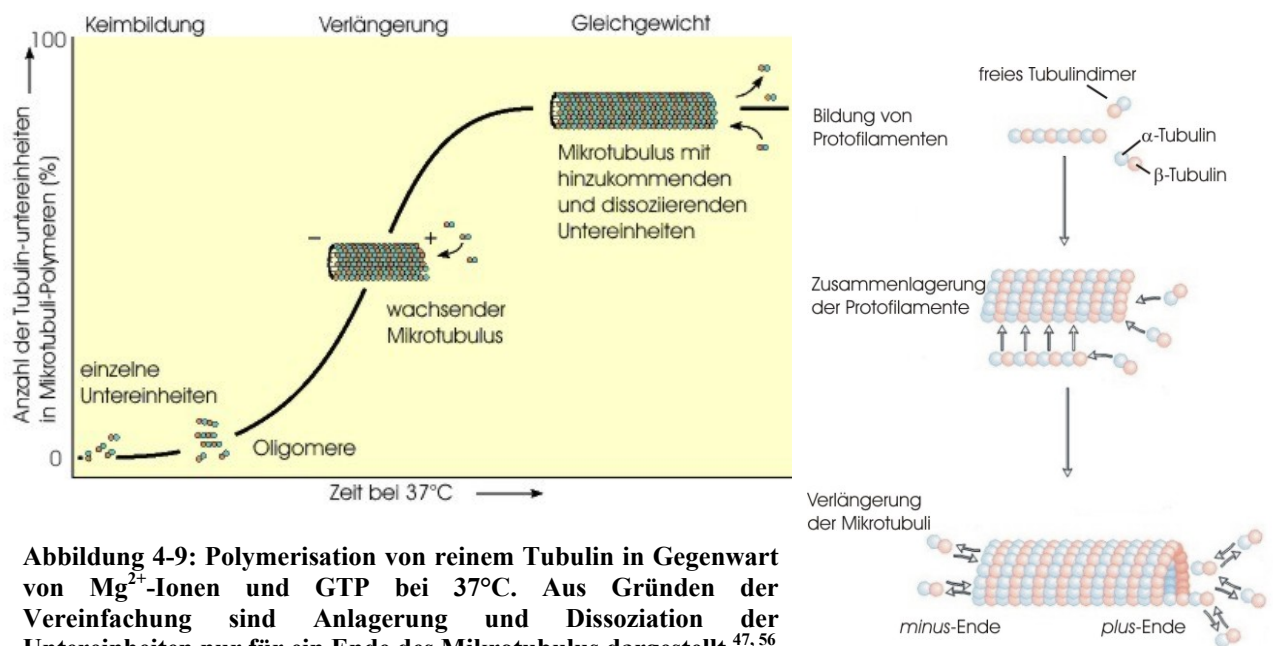
### 4.4.2.1 Aufbau, Struktur und dynamische Eigenschaften

Grundbaustein der Mikrotubuli bilden  $\alpha,\beta$ -Tubulinheterodimere.  $\alpha$ -Tubulin und  $\beta$ -Tubulin (Dimension:  $46 \times 40 \times 65 \text{ \AA}^{51}$ ) sind zwei in ihrer Primärsequenz eng verwandte Proteine mit einer Molmasse von etwa 50 kDa ( $\sim 450$  Aminosäuren;  $1 \text{ Da} = 1,66018 \times 10^{-24} \text{ g}$ ). Die Bildung des Heterodimers (Dimension:  $46 \times 80 \times 65 \text{ \AA}^{51}$ ) geschieht langsam und nur in Anwesenheit von Magnesium-Ionen und GTP (Guanosin-5'-triphosphat) bei  $37^\circ\text{C}$ , wobei die GTP-Bindungsstellen beider Monomere besetzt sein müssen. Gegenüber der erneuten Trennung in die Tubulinmonomere ist das Dimer stabil. Kleine Aggregate von drei oder mehr Heterodimerbausteinen bilden so genannte Nuklei. Dies ist der langsamste und somit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Mikrotubuligenese. Durch Aneinanderlagerung (*engl.*: elongation) der  $\alpha,\beta$ -Tubulindimere an die Nuklei entstehen so genannte Protofilamente. Gewöhnlich bilden 13 Protofilamente<sup>b</sup> durch axialversetzte seitliche Anlagerung (Versatz etwa  $0.9 \text{ nm}^{52}$ ) schließlich die helicale, hohle zylinderförmige Struktur der Mikrotubuli, jedoch sind Mikrotubuli aus 8 bis 20 Protofilamenten literaturbekannt.<sup>53</sup> Je nach Anzahl der Protofilamente weisen Mikrotubuli strukturelle Unterschiede auf. Die helicale

---

<sup>b</sup> Mikrotubuli aus 13 Protofilamenten weisen eine der Mikrotubuliachse parallele Anordnung der Protofilamente und einen Gangunterschied von 3 Monomeren auf, wodurch ein Versatz entsteht. Nach der N:S-Nomenklatur bezeichnet man diese als 13:3-Mikrotubuli, wobei N die Anzahl der Protofilamente und S den Gangunterschied beschreibt.

Anordnung der Heterodimere kann einen Gangunterschied von zwei, drei oder vier Monomeren aufweisen (*engl.*: two-, three-, four-start types), wobei im zweiten Fall ein Versatz im Mikrotubulus entsteht, bei dem einem  $\alpha$ -Tubulin ein  $\beta$ -Tubulin des benachbarten Protofilaments folgt. Die Protofilamente selbst können eine Superhelix bilden oder parallel zur Mikrotubulusachse ausgerichtet sein.<sup>54</sup> Auf Grund der unsymmetrischen Grundbausteine weisen Mikrotubuli eine strukturelle Polarität auf. Die  $\alpha$ -Tubulin exponierte Extremität wird *minus*-Ende und die  $\beta$ -Tubulin tragende *plus*-Ende genannt (Abbildung 4-9).<sup>47,56</sup> Beide Enden zeigen unterschiedliches Wachstumsverhalten (*plus*-Ende wächst schneller).<sup>52,55</sup>



**Abbildung 4-9: Polymerisation von reinem Tubulin in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen und GTP bei 37°C. Aus Gründen der Vereinfachung sind Anlagerung und Dissoziation der Untereinheiten nur für ein Ende des Mikrotubulus dargestellt.**<sup>47, 56</sup>

Im Gegensatz zum  $\alpha$ -Tubulin, welches GTP irreversibel bindet, wird im  $\beta$ -Tubulin das GTP in GDP und Phosphat ( $P_i$ ) hydrolysiert. Als Folge der Hydrolyse verändert sich die Konformation der Untereinheit und die Protofilamente nehmen eine gekrümmte Form an, die sich weniger gut in die Wand des Mikrotubulus einfügen lässt. Während der Wachstumsphase trägt der intakte Mikrotubulus eine GTP-Kappe<sup>55</sup>, d.h. die  $\beta$ -Tubulineinheiten haben GTP gebunden; diese schützt die GDP-haltigen Untereinheiten der Protofilamente vor konformationsbedingter Entspannung. Geht diese Schutzgruppe verloren kommt es zur fortschreitenden Auflösung des Mikrotubulus (Abbildung 4-10).<sup>47</sup>

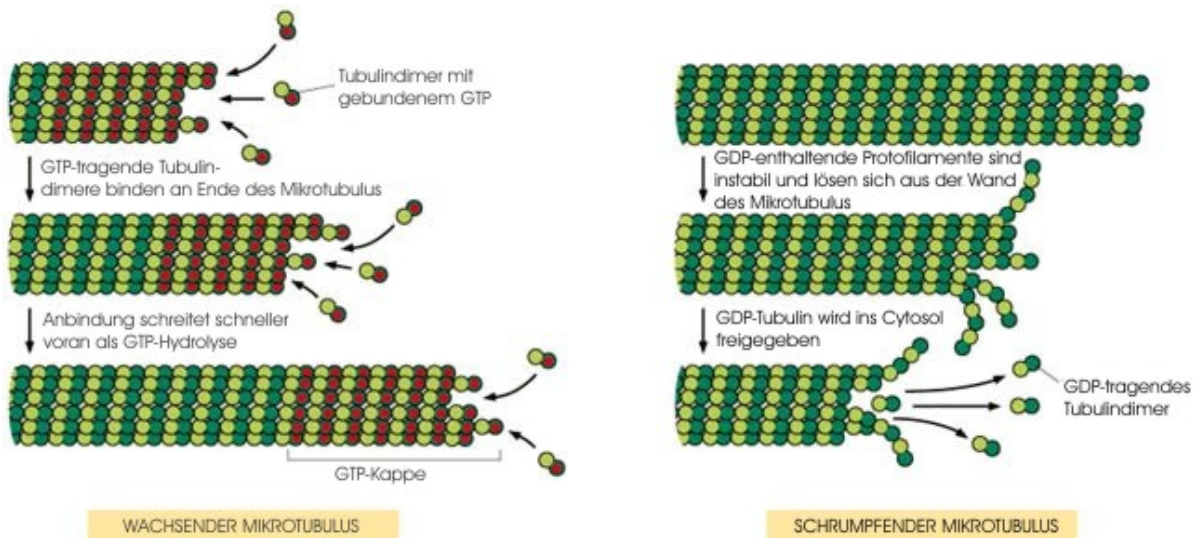


Abbildung 4-10: Wirkung der GTP-Kappe während der Wachstumsphase des Mikrotubulus. Geht diese Schutzfunktion verloren depolymerisiert der Mikrotubulus.<sup>57</sup>

Ein dynamisches Phänomen der Mikrotubuli, welches auf einseitiges Wachsen und anderseitiges Schrumpfen beruht, ist das so genannte „treadmilling“ (Tretmühlen-Mechanismus).<sup>55,58</sup> Bei bestimmten Konzentrationen an freien Tubulindimeren ist es möglich, dass die Geschwindigkeit der Addition von Untereinheiten am *plus*-Ende des Mikrotubulus höher ist als die GTP-Hydrolyse, während die Addition am *minus*-Ende langsamer verläuft als die Hydrolyse  $\{Cc(D) > [Tub] > Cc(T)\}^c$ . In diesem Fall bleibt das *plus*-Ende in T-Form (GTP-Kappe), das *minus*-Ende liegt aber in D-Form vor (GDP-tragende Tubulindimere). Folglich wächst der Mikrotubulus am *plus*-Ende, während er am *minus*-Ende schrumpft. Ist die Tubulinkonzentration größer als die kritische Konzentration  $Cc(D)$  bezogen auf *minus*-Ende, so wächst der Mikrotubulus an beiden Enden. Bei Konzentrationen unterhalb der kritischen Konzentration  $Cc(T)$  bezogen auf das *plus*-Ende schrumpft der Mikrotubulus an beiden Enden.<sup>66</sup> „Treadmilling“ konnte an freien Mikrotubuli in Zellen während der Interphase nachgewiesen werden.<sup>59</sup> Bei mitotischen Mikrotubuli wird dieser Vorgang als „flux“ bezeichnet.<sup>59,60</sup>

<sup>c</sup> Die frei werdende Energie bei der Hydrolyse von GTP zu GDP wird im Polymerverband gespeichert wodurch die Änderung der freien Energie bei der Dissoziation der D-Form größer ist als die freie Energie bei der Dissoziation der T-Form. Die kritische Konzentration  $Cc(D)$  entspricht numerisch der Gleichgewichtskonstanten  $K_D = k_{ab}/k_{an}$ , welche den Vorgang des Anlagerns bzw. des Abspaltens von Tubulindimeren an das GDP-tragende *minus*-Ende des Mikrotubulus beschreibt [entspr.  $Cc(T)$  für GTP-tragendes *plus*-Ende].  $Cc(D)$  ist stets größer als  $Cc(T)$ , da Mikrotubulus am *minus*-Ende langsamer wächst als an *plus*-Ende.  $[Tub]$  ist die Konzentration an freien GTP-tragenden Tubulindimeren in Lösung.

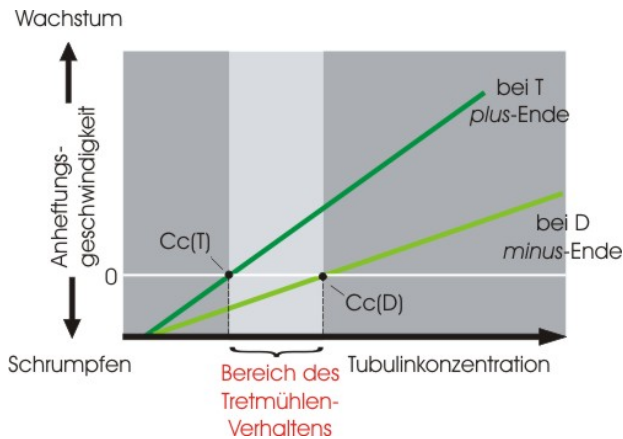


Abbildung 4-11: Der Tretmühlen-Mechanismus („treadmilling“) der Mikrotubuli wird durch die der Anheftung einer Untereinheit folgende Hydrolyse des GTP ermöglicht.<sup>66</sup>

Eine Kombination aus den erläuterten Abhängigkeiten des Mikrotubuliwachstums *in vitro* führt zur dynamischen Instabilität, d.h. der Mikrotubulus durchläuft alternierend Auf- und Abbauphasen. Hierbei depolymerisiert der Mikrotubulus bedeutend schneller als er wächst.<sup>59</sup>

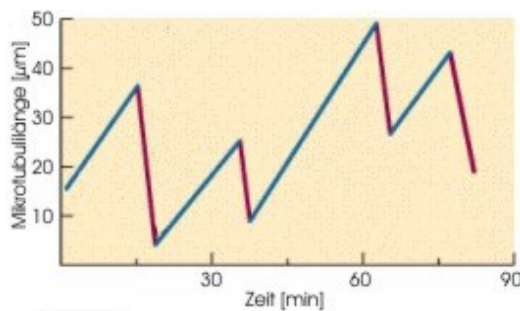


Abbildung 4-12: Dynamische Instabilität: [blau] Aufbauphase, [rot] Abbauphase, [Maxima] „katastrophenartiger“ Abbau wird initiiert (*engl.*: catastrophe<sup>61</sup>), [Minima] System erholt sich und leitet neue Aufbauphase ein (*engl.*: rescuing growth<sup>61</sup> oder rescue).<sup>62</sup>

Üblicherweise sind bei der *in vivo* Synthese die Mikrotubuli mit ihrem *minus*-Ende in einem gemeinsamen Zellorgan, dem so genannten MTOC (microtubule organising center) verankert.<sup>50</sup> Wachstum und Depolymerisation finden in der Zelle im Normalfall folglich nur am *plus*-Ende statt.<sup>47,59</sup> Die dynamische Instabilität *in vivo* zeigt eine Abhängigkeit vom Zellzyklus; in mitotischem Zellextrakt wurde 5 bis 10 mal mehr Übergänge zu Abbauphasen (*engl.*: catastrophes) nachgewiesen als in interphasischen Extrakten.<sup>63</sup> Ähnliches Verhalten zeigten Mikrotubuli aus mit GFP- $\alpha$ -Tubulin transfizierten Zellen.<sup>58,64</sup>

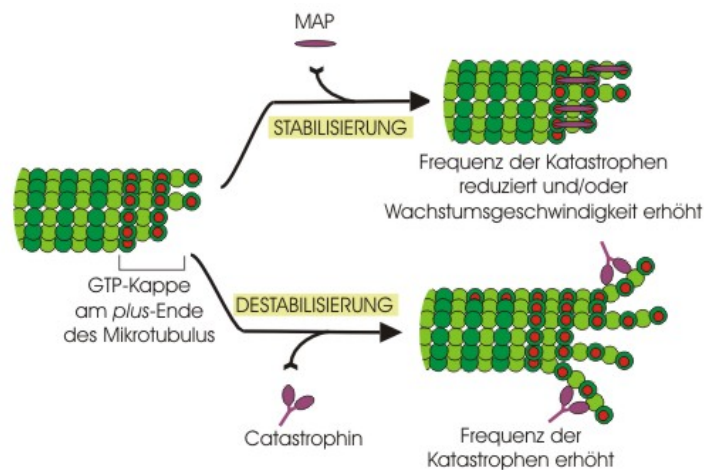
In den meisten Tierzellen entspringen die Mikrotubuli dem Centrosom in der Nähe des Zellkerns. Die Centrosomenmatrix ist faserartig und enthält mehr als 50 Kopien des  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -Tubulin-Ringkomplex), welche die Keimbildung der Mikrotubuli bewirkt. Im Centrosom eingeschlossen befindet sich ein Paar zylinderförmiger Centriolen, die rechtwinklig zueinander, d.h. in L-Form, orientiert sind.<sup>57</sup>

#### 4.4.2.2 Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs)

Einige Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) können Mikrotubuli gegen den Zerfall stabilisieren (z.B. Tau<sup>65</sup>, MAP4)<sup>66</sup>, Mikrotubuli-Netzwerke ausbilden und unterschiedliche biologische „Fracht“ transportieren<sup>58</sup>. Die Stabilisierung einiger MAPs beruht auf die Bindung an die Mikrotubuli und die dadurch hervorgerufene Hemmung der Dissoziation.<sup>56</sup> XMAP215 beispielsweise beschleunigt *in vitro* das Wachstum den Mikrotubuli um den Faktor 8.<sup>63</sup> Wird durch Phosphorylierung von XMAP215 seine Aktivität gehemmt, so trägt dies maßgeblich zur zehnfachen Erhöhung der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli bei, die unter Mitose beobachtet wird.<sup>66</sup>

Eine Untergruppe der MAPs ist in der Lage Wechselwirkungen zwischen Mikrotubulus und anderen Zellbausteinen zu vermitteln. Diese besitzt mindestens eine mikrotubulibindende Domäne, während eine andere nach außen weist.<sup>66</sup>

Im Gegensatz zu den stabilisierend wirkenden MAPs gibt es auch welche, die eine gegenteilige Wirkung erzielen. Catastrophin aus der Familie der Kinesine beispielsweise bindet vor allem an den Enden und verursacht die Herabsetzung der Energiebarriere, die es normalerweise für einen „katastrophenartigen“ Abbau zu überwinden gilt (Abbildung 4-13).<sup>67</sup>



**Abbildung 4-13: Die Wirkung von Proteinen, die an die Enden der Mikrotubuli binden: ein MAP (z.B. XMAP215) stabilisiert das Ende eines wachsendes Mikrotubulus und es ergeben sich dadurch längere, weniger dynamische Mikrotubuli. Im Gegensatz dazu wirkt Catastrophin destabilisierend und führt somit zu kürzeren und dynamischeren Mikrotubuli.**<sup>66</sup>

Eine für diese Arbeit essentielle MAP-Gruppe sind die molekularen Motoren, die in Kapitel 4.4.2.3 vorgestellt werden.

Ebenso wie mit den MAPs lässt sich auch mit anderen Wirkstoffen die Dynamik der Mikrotubuli beeinflussen. Colchicin (Abbildung 4-14) beispielsweise bindet mit hoher Affinität an die Tubulinheterodimere und verursacht auf diese Weise eine Struktur- bzw.

Konformationsänderung, welche die Bildung von Mikrotubuli verhindert.<sup>68</sup> Eine andere Möglichkeit besteht in der Stabilisierung der Mikrotubuli. Taxol (Abbildung 4-14) bindet an der Innenseite des Mikrotubulus, wobei es durch 1 bis 2 nm große Poren in der Wand des Mikrotubulus hindurch diffundieren kann.<sup>69</sup> Es unterdrückt die Depolymerisierung und fördert die Polymerisation.<sup>65</sup> Weiterhin bewirkt die Anbindung von Taxol eine Reduzierung der Protofilamente.<sup>70</sup> Selbst ein Mikrotubulusaufbau mit GDP-tragendem Tubulin ist in Gegenwart von Taxol möglich.<sup>71</sup> Weitere Effekte sind Strukturaufweitung<sup>70</sup> und Zunahme der Flexibilität.<sup>72,73</sup> Taxol wird als „antimitotisches Agens“ in der Krebstherapie eingesetzt, da es auf Grund der genannten Eigenschaften die Zellteilung inhibiert.<sup>68</sup>

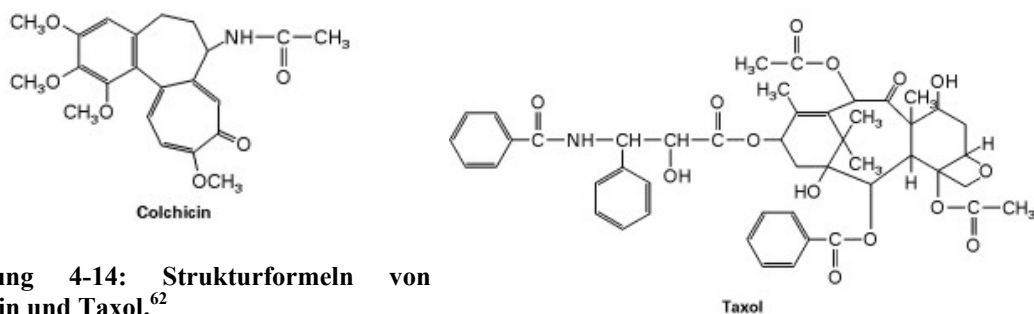


Abbildung 4-14: Strukturformeln von Colchicin und Taxol.<sup>62</sup>

#### 4.4.2.3 Motorproteine

Motorproteine sind in der Lage, chemische in mechanische Energie umzuwandeln. Sie binden an Aktinfilamente bzw. Mikrotubuli und vollziehen unter ATP-Hydrolyse Konformationsänderungen, welche die aktive Bewegung bewirken.<sup>74</sup> Es gibt drei Arten von Motoren: zum einen die Myosine, welche an Aktin binden, und zum anderen Dyneine bzw. Kinesine, welche sich auf Mikrotubuli entlang bewegen können.<sup>56,57,66,74</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch nur auf Mikrotubuli-assoziierte Motorproteine eingegangen werden.

Dyneine sind Motoren, die sich auf das *minus*-Ende des Mikrotubulus zubewegen. Sie weisen jedoch keine Verwandtschaft mit der Kinesin-Superfamilie auf.<sup>66</sup> Es handelt sich um sehr große Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 1000 kDa. Sie besitzen zwei oder drei schwere Ketten (MG 470-540 kDa), welche die Motordomänen bilden, und einer schwer ermittelbarer Anzahl an intermediären und leichten Ketten.<sup>56,66</sup> Die Dyneinfamilie hat zwei Hauptäste: zum einen die cytoplasmatischen Dyneine, welche vermutlich in allen eukariotischen Zellen vorkommen, wo sie z. B. für den Vesikeltransport und die Lokalisierung des Golgi-Apparats nahe dem Zentrum verantwortlich sind, zum anderen die Dyneine des Axonems, welche Heterodimere und Heterotrimere einschließen, die zwei oder drei Köpfe mit Motordomänen besitzen. Diese sind besonders auf rasches und leistungs-

fähiges Gleiten der Mikrotubuli spezialisiert (Schlagbewegung der Cilien und Flagellen). Dyneine sind die größten und schnellsten bekannten Motoren: *in vitro* Experimente mit axonemalen Dyneinen zeigten Geschwindigkeiten in Gleitexperimenten von 14  $\mu\text{m/s}$ .<sup>66</sup>

Die Superfamilie der Kinesine beinhaltet 14 Klassen, von denen nur wenige kurz umrissen werden sollen. Auf Grund der historischen Entwicklung der Kinesinforschung besteht keine einheitliche Nomenklatur. Führende Arbeitsgruppen haben eine universelle Namensgebung vorgeschlagen, welche Standardnamen der Form *Kinesin-x* ( $x = 1-14$ ) einführen.<sup>75</sup>

Kinesine sind in ihrer konventionellen Form (Kinesin-1<sup>75</sup>; Abbildung 4-16) verlängerte heterotetramere Proteine mit zwei schweren Ketten ( $\sim 110-130$  kDa) und zwei leichten Ketten ( $\sim 60-80$  kDa). Die eigentlichen Kinesinohomologe werden durch die schweren Ketten bestimmt. Diese schweren Ketten lassen sich in drei Bereiche unterteilen: die Motordomäne ( $\sim 40$  kDa)<sup>76</sup>, welche die ATPase- und mikrotubulibindende Einheiten beinhaltet, eine stabförmige Region und ein kugelförmiges Ende, welches mit den leichten Ketten interagiert.<sup>53</sup> Gewöhnlich befindet sich die Motordomäne am N-Terminus (sog. N-Kinesine<sup>77</sup>, KIN N<sup>67</sup>) der schweren Kette, der sich ein Bereich einer sich wiederholenden Siebenerfolge (abcdefg) aus Aminosäuren anschließt. Solche Sequenzen begünstigen die Ausbildung einer Doppelwendel (*engl.*: coiled-coil), sofern die Einheiten „a“ und „d“ unpolare Aminosäuren enthalten (Abbildung 4-15). Alle natürlichen auf solche Art aufgebauten Kinesine laufen in Richtung des *plus*-Endes des Mikrotubulus.<sup>74</sup> Kinesin verwandte Proteine (KRP; *engl.*: kinesin related proteins), welche die Motordomäne am C-Terminus (C-Kinesine<sup>77</sup>, KIN C<sup>67</sup> bzw. Kinesin-14<sup>75</sup>) haben, bewegen sich entgegengesetzt, d.h. in *minus*-Richtung.<sup>74</sup> Die bekanntesten Vertreter sind das *Drosophila ncd* und das Hefeprotein Kar3 und gehören in die Subfamilie der KIFC2-Proteine (Abbildung 4-16).<sup>53,66</sup> Untersuchungen an gentechnisch verändertem *Drosophila ncd* und an Chimären aus Kinesin und *Drosophila ncd* konnten zeigen, dass nicht die Motordomäne selbst sondern höchstwahrscheinlich der Bereich schweren Kette, welcher als Bindeglied zwischen Motordomäne und stabförmiger Verlängerung fungiert (*engl.*: neck), für die Vorzugsrichtung verantwortlich ist.<sup>76-79</sup> Eine dritte Möglichkeit der Anordnung der Motordomäne ist in der Mitte der schweren Kette (M-Kinesine<sup>77</sup>, KIN I<sup>67</sup> bzw. Kinesin-13<sup>75</sup>; Hauptvertreter gehören in die Subfamilie der KIF2-Proteine<sup>77</sup>; Abbildung 4-16). Sie besitzen keine typische Motoraktivität, stattdessen binden sie vorzugsweise an die Enden der Mikrotubuli und erhöhen die dynamische Instabilität. Auf Grund dieser Eigenschaft werden sie auch Catastrophine (vgl. Abbildung 4-13) genannt.<sup>66</sup> KIF1A und KIF1B sind Mitglieder einer ungewöhnlichen Kinesinfamilie, die als Monomer wirken können.<sup>80</sup>



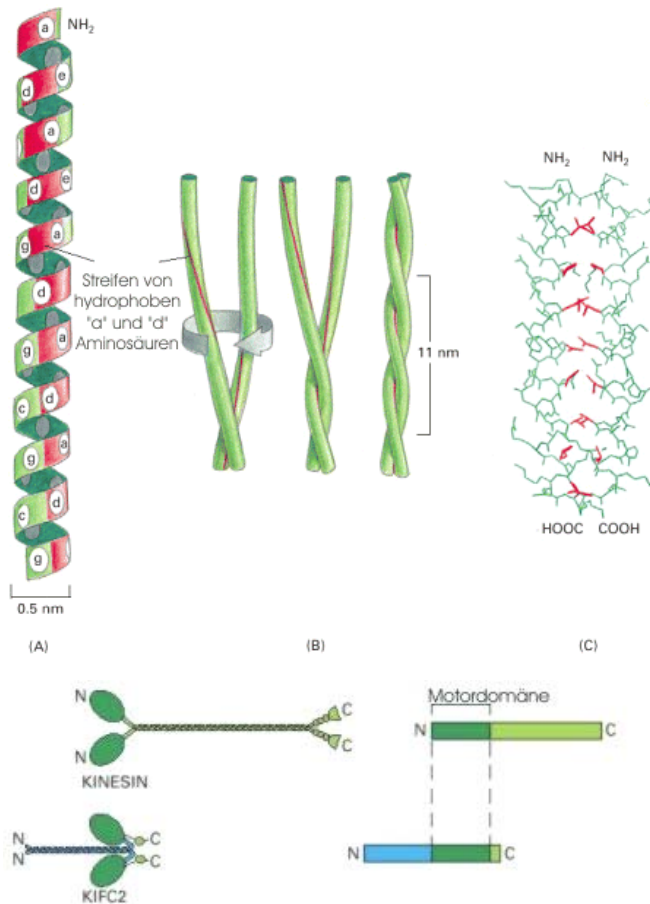


Abbildung 4-15: Struktur einer Doppelwendel: [A] einzelne  $\alpha$ -Helix mit der sich wiederholenden Siebenerfolge „abcdefg“. Die unpolaren Aminosäuren „a“ und „d“ liegen nahe beieinander (roter Streifen). [B] zwei derartige  $\alpha$ -Helices drillen sich so umeinander, dass sich die unpolaren Seitenketten der gegenüberliegenden Stränge zusammenlagern, während die stärker hydrophilen Aminosäureseitenketten dem wässrigen Milieu ausgesetzt bleiben. [C] Durch Röntgenkristallographie analysierte atomare Struktur einer Doppelwendel (rote Seitenketten sind unpolar).<sup>66</sup>

Abbildung 4-16: Kinesin und Kinesin verwandte Motoren.<sup>66</sup>

Auf Grund einer grundlegenden Eigenschaft lassen sich Motorproteine in zwei Gruppen einordnen, zum einen prozessive und zum anderen nicht prozessive Motoren. Die Prozessivität beruht auf der Möglichkeit des Proteins eine Schrittfolge auf dem Filament durchzuführen ohne sich dabei von diesem zu lösen<sup>81</sup> oder genauer: die Wahrscheinlichkeit des Ablösens nach einem Schritt ist sehr gering.<sup>82</sup> Monomere Kinesine mit nur einer Motordomäne sollten nicht prozessiv sein<sup>81,82,83</sup>, jedoch wurde von prozessivem KIF1A (vgl. Abbildung 4-16) berichtet.<sup>80,84</sup> Das konventionelle Kinesin ist das besterforschte Beispiel eines prozessiven Motors.<sup>85</sup> Je nach Versuchsbedingung kann ein Kinesin im Mittel zwischen 0,6 und 5  $\mu\text{m}$  auf einem Mikrotubulus wandern, ohne sich zwischenzeitlich abzulösen.<sup>82</sup> Diese „Laufstrecke“ (engl.: run length)<sup>86</sup> gilt als Maß für die Prozessivität. Bei einer Schrittweite von 8 nm<sup>87,88</sup> entspricht dies 75 bis 625 Einzelschritten. Eine Folge seiner Prozessivität ist, dass mit Kinesin selbst bei geringen Oberflächenkonzentrationen ( $<1/\mu\text{m}^2$ ) ein Transport der Mikrotubuli in einem gliding assay<sup>d</sup> möglich ist.<sup>89</sup> Im Gegensatz dazu führt ein nicht

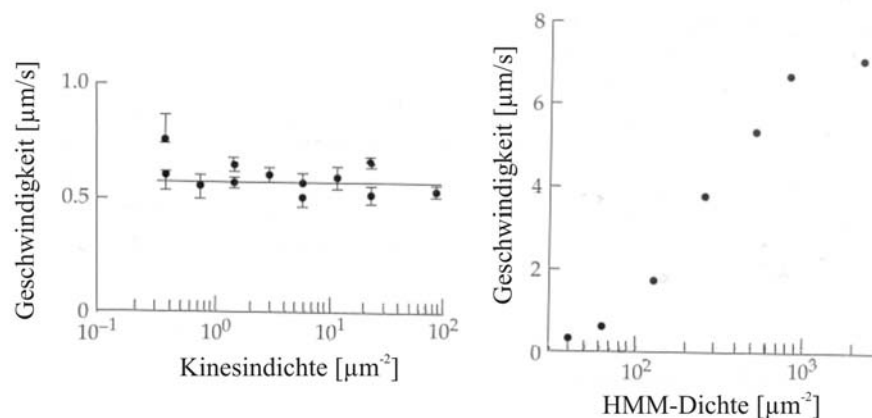
<sup>d</sup> in einem gliding assay wird der „natürliche“ Bewegungsablauf invertiert, d.h. die Motoren sind an einer Oberfläche immobilisiert und bewegen die Filamente (Mikrotubuli oder Aktin).

prozessiver Motor immer nur einen Schritt durch und löst sich danach ab. Demnach sind für einen gliding assay mehr Motorproteine auf der Oberfläche nötig als bei prozessiven Motoren.<sup>89</sup> Myosin II, verantwortlich für die Muskelkontraktion, ist das bekannteste Beispiel eines nicht prozessiven Motors;<sup>85</sup> etwa 4000 Moleküle/ $\mu\text{m}^2$  sind hier für einen gliding assay nötig.<sup>89</sup> Im Falle des HMM (*engl.*: heavy meromyosin)<sup>89</sup> sind es etwa 600/ $\mu\text{m}^2$  und beim monomeren Kinesin<sup>81</sup> etwa 20/ $\mu\text{m}^2$ . Da die „Laufstrecke“ für alle nicht prozessiven Motoren ihrer Schrittweite entspricht, bedarf es für quantitative Aussagen einem anderen Konzept, das sowohl prozessive als auch nicht prozessive Motorproteine gleichermaßen erfasst. Ein Motorprotein verbraucht pro Schritt ein Molekül ATP.<sup>82,87</sup> Die Menge an ATP-Molekülen, die in einer Sekunde hydrolysiert wird, bezeichnet man als  $k_{\text{ATPase}}$ , dessen Maximum, so wird angenommen, der aus ATPase Experimenten<sup>e</sup> ermittelten Größe  $k_{\text{cat}}$  entspricht.<sup>89</sup> Hohe ATPase-Raten eines Motors sind jedoch nicht zwangsläufig mit hoher Geschwindigkeit gleichzusetzen.<sup>89</sup> Grundsätzlich steigt  $k_{\text{ATPase}}$  bei Kontakt des Motors mit dem Filament bezogen auf seinen freien Zustand.<sup>89</sup> Während eines ATP-Hydrolysezyklus ist die Motordomäne zeitweise gebunden und zeitweise ungebunden. Der Quotient aus der Zeit, die ein Motor während eines ATP-Hydrolysezyklus am Filament gebunden ist ( $t_{\text{gebunden}}$ ) und der Gesamtdauer eines Hydrolysezyklus ( $t_{\text{gesamt}}$ ) ist der so genannte „duty ratio“ ( $r = t_{\text{gebunden}} / t_{\text{gesamt}}$ ).<sup>85</sup> Die Anzahl an Motorköpfen, die für einen kontinuierlichen Transport nötig ist, steht mit ihm in direktem Zusammenhang ( $r \approx 1/N_{\text{min}}$ ).<sup>89</sup> Bei Kinesin beträgt der „duty ratio“ mindestens 0.5 pro Motordomäne<sup>74,85</sup> wobei beide Domänen außer Phase<sup>f</sup> sind.<sup>74,87</sup> Somit ist zu jedem Zeitpunkt in einem gliding assay eine Motordomäne an einen Mikrotubulus gebunden. Daraus ergibt sich eine Proportionalität zwischen der Gleitgeschwindigkeit und  $k_{\text{ATPase}}$ . Dies hat zur Folge, dass die Gleitgeschwindigkeit der Mikrotubuli unabhängig von der Kinesinkonzentration auf der Oberfläche ist (Abbildung 4-17).<sup>81,89,90</sup> Im Gegensatz dazu liegt der „duty ratio“ bei Myosin II nur im Bereich von 0.01 bis 0.02.<sup>89</sup> Dies bedeutet, dass Myosin II während 98 - 99 % der Zeit eines ATP-Hydrolysezyklus nicht an das Filament gebunden ist. Je mehr Myosinmotoren in dieser Zeit sukzessiv einen Schritt auf dem Filament durchführen und sich wieder ablösen, umso

<sup>e</sup> zu einer Pufferlösung, die sowohl die Filamente als auch eine bekannte Menge an Motorprotein enthält, wird ATP gegeben und dessen Verbrauch ermittelt. Auftragung der Filamentkonzentration gegen den Verbrauch an ATP pro Motorkopf pro Sekunde ( $k_{\text{ATPase}}$ ) ergibt durch Extrapolation für  $[\text{Filament}] \rightarrow \infty$   $k_{\text{cat}}$ .

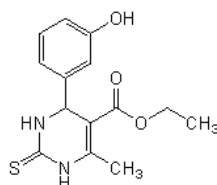
<sup>f</sup> bedeutet hier, dass beide Motordomänen zu jedem Zeitpunkt der aktiven Bewegung unterschiedliche Stadien im ATP-Hydrolysezyklus einnehmen.

schneller ist dessen Gleitgeschwindigkeit. Somit nimmt diese in einem gliding assay mit fallender Dichte an nicht prozessiven Motorproteinen ab (Abbildung 4-17).<sup>89</sup>



**Abbildung 4-17** [links] Mikrotubulgeschwindigkeit als Funktion der Kinesindichte; [rechts] Aktin-geschwindigkeit als Funktion der HMM-dichte.<sup>89</sup> Die Geschwindigkeit des prozessiven Kinesins ist unabhängig von seiner Oberflächendichte, während das unprozessive HMM eine deutliche Abhängigkeit aufweist.

Das für diese Arbeit relevante Motorprotein Eg5 (aus *Xenopus laevis*) wird in die Unterklasse der N-2-Kinesine<sup>77</sup>, Kinesin-5<sup>75</sup> bzw. BimC<sup>91</sup> eingeordnet.<sup>92</sup> Dieser homotetramere Motor<sup>93</sup> ist essentiell zur Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose.<sup>77</sup> Die Vermutung, Eg5 könne Mikrotubuli antiparallel verschieben<sup>94,95</sup> konnte kürzlich *in vitro* nachgewiesen werden.<sup>96</sup> Es handelt sich um einen dem *plus*-Ende gerichteten langsamen Motor,<sup>97,98</sup> der wohl den „flux“ mitotischer Mikrotubuli beeinflusst.<sup>99</sup> Die *in vivo* ermittelte Geschwindigkeit beträgt 1.1 µm/min<sup>89</sup>, *in vitro* wurden Geschwindigkeiten von 0.7-0.8 µm/min<sup>93,100</sup> bzw. 1.0-1.2 µm/min<sup>96,101</sup> für tetrameres Eg5 gemessen. Dimere Eg5-Fragmente ergaben *in vitro* Werte von 2.1<sup>97</sup> und sogar 3.8<sup>102</sup> µm/min. Kinetische Untersuchungen an einem dimeren Eg5-Konstrukt weisen auf ein unprozessives Verhalten des Motors hin.<sup>103</sup> Im Gegensatz hierzu lassen neuste Untersuchungen von Kapitein *et al.*<sup>96</sup> Vermutungen auf prozessives Verhalten von Eg5 zwischen zwei Mikrotubuli zu. Eg5 ist seit einigen Jahren ein viel versprechendes Angriffsziel in der Krebsforschung.<sup>104,105</sup> Durch Inhibierung des Motorproteins mit Monastrol<sup>101,104-106</sup> (Abbildung 4-18) wird die Ausbildung des Spindelapparates während der Mitose gestört und somit die Zellteilung unterdrückt, was durch längerfristigen mitotischen Stillstand zur Apoptose führt.<sup>104</sup>



**Abbildung 4-18: Monastrol**

## 4.5 Aufgabenstellung und Strategie

Im Rahmen dieser Arbeit sollten sowohl Entwicklung wie auch Anwendung biofunktionalisierter Goldnanostrukturen auf Glas durchgeführt werden. Abbildung 4-20 skizziert den dafür vorgesehenen Ansatz. Kontrollierte Anbindung von Biomolekülen an Glasoberflächen sollte mit Hilfe der Goldnanostrukturen (Kapitel 4.2.2) bewerkstelligt werden. Um unspezifische Immobilisierung des Polypeptids auf den Glaszwischenräumen zu vermeiden wurden unterschiedliche Polyethylenglykole (PEGs) untersucht (Kapitel 6.1). Voraussetzungen an diese proteinresistenten Glasbeschichtungen waren zum einen dünne Filme, die eine nachträgliche Biofunktionalisierung der Goldpartikel ermöglichen sollten und somit in ihrer Schichtdicke die Goldstruktur nicht überragen durften, zum anderen musste eine spezifische Anbindung der PEGs auf das Glas gewährleistet werden. Es sollten zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt werden:

- a) Anbindung eines reaktiven Ankers für PEGs an die Glasoberfläche und anschließende Umsetzung mit PEGs unterschiedlicher Kettenlänge (Kapitel 6.1.1)
- b) Anbindung unterschiedlicher PEGs auf Glas, die bereits eine glasspezifische Ankergruppe besitzen (Kapitel 6.1.2)

Zur Anbindung von Polyethylenglykolen an einer Silizium- oder einer Glasoberfläche sollten diese in Caro'scher Säure oder im Sauerstoffplasma gereinigt und demzufolge gleichzeitig durch Erzeugung einer hydroxyterminierten Oberfläche aktiviert werden. An diese sollte nach (a) 3-Glycidyloxypropyltriethoxysilan (GOPTES) bzw. -trimethoxysilan (GOPTMS) mittels Selbstaggregation angebunden werden. Anschließend sollten die nun epoxyterminierte Oberfläche über zwei Tage einer Schmelze verschiedener Polyethylenglykole ausgesetzt werden.<sup>16</sup> Der Vorgang der Reaktion ist in Abbildung 4-19 dargestellt (hierzu verwendete PEGs siehe Tabelle 4-1). Im Gegensatz hierzu sollten nach (b) mit Triethoxysilylgruppen funktionalisierte PEG-Derivate unterschiedlicher Kettenlängen über Selbstaggregation direkt an Glas bzw. auf die native Oxidschicht von Silizium gebunden werden.

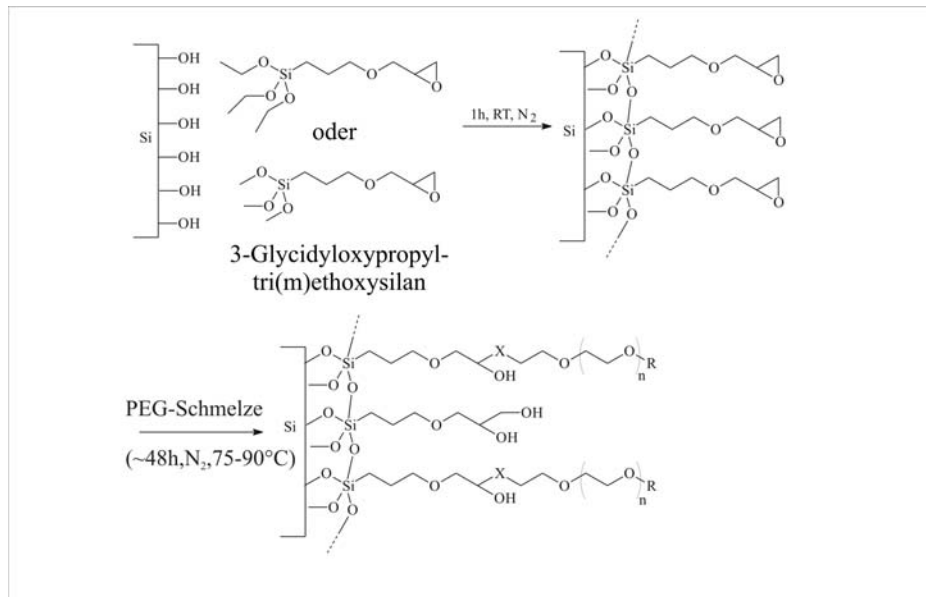


Abbildung 4-19: Schematische Darstellung der Kopplungsreaktion auf einer mit 3-Glycidyoxypropyl-tri(m)ethoxysilan aktivierten Oberfläche

PEG-Gruppe:		MG:	Monomerenzahl:	Abk.:
Hydroxy-terminierte PEGs:	$\text{HO-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_3$	350	7	mPEG
		750	16	
		2000	45	
Amino-terminierte PEGs:	$\text{H}_2\text{N-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_3$	6000	136	PEG
		750	15	
		2000	43	
		5000	113	mPEGA
		10000	227	
20000	455			

Tabelle 4-1: Verwendete Polyethylenglykole zur Anbindung an eine mit GOPTES bzw. GOPTMS behandelte Glas- oder Siliziumoberfläche;

Alle PEG-Beschichtungen sollten mittels XPS charakterisiert und mit Hilfe von Zelladhäsions- und Proteinadsorptionsexperimenten auf ihre Zell- und Proteinresistenz untersucht werden (Kapitel 6.1.3 und 6.1.4).

Es sollten schließlich zwei unterschiedliche Anwendungen der in eine PEG-Matrix eingebetteten Goldnanostruktur untersucht werden, zum einen Zelladhäsion (Kapitel 6.4.1), zum anderen die Anbindung des Motorproteins Eg5 und dessen aktiven Transport von Mikrotubuli (Kapitel 6.4.2). Zur Immobilisierung von Eg5 waren drei verschiedene Arten denkbar: Physisorption (direkt), Chemisorption (über Aktivester) und affine Bindung (über Antikörper). Nach Determinierung der geeigneten Bedingungen sollte durch Variation der

Goldstruktur (Abstände und Größe der Goldpartikel), welche im direkten Zusammenhang mit der Oberflächenkonzentration an Eg5 steht, ihr Einfluss auf die Geschwindigkeit der Mikrotubuli erforscht werden.

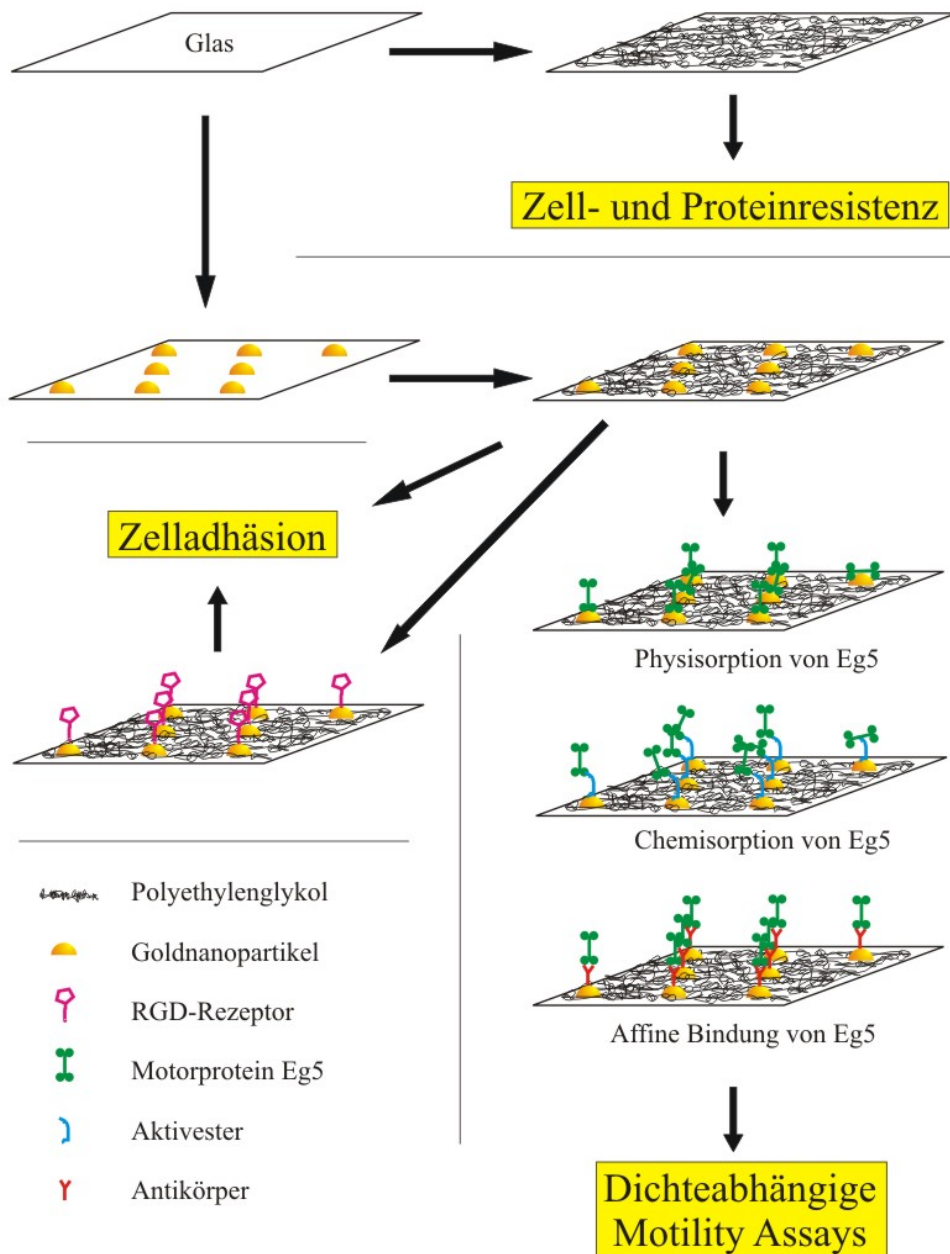


Abbildung 4-20: Schematische Darstellung der Aufgabenstellung und der geplanten Durchführung

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeine Angaben

Auf Grund der Luft- und Feuchtigkeitsempfindlichkeit einiger synthetisierter Verbindungen wurden die entsprechenden Umsetzungen sowie deren Adsorptionsversuche auf Gold, Silizium<sup>§</sup> und Glas unter Inertgasatmosphäre durchgeführt (Stickstoff der Firma Messer Griesheim, Qualität 4.6).

Zum Bedampfen der Glas- und Siliziumproben mit Metallen bzw. mit Graphit wurde das MED 020 Coating System der Firma Bal-Tec verwendet.

Punkt Trocknung mit überkritischen CO<sub>2</sub> wurde mit dem CPD 030 Critical Point Dryer der Firma Bal-Tec durchgeführt.

Plasmabehandlung wurde im Plasma System 100-E der Firma TePla bewerkstelligt. Sämtliche verwendete Gase wurden von der Firma Messer Griesheim bezogen (Wasserstoff, Qualität 5.0; Sauerstoff, Qualität 4.5; Argon 4.8)

Ultrazentrifugation wurde in Polycarbonat Zentrifugengläser (Beckmann) im Rotor TLA 100 (Beckmann) in einer Optima<sup>TM</sup> MAX Ultrazentrifuge (130000 rpm; Beckmann Coulter) durchgeführt. Zentrifugation der Mikrotubuli wurde mit einer Zentrifuge Typ 5417C der Firma Eppendorf bewerkstelligt. Die verwendeten Spin-Filter (0.1 µm; Ultrafree®-MC) stammten von der Firma Millipore.

Photolithographie wurde mit einem MJB 3 Maskaligner der Firma Karl Suss bewerkstelligt. Als Photoresist diente AR-P 5350 und als Entwickler AR-300-47 der Firma Allresist.

Die verwendeten Lösungsmittel wurden über Molekularsieb 3 Å der Firma Carl Roth GmbH & Co. getrocknet und aufbewahrt.

---

<sup>§</sup> Die in dieser Arbeit durchgeführten Funktionalisierungen von Silizium wurden auf der nativen Oxidschicht des Siliziums durchgeführt.

Ethanol (p.A.) wurden von der Firma J. T. Baker, die Diblock-Copolymere (siehe Tabelle 5-3) von Polymer Source Inc., Aceton (p.A.) von AppliChem, Catalase (aus *aspergillus niger*) von Serva, Adenosin-5'-triphosphat (ATP) bzw. Adenosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)-triphosphat (AMP-PNP) von Roche, anti-PentaHis-Antikörper von Qiagen, Elvanol (Mowiol 4-88) von Serafon (Israel) und PBS-Tabletten (phosphate buffered saline), DMEM (Dubelco's Modified Essential Medium), FBS (fötales Rinderserum) und L-Glutamin von GIBCO erworben.

Methanol (p.A.), Ethylacetat (p.A.), Toluol (p.A.), Dimethylformamid (p.A.) und Aceton (p.A.), D-Glukose (für Biochemie), Magnesiumdichlorid (p.A.), Natriumchlorid (p.A.), 30 %-iges Wasserstoffperoxid (Suprapur), Glycerin (reinst) sowie Kieselgel-60-beschichtete Aluminiumfolien ohne UV-Indikator zur Dünnschichtchromatographie wurden von der Firma Merck bezogen.

PEG-6000 lieferte die Firma Acros, Biotin-HPDP die Firma Pierce und 96 %-ige Schwefelsäure die Firma Carl Roth.

Die heterobifunktionalen PEG (Methoxy- und Aminoterminiert) der Molmassen 750, 2000, 5000, 10000 und 20000 sowie  $\beta$ -Mercapto-N-polyethylenglykol-propionsäureamid der Molmasse 3000 wurden von der Firma Rapp Polymere bezogen.

Avidin, deuteriertes Chloroform (99.9 %), 11-Mercaptoundecansäure (95 %), und Glutaraldehyd (25 % in Wasser) stammten von der Firma Aldrich.

Von Fluka wurden Polyethylenglykolmonomethylether (MG 350, 750, 2000), 3-Isocyanatopropyltriethoxysilan (95 %), 3-Glycidyloxypropyltriethoxysilan (97 %), 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (97 %), Tween-20, N-Hydroxysuccinimid, Triethylenglykoldimethylether (99 %) und Dimethylsulfoxid (DMSO; p.A.) bezogen.

Phalloidin-TRITC, FITC-IgG, Maus anti-Human Vinculin, Glukoseoxidase (Typ-II aus *aspergillus niger*), Pipes, Albumin aus Rinderserum (BSA), Ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetat (EGTA), Taxol (Paclitaxel), Methylcellulose (400cP) 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS; 99.5 %) und Tetrachlor-goldsäure-Trihydrat (99.999 %) stammten von Sigma bezogen.



30 %-iges Wasserstoffperoxid, Dioxan und Essigsäureethylester (techn.) wurden im Chemikalienlager des Theoretikums Heidelberg erworben.

Sowohl Tubulin (unmarkiert, TAMRA, Alexa-488 und NEM) als auch das Motorprotein Eg5 wie auch das sein trunkierte dimeres Konstrukt Eg5sh wurden von Dr. Thomas Surrey *et al.* (Europäisches Labor für Molekularbiologie, Heidelberg) und das cyclische Oligopeptid RGD(T1) wurde von Prof. Kessler *et al.* (Technische Universität München) zur Verfügung gestellt.

## 5.2 Analysemethoden

### 5.2.1 NMR-Spektren

$^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden mit einem Bruker AC-300-Spektrometer bei 300 MHz bzw. bei 75.47 MHz aufgenommen. NMR-Spektren wurden auf das Lösungsmittel normiert [ $\text{CDCl}_3$ :  $\delta$  (H) = 7.24 und  $\delta$  (C) = 77.0] und Signalmultiplizitäten folgendermaßen abgekürzt:

s = Singulett	d = Dublett	t = Triplett	q = Quartett
m = Multipllett	$m_c$ = zentriertes Multipllett		bs = breites Signal

### 5.2.2 Massenspektroskopie

Für die MALDI-Massenspektren wurde ein Biflex-Gerät der Firma Bruker verwendet.

### 5.2.3 Mikroskopie

Mikroskopische Untersuchungen wurden im Falle der Zelleexperimente mittels Axiovert 25, Axioplan 2 und LSM 5 Pascal durchgeführt; als Objektive dienten ein 10x/0.25 Ph 1 A-plan, ein 20x/0.45 Ph 2 A-plan und ein 40x/1.2 C-Apochromat Wasserimmersionsojektiv. Für motility assays wurden sowohl ein Axiovert 10 wie auch ein Axiovert 135TV eingesetzt; als Objektive wurden sowohl 40x/1.3 Plan-Neofluar wie auch 63x/1.4 Plan-Apochromat Ölimmersionsojektive eingesetzt. Alle genannten Mikroskope und Objektive stammten von der Firma Carl Zeiss AG. Zur Digitalisierung wurden CCD-Kameras (Photometrics

CoolSNAP cf bzw. HQ) der Firma Roper Scientific und Software (Metamorph V4.r9 bzw. Metaview V6.1r1) der Firma Universal Imaging Corp. verwendet.

#### 5.2.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Mikroskop der Firma LEO Typnummer 1530 bei einer Beschleunigungsspannung von 3 bis 10 kV und einem Druck kleiner  $5 \times 10^{-6}$  mbar durchgeführt.

#### 5.2.5 Röntgen-Photoelektronen-Spektren

XP-Spektren wurden an einem MAX-200-Spektrometer der Firma Leybold-Heraeus aufgenommen. Als nicht-monochromatisierte Röntgenquelle dienten eine Aluminiumanode mit einer Energie der  $K\alpha_{1,2}$ -Linie von 1486.6 eV. Zur Detektion der Elektronen wurde ein Energieanalysator EA 200 verwendet, die Linienbreite betrug 0.9 eV.<sup>107</sup>

Durch Aufnahme eines Übersichtsspektrums konnten sowohl Proben- bzw. Signalposition (Verschiebung auf Grund von Aufladungseffekten) als auch das Vorhandensein etwaiger Verunreinigungen festgestellt werden. Anschließend wurden von jeder Atomspezies Detailspektren zur genaueren Quantifizierung aufgenommen. Die Detektionswahrscheinlichkeit, die vom Wirkungsquerschnitt des Elements und von dessen Lage im Probenmaterial abhängt, bestimmt die Messdauer im entsprechenden Energiefenster.

Orbital	Startenergie [eV]	Endenergie [eV]	Schrittweite [meV]	Verweilzeit [ms]	Passenergie [eV]	Scans
Au4p3/2, O1s	560	520	200	40	48	10
O1s	545	510	200	40	48	10
N1s	410	390	200	250	48	10-15
C1s	295	275	200	10	48	10
S2p	175	150	200	250	48	10-15
Si2p	110	85	200	40	48	10
Au4f	100	70	200	10	48	10
Übersicht	1000	-5	400	10	96	5-10

Tabelle 5-1: Messparameter für die gemessenen XP-Spektren

Die elementspezifischen Wirkungsquerschnitte  $\sigma$  können der Literatur entnommen werden.<sup>108</sup> Für die einer quantitativen Analyse unterzogenen Elemente ergaben sich, normiert auf C1s = 1, folgende Parameter:

Orbital	Au4p <sub>3/2</sub>	O1s	N1s	C1s	S2p	Si2p	Au4f
$\sigma$	-	3.08	1.84	1	1.69	-	-
$\lambda$ [Å]	20.2	20.3	21.5	24.0	29.8	35.2	36.9

**Tabelle 5-2: Elementspezifische Wirkungsquerschnitte  $\sigma$ <sup>108</sup> und deren Abschwächungslänge  $\lambda$ <sup>26</sup>**

Mit der Bestrahlungsdauer der untersuchten Filme steigen allerdings auch die durch die Röntgenstrahlung induzierten Schäden; somit muss ein sinnvoller Kompromiss zwischen Auflösung und Strahlenbelastung getroffen werden.

Die im Spektrometer integrierte Ionenkanone (Fine Focus Ion Source IQE-12/38; Leybold-Heraeus) wurde zum Reinigen von Substraten und schichtweisen Abtragen von Polymerfilmen eingesetzt [Emissionsstrom 10 mA, Beschleunigungsspannung 4 kV, Scanweite 6x6 mm<sup>2</sup>, Argon-Basisdruck 5x10<sup>-4</sup> mbar (Argon 5.0; Messer-Griesheim)].

### 5.3 Analyse der XPS-Signale

Zur Durchführung einer quantitativen Analyse müssen die gemessenen Rohdaten normiert (siehe Kapitel 5.3.1) und schließlich angepasst werden. In der Regel ist auch eine Korrektur des Untergrundes notwendig. Sowohl die Darstellung der Spektren als auch die quantitativen Daten wurden mit dem Programmpaket Origin 3.78 der Firma Microcal durchgeführt. Das darin enthaltene Unterprogramm „Peak Fitting Module“ ermöglichte die Signalanpassung.

#### 5.3.1 Normierung

Um eine Vergleichbarkeit von Messungen an unterschiedlichen Spektrometern zu gewährleisten müssen die gemessenen XPS-Daten bezüglich der apparativen Bedingungen normiert werden, indem das erhaltene Spektrum durch die für jede Messapparatur spezifische Transmissionsfunktion dividiert wird.

Messungen auf homogenen Goldoberflächen wurden bezüglich des  $\text{Au}4f_{7/2}$ -Signals (84 eV), Messungen auf Silizium bezüglich des  $\text{Si}^0 2p$ -Signals (99.4 eV) und Messungen auf Glas bezüglich des  $\text{Si}^{+IV} 2p$  (103.3 eV) kalibriert.

### 5.3.2 Untergrundkorrektur

Da der Untergrund in der Regel auf Grund inelastisch gestreuter Sekundärelektronen zu höheren Bindungsenergien ansteigt, kann es bei den Signalen zu beträchtlichen Asymmetrien kommen. Daher ist eine Korrektur des Untergrundes der Messsignale notwendig, ehe deren quantitative Analyse möglich wird. Als Standardverfahren gelten die lineare Untergrundkorrektur sowie Untergrundkorrekturen nach Shirley<sup>109</sup> und Tougaard<sup>110</sup>.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei allen Messsignalen eine Untergrundkorrektur nach Shirley<sup>109</sup> durchgeführt.

### 5.3.3 Signalanpassung

Das Flächenintegral des XPS-Signals eines Elements ermöglicht die Bestimmung seiner Konzentration auf der Oberfläche. Den Spektren werden zur Ermittlung des Integrals eine oder die Summe aus mehreren mathematischen Funktionen angepasst, wobei die Anzahl der vorgegebenen Kurven der Anzahl der vorhandenen Spezies entspricht. Aus der Summe der Teilintensitäten ergibt sich die Gesamtintensität.

Für die Signalanpassung kommen sowohl die Gauß- als auch die Lorentz-Funktion in Frage. Der Intensitätsverlauf eines Röntgensignals entspricht einer Lorentz-Funktion.<sup>111</sup> Die Lebensdauer des angeregten Elektronenzustandes im Anodenmaterial bestimmt dabei die natürliche Halbwertsbreite. Da alle Anodenatome die gleiche Strahlung emittieren, wird dies als homogene Verbreiterung<sup>112</sup> bezeichnet.

Die Gestalt des Messsignals weicht aber bedingt durch verschiedene Einflüsse von der Lorentz-Charakteristik ab. Hierfür sind maßgeblich Relaxationseffekte innerhalb des Probenmaterials als Folge der Photoemission und die Auflösung des Analysators verantwortlich. Außerdem gibt es für die Emissionsquellen in kondensierter Materie eine Vielzahl unterschiedlicher lokaler Umgebungen, so dass dem ursprünglichen Signal viele individuelle Beiträge überlagert sind. Da verschiedene Quellen zu diesen Prozessen einen Beitrag leisten, wird die resultierende Signalverbreiterung inhomogen genannt.<sup>112</sup> Diese den statistischen Schwankungen unterworfenen Vorgänge besitzen Gauß-Charakter.

Lorentz-Kurven haben im Vergleich zu Gauß-Kurven eine geringere Halbwertsbreite und eine breitere Basis bei gleicher Fläche. Jedem XPS-Signal sollte nun eine Kurve mit unterschiedlichen Verhältnissen von Gauß- und Lorentz-Anteil optimal angepasst werden. Im Rahmen dieser Arbeit finden die Voigt-Profile mit einem festen Verhältnis von Gauß- zu Lorentz-Anteilen von 4:1 Anwendung.

## 5.4 Bestimmung der Mikrotubuligeschwindigkeit

Die Transport der fluoreszenzmarkierten Mikrotubuli durch das an der Oberfläche gebundene Motorprotein Eg5 wurde Digital mit einer CCD-Camera erfasst. Auf Grund der geringen Geschwindigkeit der Mikrotubuli wurde alle 10 s eine Aufnahme getätigt. Die anschließende Geschwindigkeitsanalyse wurde mittels eines speziell geschriebenen Analyseprogramms<sup>h</sup> (IDL 6.0; Interactive Data Language, Research System Inc., CO, USA) durchgeführt. Dabei wurden die Koordinaten (x|y) der Spitze eines Mikrotubulus bei jeder dritten Aufnahme (entspricht 30 s) manuell erfasst und über den Satz des Pythagoras die jeweilige Momentangeschwindigkeit des Mikrotubulus bestimmt. An die daraus resultierende Geschwindigkeitsverteilung wurde ein Gauß-Profil angepasst.

## 5.5 Synthese der Substrate

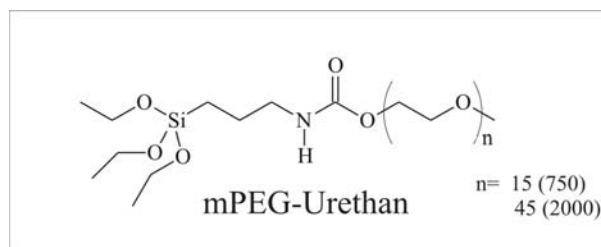
### 5.5.1 (3-Triethoxysilyl-propyl)-carbamidsäure-( $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol)-ester

Eine Lösung von 10.5 mmol Polyethylenglykolmonomethylether (MG 750 bzw. 2000) in 140 ml trockenem Dioxan wurde unter Schutzgas mit 10.5 mmol 3-Isocyanatopropyl-triethoxysilan und 99.6 mg (0.89 mmol) 1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan (DABCO) versetzt und 24 h unter Rückfluss gekocht, anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und im Feinvakuum getrocknet. Zur Aufreinigung wurde das erhaltene Rohprodukt in trockenem Toluol (p.A.) gelöst und mit der vierfachen Menge trockenem Cyclohexan (p.A.) überschichtet. Der nach 24 h erhaltene Niederschlag wurde mit kaltem, trockenem Cyclohexan (p.A.) gewaschen und im Feinvakuum getrocknet. (3-Triethoxysilyl-propyl)-carbamidsäure-( $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol-750)-ester (**1**) wurde in Form eines weißen Wachses (89 %) und (3-Triethoxysilyl-propyl)-carbamidsäure-( $\omega$ -methoxy-polyethylen-

---

<sup>h</sup> geschrieben von Christian Schmitz, Biophysikalische Chemie, AK Prof. Spatz, Universität Heidelberg.

glykol-2000)-ester (**2**) als weißes Pulver (94 %) erhalten. Im Laufe dieser Arbeit wird (**1**) als mPEG750-Urethan und (**2**) als mPEG2000-Urethan abgekürzt.



### mPEG750-Urethan (**1**):

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 0.54$  ( $m_c$ , 2H, Si- $\underline{\text{CH}}_2$ ), 1.15 (t,  $^3J = 7.0$  Hz, 9H, O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_3$ ), 1.54 ( $m_c$ , 2H, Si- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ ), 3.08 ( $m_c$ , 2H,  $\underline{\text{CH}}_2$ -N), 3.30 (s, 3H, O- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 3.55-3.70 (sh, 60H, O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -O), 3.74 (q,  $^3J = 7.0$  Hz, 6H, O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_3$ ), 4.13 ( $m_c$ , 2H, CO-O- $\underline{\text{CH}}_2$ ), 5.05 (bs, 1H,  $\underline{\text{NH}}$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 7.3$  (Si- $\underline{\text{CH}}_2$ ), 18.0 (Si-O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_3$ ), 23.0 (Si- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ ), 43.1 ( $\underline{\text{CH}}_2$ -NH), 58.1 (Si-O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_3$ ), 58.7 (O- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 63.4 (CO-O- $\underline{\text{CH}}_2$ ), 68.3 (CO-O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ ), 69.3-72.1 (O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -O), 156.0 (C=O);

### MS MALDI :

$M_n = 904$ ;  $M_w = 932$ ;  $M_w / M_n = 1.03$

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i} \quad (\text{Zahlenmittel}); \quad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i^2}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i} \quad (\text{Gewichtsmittel})$$

### mPEG2000-Urethan (**2**):

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta = 0.54$  ( $m_c$ , 2H, Si- $\underline{\text{CH}}_2$ ), 1.14 ( $m_c$ , 9H, O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_3$ ), 1.53 ( $m_c$ , 2H, Si- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ ), 3.08 ( $m_c$ , 2H,  $\underline{\text{CH}}_2$ -N), 3.30 (s, 3H, O- $\underline{\text{CH}}_3$ ), 3.55-3.70 (sh, 180H, O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_2$ -O), 3.74 ( $m_c$ , 6H, O- $\underline{\text{CH}}_2$ - $\underline{\text{CH}}_3$ ), 4.13 ( $m_c$ , 2H, CO-O- $\underline{\text{CH}}_2$ ), 5.05 (bs, 1H,  $\underline{\text{NH}}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ):

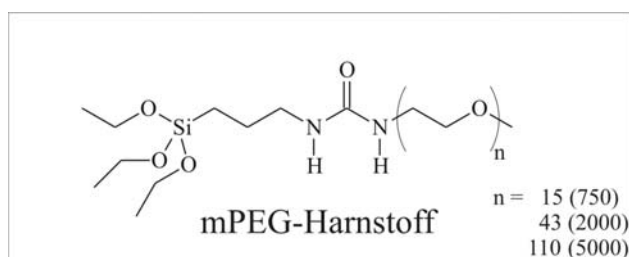
$\delta = 7.4$  (Si- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 18.1 (Si-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 23.1 (Si- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 43.2 ( $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -NH), 58.2 (Si-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 58.7 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 61.9 (CO-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 63.6 (CO-O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 69.4-72.1 (O- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ -O), 156.1 (C=O).

**MALDI:**

$M_n = 2252$ ;  $M_w = 2269$ ;  $M_w / M_n = 1.01$ .

### 5.5.2 N-3-Triethoxysilylpropyl-N'- $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol-harnstoff

Eine Lösung von 2 g  $\omega$ -Amino-polyethylenglykolmonomethylether (MG 750, 2000 bzw. 5000) in 15 ml trockenem Dimethylformamid (p.A.) wurde unter Schutzgas mit 1 Äquivalent 3-Isocyanatopropyl-triethoxysilan versetzt und 72 h bei Raumtemperatur gerührt, das Rohprodukt bei  $-20^\circ\text{C}$  ausgefällt und im Feinvakuum getrocknet. Zur Aufreinigung wurde es in trockenem Toluol (p.A.) gelöst und mit der vierfachen Menge trockenem Cyclohexan (p.A.) überschichtet. Der nach 24 h erhaltene Niederschlag wurde mit kaltem, trockenem Cyclohexan (p.A.) gewaschen und im Feinvakuum getrocknet. N-3-Triethoxysilyl-propyl)-N'-( $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol-750)-harnstoff (**3**) wurde in Form eines leicht gelblichen Waxes (85 %), N-3-Triethoxysilyl-propyl)-N'-( $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol-2000)-harnstoff (**4**) als leicht beiges Pulver (93 %) und N-3-Triethoxysilyl-propyl)-N'-( $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol-5000)-harnstoff (**5**) als weißes Pulver (95 %) erhalten. Im Laufe dieser Arbeit wird (**3**) als mPEG750-Harnstoff, (**4**) als mPEG2000-Harnstoff und (**5**) als mPEG5000-Harnstoff abgekürzt.



**mPEG750-Harnstoff (3):****<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  = 0.59 (m<sub>c</sub>, 2H, Si-CH<sub>2</sub>), 1.18 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 9H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.55 (m<sub>c</sub>, 2H, Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.11 (m<sub>c</sub>, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N), 3.34 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.55-3.70 (sh, 60H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.79 (q, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 6H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 5.01 (bs, 1H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 5.07 (bs, 1H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O);

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  = 7.7 (Si-CH<sub>2</sub>), 18.3 (Si-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 23.8 (Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 40.3 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 42.9 (NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 58.3 (Si-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 59.0 (O-CH<sub>3</sub>), 68.3 (CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 70.1-71.9 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 158.5 (C=O);

**MALDI:**M<sub>n</sub> = 951; M<sub>w</sub> = 961, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1.01.**mPEG-2000-Harnstoff (4):****<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  = 0.57 (m<sub>c</sub>, 2H, Si-CH<sub>2</sub>), 1.17 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 9H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.53 (m<sub>c</sub>, 2H, Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.10 (m<sub>c</sub>, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.33 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.37 (m<sub>c</sub>, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.50 (m<sub>c</sub>, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.55-3.70 (sh, 172H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.77 (m<sub>c</sub>, 6H, Si-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 5.03 (bs, 2H, NH);

**<sup>13</sup>C-NMR** (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>):

$\delta$  = 7.6 (Si-CH<sub>2</sub>), 18.2 (Si-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 23.7 (Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 40.2 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 42.8 (NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 58.3 (Si-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 58.9 (O-CH<sub>3</sub>), 70.0 (CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 70.2-71.9 (O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 158.5 (C=O);

**MALDI:**M<sub>n</sub> = 2160; M<sub>w</sub> = 2176, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1.01.



**mPEG-5000-Harnstoff (5):**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>):

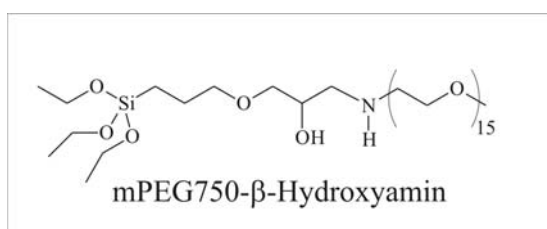
$\delta = 0.58$  (m<sub>c</sub>, 2H, Si-CH<sub>2</sub>), 1.16 (t, <sup>3</sup>J = 7.0 Hz, 9H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1.55 (m<sub>c</sub>, 2H, Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>),  
 3.12 (m<sub>c</sub>, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.35 (s, 3H, O-CH<sub>3</sub>), 3.37 (m<sub>c</sub>, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O),  
 3.50 (m<sub>c</sub>, 2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 3.55-3.72 (sh, 440H, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O),  
 3.78 (m<sub>c</sub>, 6H, Si-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 5.03 (bs, 2H, NH);

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>):

$\delta = 7.6$  (Si-CH<sub>2</sub>), 18.2 (Si-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 24.2 (Si-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 40.0 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH),  
 42.7 (NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O), 58.1 (Si-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 58.8 (O-CH<sub>3</sub>), 70.0-71.9 (CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>),  
 155.5 (C=O);

**MALDI:**M<sub>n</sub> = 5038; M<sub>w</sub> = 5078, M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> = 1.01.**5.5.3 1-[2-( $\omega$ -methoxypolyethylenglykol-750)-ethylamino]-3-(3-triethoxysilylpropoxy)-propan-2-ol (6)**

Eine Lösung von 0.48 mmol  $\omega$ -Amino-polyethylenglykolmonomethylether (MW 750) in 15 ml trockenem Dimethylformamid (p.A.) wurde unter Schutzgas mit 0.48 mmol 3-Glycidyloxypropyl-triethoxysilan (GOPTES) versetzt und 72 h bei Raumtemperatur gerührt, das Rohprodukt bei -20°C ausgefällt und im Feinvakuum getrocknet. Zur Aufreinigung wurde es in trockenem Toluol (p.A.) gelöst und mit der vierfachen Menge trockenem Cyclohexan (p.A.) überschichtet. Der nach 24 h erhaltene Niederschlag wurde mit kaltem, trockenem Cyclohexan (p.A.) gewaschen und im Feinvakuum getrocknet. Das erhaltene Produkt bestand aus etwa 50 % (6) und 50 % nicht umgesetzten  $\omega$ -Amino-polyethylenglykolmonomethylether (MALDI). Für alle Experimente mit (6) wurde dieses Gemisch eingesetzt. Im Laufe dieser Arbeit wird (6) als mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin abgekürzt.



## 5.6 Probenpräparation und Chemisorptionsversuche auf Gold

### 5.6.1 Präparation der Goldsubstrate

Die zum Besputtern mit Gold verwendeten Si(100)-Wafer bzw. Deckgläschen wurden in zwei Schritten gereinigt. Zunächst erfolgte eine 5-minütige Behandlung des Wafers im Ultraschallbad mit 2-Propanol (p.A.). Anschließend erfolgte eine ebenfalls 5-minütige Behandlung des Wafers im Ultraschallbad mit Methanol (p.A.). Es wurde zunächst eine Haftsicht von 10 nm Titan bei 120 mA (Argondruck  $1.2 \cdot 10^{-2}$  mbar) und anschließend eine polykristalline Goldschicht von 90 nm bei 60 mA (Argondruck  $5 \cdot 10^{-2}$  mbar) aufgesputtert.

### 5.6.2 Chemisorptionsversuche auf Goldoberflächen

Sofern die Goldoberflächen aus Kapitel 5.6.1 nicht direkt verwendet wurden, wurden sie zur Reinigung mindestens 2 h unter Luftatmosphäre UV-Strahlen<sup>i</sup> ausgesetzt, wobei ein Anteil des Luftsauerstoffs in die reaktivere Modifikation Ozon umgewandelt wird, welches durch Oxidation Verunreinigungen von der Oberfläche löst. Anschließend wurde mit DMF (p.A.) und Ethanol (p.A.) gespült und im Stickstoffstrom trocken geblasen.

Die gereinigten Goldoberflächen wurden in einem 50 ml Schlenck-Kolben unter Schutzgas 20 bis 26 h in einer 50 - 200  $\mu$ M Lösung des entsprechenden Thiols in absolutem Dimethylformamid DMF (p.A.; DMF) bzw. absolutem Ethanol (p.A.) eingelegt, daraufhin mit DMF (p.A.) abgespült, 2 min im Ultraschallbad behandelt, erneut mit DMF (p.A.) und anschließend mit Ethanol (p.A.) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Aufbewahrung erfolgte unter Stickstoffatmosphäre.

## 5.7 Probenpräparation und Chemisorptionsversuche auf Silizium<sup>j</sup> und Glas

Alle Passivierungsreaktionen wurden unter Inertgasatmosphäre durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittel wurden absolutiert und entgast.

---

<sup>i</sup> **Vorsicht: UV-Licht kann mutagen wirken.** Diese Ozonolysen wurden in Laboratmosphäre mit einer Quecksilberdampflampe UVI40 4C S15/300 (185 nm) der Firma UV-Technik Speziallampen GmbH durchgeführt.

<sup>j</sup> Die in dieser Arbeit durchgeführten Funktionalisierungen von Silizium wurden auf der nativen Oxidschicht des Siliziums durchgeführt.

### 5.7.1 Präparation der Silizium- bzw. Glasoberflächen

Die hierfür verwendeten Silizium(100)-Wafer bzw. Deckgläschen wurden mindestens 30 Minuten in frisch zubereitete Caro'sche Säure eingelegt, anschließend mit voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) gespült, 3 min in VE-Wasser im Ultraschallbad behandelt, mit Millipore<sup>®</sup>-Wasser<sup>k</sup> gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Daraufhin wurden sie entweder zu Adsorptionsversuchen (siehe Kapitel 5.7.2 und 5.7.4) oder zur Nanostrukturierung (siehe Kapitel 5.9) weiterverarbeitet.

### 5.7.2 Anbindung von GOPTMS bzw. GOPTES

Die frisch gereinigten und somit hydrophilen Silizium- bzw. Glasoberflächen aus Kapitel 5.7.1 wurden 1 h bei Raumtemperatur mit reinem Glycidylxypropyltrimethoxysilan (GOPTMS) bzw. Glycidylxypropyltriethoxysilan (GOPTES) bei einer Oberflächenkonzentration von etwa 5  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  inkubiert. Auf Grund der Hydrolyseempfindlichkeit der eingesetzten Verbindungen wurden jeweils zwei Proben der gleichen Größe „Oberseite zu Oberseite“ in einer Stickstoffatmosphäre funktionalisiert. Anschließend wurden die Proben mit trockenem Aceton (p.A.) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die auf diese Weise funktionalisierten Proben müssen sofort weiterverarbeitet werden.

### 5.7.3 PEG-Kopplung

PEG-Kopplung mit Polyethylenglykolmonomethylether (mPEG-350, mPEG-750, mPEG-2000) bzw. Polyethylenglykol (PEG-6000) wurde durch Inkubation der Proben aus Kapitel 5.7.2 in eine Schmelze des entsprechenden (m)PEGs für 40-48 h bei 75-95°C unter Stickstoffatmosphäre. Im Falle der bedeutend teureren Aminopolyethylenglykolmonomethylethern (mPEGA-750, mPEGA-2000, mPEG-5000, mPEGA-10000 und mPEGA-20000) wurde nur ein dünner geschmolzener Film des entsprechenden mPEGAs zwischen zwei Proben („face-to-face“) erzeugt. Die Bedingungen erfolgten wie bei den (m)PEGs. Zur Aufarbeitung wurden sämtliche Proben ausgiebig mit Millipore<sup>®</sup>-Wasser gespült, 3 min im Ultraschallbad behandelt (Millipore<sup>®</sup>-Wasser), mit Millipore<sup>®</sup>-Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Aufbewahrung erfolgte unter Stickstoffatmosphäre.

---

<sup>k</sup> Die hydroxylierte Oberfläche zeigt hydrophilen Charakter, d. h. sie wird von Wasser vollständig benetzt.

#### 5.7.4 Anbindung von mPEG-triethoxysilanen auf Glas und Silizium

Die hydrophilen Glas- bzw. Siliziumoberflächen wurden in einem 50 ml Schlenk-Kolben 16-20 h in eine 0.25 mmolare Lösung des entsprechenden mPEG-Triethoxysilans [(1)-(5)] in trockenem Toluol (p.A.) unter Stickstoffatmosphäre in Gegenwart von 2,5  $\mu$ M Triethylamin bei 80°C eingelegt. Anschließend wurde sie mit Ethylacetat (p.A.) gespült, 2 Minuten im Ultraschallbad behandelt, wiederum mit Ethylacetat (p.A.) und darauf mit Methanol (p.A.) gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Aufbewahrung erfolgte unter Stickstoffatmosphäre.

Alternativ wurden Funktionalisierungen von Glas und Silizium mit 0.25 mmolaren Lösungen der mPEG750-Derivate (1), (3) und (6) bei Raumtemperatur in Ethanol bzw. Toluol durchgeführt, wobei die Inkubationszeit 5 Tage betrug. Die Aufarbeitung und Aufbewahrung erfolgten wie oben beschrieben.

#### 5.7.5 Avidinadsorption

Die verschiedenen PEG-Oberflächen wurden für 75 min einer PBS gepufferten Avidinlösung (50  $\mu$ g/ml) bei Raumtemperatur ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben gründlich mit einer 1 % Tween20-Lösung in PBS, PBS und zuletzt mit Millipore®-Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Proben wurden unmittelbar im Anschluss XP-spektroskopisch untersucht.

### 5.8 Probenpräparation und Chemisorptionsversuche auf PDMS

#### 5.8.1 Beschichtung von Glas mit PDMS

Eine Mischung aus 50 % PDMS/Crosslinker (10/1) und 50 % n-Heptan wurde bei 500 U/min ( $a = 868$  U/min) auf 20x20 mm<sup>2</sup> Deckgläschen aufgebracht; nach 20 s wurde die Frequenz auf 3000 U/min ( $a = 946$  U/min) für weitere 40 s erhöht. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 100°C gehärtet.

#### 5.8.2 Partielle Funktionalisierung von PDMS mit GOPTES und PEG

Die PDMS Proben wurden 30 s im Sauerstoffplasma aktiviert und wie in Kapitel 5.7.2 funktionalisiert. Partielle Beschichtung mit GOPTES wurde dadurch erreicht, dass ein Tropfen auf die aktivierte PDMS-Oberfläche gegeben und eine 10x10 mm<sup>2</sup> große

Siliziumprobe darauf gelegt wurde, so dass sich ein dünner GOPTES-Film zwischen PDMS und Silizium ausbilden konnte (Oberflächenkonzentration  $5 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ). Die anschließende Umsetzung mit PEG-6000 erfolgte nach Kapitel 5.7.3.

Direkte PEG-Funktionalisierung wurde mit den mPEG-750 Derivaten **(3)** und **(6)** in Ethanol nach einer Aktivierung im Sauerstoffplasma (30 s) wie in Kapitel 5.7.4 beschrieben durchgeführt. Auch hier wurde partiell funktionalisiert, indem mit Hilfe eines  $10 \times 10 \text{ mm}^2$  großen Siliziumstückes ein schmaler PEG-Lösungsfilm zwischen PDMS und Silizium erzwungen wurde.

## 5.9 Mikrostrukturierung von Glas mittels Photolithographie

Nach Reinigung der Glasproben (Millipore®, Isopropanol, Aceton; jeweils 5 min Ultraschall) wurde der positive Photoresist (AR-P 5350) mittels Lackschleudern (*engl.*: spin coating) aufgebracht (10 s 500 U/min, 45 s 4000 U/min) und bei  $100^\circ\text{C}$  15 min gehärtet. Der Bestrahlung ( $\sim 20$  s) und der Entwicklung (30 – 40 s, AR-300-47 1:2 in Millipore®-Wasser verdünnt) folgte das Aufdampfen von 1 nm Titan (10 s bei 120 mA) als Haftvermittler und 30 nm Gold (30 s bei 60 mA). Der Photoresist wurde in Aceton abgelöst, die Proben gründlich mit Aceton und Millipore®-Wasser gespült und 2 bis 3 min in frisch zubereiteter Caro'scher Säure endgereinigt. Anschließend wurden sie mit Millipore®-Wasser gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

## 5.10 Nanostrukturierung von Glas und Silizium

### 5.10.1 Darstellung der mizellaren Goldlösungen

Polystyrol-*b*-Poly-2-vinylpyridindiblockcopolymer wurde in Konzentrationen von 2 bis 5 mg/ml Toluol (p.A.) gelöst und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Tetrachlorgoldsäure  $\text{HAuCl}_4$  hinzu gegeben und erneut 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Menge der Goldsäure ergibt sich aus der Anzahl der P2VP-Einheiten und der Konzentration des Diblock-Copolymers sowie der gewünschten Beladung (entspricht dem Verhältnis aus  $\text{AuCl}_4^+$  und P2VP-Einheiten). In Tabelle 5-3 sind alle verwendeten Lösungen aufgeführt.

Polymer	c [mg/ml Toluol]	Beladung	Partikelgröße	Abstand
PS(245)- <i>b</i> -P2VP(225)	5	0.5	5 ± 1	45 ± 15
PS(500)- <i>b</i> -P2VP(270)	5	0.5	5 ± 1	58 ± 7
PS(990)- <i>b</i> -P2VP(385)	5	0.5	6 ± 1	73 ± 8
PS(1780)- <i>b</i> -P2VP(525)	3	0.2	7 ± 1	90 ± 10
PS(1780)- <i>b</i> -P2VP(525)	2	0.2	7 ± 1	110 ± 10
PS(1780)- <i>b</i> -P2VP(525)	3	0.5	10 ± 1	90 ± 10

Tabelle 5-3: verwendete Goldmizellösungen zur Nanostrukturierung von Glas- und Siliziumoberflächen

### 5.10.2 Präparation der großflächiger Goldnanostrukturen

Die aus Kapitel 5.7.1 gereinigten Glas- und Siliziumproben bzw. mit Graphit bedampfte Glasproben wurden bei konstanter Geschwindigkeit von 12 mm/min in die entsprechende Lösung (siehe Kapitel 5.10.1) eingetaucht und wieder herausgezogen. Anschließend wurden sie 30 min einem Wasserstoffplasma ausgesetzt (150 W; 0.4 mbar). Hinterher wurden sie entweder im Rasterelektronenmikroskop untersucht oder zur Beschichtung eingesetzt (Kapitel 5.7.4).

### 5.10.3 Präparation micro-nano-strukturierter Glas- bzw. Siliziumoberflächen

Auf Grund der Notwendigkeit von leitenden Substraten wurde auf Glas ein etwa 5 nm dünner Graphitfilm aufgedampft. Anschließend wurden die Substrate bei 12 mm/min in die entsprechende Lösung (siehe Kapitel 5.10.1) eingetaucht und wieder herausgezogen. Der Bestrahlung mit niederenergetischen Elektronen über eine Lochmaske (300 eV, 15 mC/cm<sup>2</sup>) folgte ein „lift-off“ Prozess um unbestrahlte Bereiche abzulösen (Ultraschall; 5 min in DMF). Anschließend wurden sie 30 min einem Wasserstoffplasma ausgesetzt (150 W; 0.4 mbar). Hinterher wurden sie entweder im Rasterelektronenmikroskop untersucht oder zur Beschichtung eingesetzt (Kapitel 5.7.4).

## 5.11 Zelladhäsionsexperimente

### 5.11.1 Zelladhäsionsexperimente auf unstrukturierten Glasoberflächen

Zur Untersuchung der Zellresistenz der mit den unterschiedlichen PEGs beschichteten Oberflächen wurden die passivierten Glasproben zunächst in einem Gemisch aus 70 % Ethanol und 30 % Millipore®-Wasser mindestens 20 min sterilisiert, anschließend gründlich mit sterilem PBS gewaschen und schließlich in das gewünschte Zellmedium eingelegt. Auf diese Proben wurden anschließend ~100 Fibroblasten (GFP-3T3) pro mm<sup>2</sup> ausgesät. Kultivierung erfolgte bei 37°C (10 % CO<sub>2</sub>; 100 % Luftfeuchtigkeit).

### 5.11.2 Zelladhäsionsexperimente auf PDMS

Die nach Kapitel 5.8.2 partiell passivierten PDMS-Proben wurden zunächst in einem Gemisch aus 70 % Ethanol und 30% Millipore®-Wasser mindestens 20 min sterilisiert, anschließend gründlich mit sterilem PBS gewaschen. Daraufhin wurden sie 2 h in einem 10 µg/ml Fibronectin enthaltenden PBS-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert, gründlich mit PBS gespült und in das gewünschte Zellmedium überführt. Schließlich wurden ~100 Fibroblasten (GFP-3T3) pro mm<sup>2</sup> ausgesät. Kultivierung erfolgte bei 37°C (10 % CO<sub>2</sub>; 100 % Luftfeuchtigkeit).

### 5.11.3 Zelladhäsionsexperimente auf Goldnanostrukturen

Die mit Goldnanopartikeln strukturierten Glasoberflächen (Kapitel 5.10.2) wurden mit den mPEG-Harnstoffderivaten **(3)-(5)** passiviert (Kapitel 5.7.4). Zur Funktionalisierung der Goldstrukturen wurden die Proben 12 h mit einer 25 µM wässrigen RGD(T1)<sup>1</sup>-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend gründlich mit Millipore®-Wasser gespült und auf dem Rüttler bei 150 U/min 16 h gewaschen, wobei das Millipore®-Wasser während dieses Zeitraums mindestens viermal gewechselt wurde. Auf diese Proben wurden nach Sterilisierung (Kapitel 5.11.1) ~30 Fibroblasten (REF-52 WT) pro mm<sup>2</sup> ausgesät. Kultivierung erfolgte bei 37°C (10 % CO<sub>2</sub>; 100 % Luftfeuchtigkeit). Als Medium wurde 2 mM L-Glutamin enthaltendes DMEM verwendet, dem 1 Vol-% bzw. 10 Vol-% FBS zugegeben wurde.

---

<sup>1</sup> die Struktur des RGD(T1) ist im Anhang abgebildet

### **5.11.4 Fixieren der Zellen und Anfärben der Aktinfasern und des Vinculins**

Zum Fixieren der Zellen wurde das Zellmedium sukzessiv durch 37°C warmen PBS-Puffer und 37°C warme 3,7 %-ige Formalinlösung ausgetauscht und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS wurden die Proben 20 min in eine 0,1 %-ige PBS gepufferte Triton X 100 Lösung eingelegt, anschließend wiederum zweimal mit PBS gewaschen und in 1 % BSA enthalten PBS-Puffer überführt. Vinculinanfärbung erfolgte in zwei Schritten; zuerst wurden die Proben bei 37°C 1 h mit einer 1:50 Verdünnung von Maus anti-Human Vinculin in PBS inkubiert. Anschließend folgte nach waschen mit PBS die Markierung unter gleichen Bedingungen mit einer 1:100 Verdünnung von FITC-IgG in PBS. Die Markierung der Aktinfilamente wurde mit TRITC-konjugiertem Phalloidin (1mg/ml Dimethylsulfoxid) 1:250 in 1 % BSA enthaltendem PBS-Puffer bei 4°C erzielt. Nach 12 h Inkubation unter Lichtausschluss wurde zweimal mit PBS-Puffer gewaschen.

Elvanol wurde schließlich als Antibleichreagens eingesetzt.

## **5.12 Experimente mit Motorproteinen**

### **5.12.1 Herstellung der Mikrotubuli**

500 µl BRB80 und 500 µl BRB80/20 µM Taxol wurden über 0.1 µm Filter bei 8000 U/min 1 min zentrifugiert. 13 µl BRB80, 4.5 µl Tubulinlösung (25 mg/ml), 0.8 µl TAMRA-Tubulin (20 mg/ml; LR 1) und 2 µl 10 mM GTP-Lösung (pH 7) wurden in dieser Reihenfolge bei 0°C gemischt und 1 min bei 80000 U/min und 4°C zentrifugiert. 15 µl des Zentrifugats wurden zur Polymerisation des Tubulins 20 min bei 37°C unter Lichtausschluss gehalten, bei 14000 U/min in einer vorgewärmten Zentrifuge zentrifugiert, das Zentrifugat verworfen, der Niederschlag zweimal mit 40 µl BRB80/20 µM Taxol gewaschen und in 40 µl BRB80/20 µM Taxol resuspendiert. Die Mikrotubuli (MT) wurden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Kurze TAMRA-markierte MT wurden nur 10 min polymerisiert. Lange Alexa-488-markierte MT wurden mit Alexa-488-Tubulin (20 mg/ml; LR 0.6) nach obigem Protokoll 30 min polymerisiert.



### 5.12.2 Herstellung polaritätsmarkierter Mikrotubuli

Für die durchgeführten Experimente wurden einerseits lange andererseits kurze polaritätsmarkierte Mikrotubuli benötigt, die auf unterschiedliche Weise hergestellt wurden:

a) lange polaritätsmarkierte Mikrotubuli:

500  $\mu\text{l}$  BRB80 und 500  $\mu\text{l}$  BRB80/20  $\mu\text{M}$  Taxol wurden über 0.1  $\mu\text{m}$  Filter bei 8000 U/min 1 min zentrifugiert. 13  $\mu\text{l}$  BRB80, 4.5  $\mu\text{l}$  Tubulinlösung (25 mg/ml), 0.8  $\mu\text{l}$  TAMRA-Tubulin (20 mg/ml; LR 1) und 2  $\mu\text{l}$  10 mM GTP-Lösung wurden in dieser Reihenfolge bei 0°C gemischt und 1 min bei 80000 U/min und 4°C zentrifugiert. 15  $\mu\text{l}$  des Zentrifugats wurden zur Polymerisation des Tubulins 30 min bei 37°C unter Lichtausschluss gehalten. 5  $\mu\text{l}$  davon wurden zu einem 37°C warmen Gemisch<sup>m</sup> aus 4  $\mu\text{l}$  BRB80, 1.5  $\mu\text{l}$  NEM-Tubulin (16 mg/ml) und 0.5  $\mu\text{l}$  10 mM GTP-Lösung gegeben und nach einer Minute wurde noch 0.7  $\mu\text{l}$  TAMRA-Tubulin<sup>m</sup> hinzu gegeben und vorsichtig untergemischt. Nach 2 min wurde bei 14000 U/min in einer vorgewärmten Zentrifuge zentrifugiert (6 min), das Zentrifugat verworfen, der Niederschlag zweimal mit 40  $\mu\text{l}$  BRB80/20  $\mu\text{M}$  Taxol gewaschen und in 100  $\mu\text{l}$  BRB80/20  $\mu\text{M}$  Taxol resuspendiert. Die auf diese Weise am (+)-Ende stärker markierten Mikrotubuli wurden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss aufbewahrt.

b) kurze polaritätsmarkierte Mikrotubuli:

Diese wurden ebenfalls nach obigem Protokoll hergestellt, jedoch wurde Tubulin nur 3 min polymerisiert.

### 5.12.3 Anbindung von Mikrotubuli an Goldnanopartikel via Eg5

Die Flusszelle wurde mit PBS gefüllt, auf 0°C gekühlt und mit Eg5 20 min inkubiert. Hierfür wurde 1  $\mu\text{l}$  der Stammlösung (0.4 mg/ml) des Motorproteins in 19  $\mu\text{l}$  PBS bei 0°C verdünnt. Anschließend wurde die Flusszelle mit 50  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer gewaschen, welcher 1.25 mg/ml BSA enthielt und etwa 4 min bei Raumtemperatur akklimatisiert. Daraufhin wurden 25  $\mu\text{l}$  Mikrotubulilösung [Lösung: 30  $\mu\text{l}$  PBS/20  $\mu\text{M}$  Taxol, 0.75  $\mu\text{l}$  BSA (50 mg/ml PBS), 1  $\mu\text{l}$  MT-Stammlösung] eingeführt und 15 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die ungebundenen Mikrotubuli mit 50  $\mu\text{l}$  Puffer ausgewaschen [Lösung: 50  $\mu\text{l}$  PBS/20  $\mu\text{M}$  Taxol, 1.25  $\mu\text{l}$  BSA (50 mg/ml PBS)] und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

---

<sup>m</sup> 3 min bei 80000 U/min und 4°C zentrifugiert

#### 5.12.4 Fixierung von Mikrotubuli aus 5.12.3

Die via Eg5 an die Goldpartikel gebundenen Mikrotubuli wurden mit 2 %-iger Glutaraldehydlösung in PBS 14 h bei 4°C fixiert, anschließend mit Ethanol entwässert (sukzessiver Anstieg der Ethanolkonzentration in einem Ethanol/Millipore®-Gemisch beginnend bei 50 % bis 100 % in 10 %-Schritten jeweils 20 min bei RT; reines Ethanol zweimal 20 min), mit überkritischem Kohlendioxid getrocknet (beginnend in Ethanol, sechsmal durch CO<sub>2</sub> ersetzt), mit einem dünnen Graphitfilm bedampft ( $p \approx 6 \times 10^{-5}$  mbar) und im Rasterelektronenmikroskop untersucht.

#### 5.12.5 Motility Assays mit Eg5

Die Flusszelle wurde mit PBS gefüllt, auf 0°C gekühlt und mit Eg5 20 min inkubiert. Hierfür wurde 1 µl der Stammlösung (0.4 mg/ml) des Motorproteins in einer Mischung aus 18 µl PBS und 1 µl 100 mM Mg-ATP-Lösung bei 0°C verdünnt. Anschließend wurde die Flusszelle mit 50 µl PBS-Puffer gewaschen, welcher 1.25 mg/ml BSA und 4 mM Mg-ATP enthielt und etwa 4 min bei Raumtemperatur akklimatisiert. Daraufhin wurden 25 µl Mikrotubulilösung [Lösung: 50 µl PBS/20 µM Taxol, 1.25 µl BSA (50 mg/ml PBS), 5 µl Oxygen Scavenger (OS; Zusammensetzung siehe Anhang), 5 µl 100 mM Mg-ATP-Lösung und 1 µl MT (Stammlösung 1:5 bis 1:10 in BRB80/20 µM Taxol verdünnt)] eingeführt und 3 bis 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden die ungebundenen MT mit 50 µl Puffer ausgewaschen [Lösung: 50 µl PBS/20 µM Taxol, 1.25 µl BSA (50 mg/ml PBS), 5 µl OS, 5 µl 100 mM Mg-ATP-Lösung] und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die kinetischen Untersuchungen in anderen Puffern, welche erst nach dem obigen Protokoll eingeführt wurden, wurden unter konstanten Bedingungen bezogen auf Taxol-, BSA-, OS- und ATP-konzentration durchgeführt. Diese zusätzlich verwendeten Puffer waren BRB80, PBS mit 0.5 % Methylcellulose und PBS/Millipore®-Wasser 1/1.

#### 5.12.6 Trapezexperimente mit Mikrotubuli und Eg5 auf Goldmikrostrukturen

Die Flusszelle wurde mit PBS gefüllt, auf 0°C gekühlt und mit Eg5 20 min inkubiert. Hierfür wurde 1 µl der Stammlösung (0.4 mg/ml) des Motorproteins in 19 µl PBS bei 0°C verdünnt. Anschließend wurde die Flusszelle mit 50 µl PBS-Puffer gewaschen, 3 min mit einer 0.01 %-igen Wasserstoffperoxidlösung in PBS und 4 min mit einer 50 µg/ml Catalaselösung in PBS inkubiert, mit 50 µl PBS gewaschen und etwa 3 min bei RT akklimatisiert. Daraufhin

wurde nach 10 min Einwirkung einer 50  $\mu$ M PBS-gepufferten PEG3000-Thiollösung mit 50  $\mu$ l PBS gewaschen. Die Anbindung langer MT-Alexa-488 wurde in einem quasi kontinuierlichen Fluss bewerkstelligt um eine möglichst parallele Ausrichtung der Filamente auf der Mikrostruktur zu erzielen. Hierfür wurden 25  $\mu$ l MT-Alexa-488-Lösung [Lösung: 50  $\mu$ l PBS/20  $\mu$ M Taxol, 1.25  $\mu$ l BSA (50 mg/ml PBS), 5  $\mu$ l OS, 1  $\mu$ l MT-Stammlösung] in die Flusszelle gegeben und alle 2 min weitere 5  $\mu$ l. Nicht gebundene MT wurden mit 50  $\mu$ l des MT-Puffers heraus gewaschen. Auf die an den Mikrostrukturen fixierten MT-Alexa-488 wurde nun Eg5 angebunden. Zunächst wurden 25  $\mu$ l der Eg5-Lösung [Lösung: 50  $\mu$ l PBS/20  $\mu$ M Taxol, 1.25  $\mu$ l BSA (50 mg/ml PBS), 5  $\mu$ l OS, 1  $\mu$ l Eg5-Stammlösung, 2  $\mu$ l AMP-PNP (100 mM)]. Zur Erzeugung eines Flusses wurden jede Minute 10  $\mu$ l der Eg5-Lösung nachgegeben. Nach insgesamt 3 min wurde mit 50  $\mu$ l des Eg5-Puffers gewaschen und sofort 25  $\mu$ l MT-TAMRA-Lösung [Lösung wie MT-Alexa-488 mit zusätzlich 2  $\mu$ l AMP-PNP (100 mM)] zugegeben und wie bei den Alexa-488-Derivaten ein Fluss erzeugt. Nach insgesamt 10 min wurden nicht gebundene MT mit 50  $\mu$ l des MT-Puffers heraus gewaschen. Schließlich wurde der ATP-haltige Puffer hinzu gegeben [Lösung: 25  $\mu$ l PBS/20  $\mu$ M Taxol, 0.63  $\mu$ l BSA (50 mg/ml PBS), 2.5  $\mu$ l OS, 2.5  $\mu$ l Mg-ATP (100mM), 1  $\mu$ l Eg5-Verdünnung (50  $\mu$ l PBS, 2  $\mu$ l 100mM Mg-ATP, 1 $\mu$ l Eg5-Stammlösung)] und die Bewegung der MT im Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Hierbei wurden alle 5 s bei wechselnden Filtern beide MT-Lagen aufgenommen, so dass wie bei den gliding assays ein Intervall von 10 s entstand, wobei ein Versatz zwischen stationären (Alexa-488) und mobilen (TAMRA) MT von 5 s auftrat.

## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 Proteinresistenz durch Erzeugung polyethylenglykolterminierter Oberflächen

In den folgenden zwei Kapiteln werden XPS-Analysen der in dieser Arbeit durchgeführten Passivierungsmethoden mit Polyethylenglykolen aufgeführt. Es wird auf unterschiedliche Präparationsmethoden auf Glas und Silizium<sup>n</sup> eingegangen und deren Zusammensetzung analysiert. Die ermittelten Schichtdicken aller verwendeten Systeme werden in Kapitel 6.1.5 zusammengefasst und die daraus resultierenden Packungsdichten diskutiert.

#### 6.1.1 Passivierung mit funktionalisierten Polyethylenglykolen durch Kopplungsreaktionen an der Oberfläche

Eine Möglichkeit der Funktionalisierung von Glas bzw. Silizium mit proteinresistenten Polyethylenglykolen über Kopplungsreaktionen auf der Oberfläche wird in diesem Kapitel untersucht. Hierfür wurden die Oberflächen zunächst mit 3-Glycidyloxypropyl-triethoxy-(GOPTES) bzw. -trimethoxysilan (GOPTMS) aktiviert und die oberflächlich gebundene Epoxideinheit mit geschmolzenen PEG-Derivaten umgesetzt. Es wurden hydroxy- und aminotermionierte PEGs verwendet. Erstere wurden mit (m)PEG (*m* bei endständiger Methoxyeinheit im Falle des 350er, des 750er und 2000er Derivats) bzw. letztere mit mPEGA [*A* für Amin] abgekürzt.

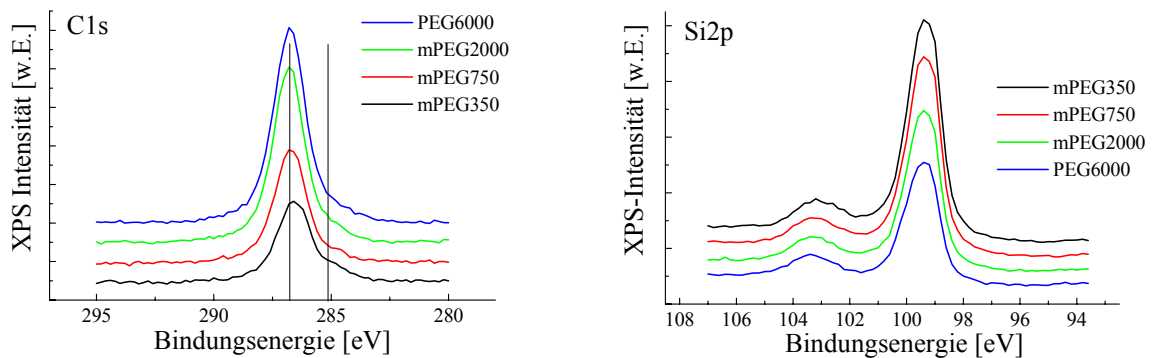
Sämtliche Polyethylenglykolschichten wurden auf Silizium(100)-Oberflächen XP-spektroskopisch untersucht. Die Anbindung von mPEGA2000 auf mit GOPTES bzw. GOPTMS funktionalisierten Siliziumoberflächen wies im Falle des GOPTES ein um 5 % größeres C1s-Signal auf. Daher wurde in allen weiteren Experimenten nur das Triethoxyderivat eingesetzt.

Die Anbindung der heterobifunktionalen mPEGs (MG 350, 750, 2000) bzw. des homobifunktionalen PEG6000 zeigte die erwartete Abhängigkeit zwischen Molekulargewicht und Schichtdicke. In Abbildung 6-1 erkennt man eine Zunahme der C1s- bzw. Abnahme der Si2p-Signalintensitäten mit wachsender Kettenlänge der Polymere. Die Peakmaxima der C1s-Detaillspektren bei  $286.8 \pm 0.2$  eV wurden den Ethylenglykoleinheiten zugeordnet. Die

---

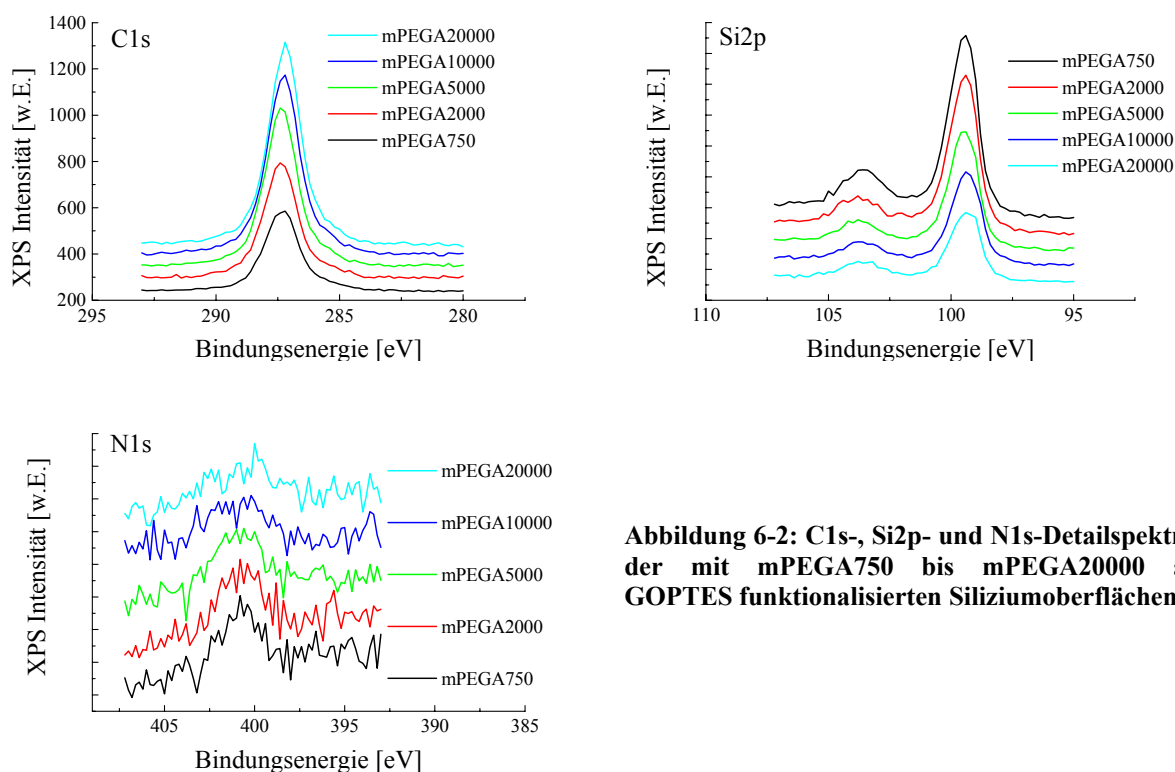
<sup>n</sup> Die in dieser Arbeit durchgeführten Funktionalisierungen von Silizium wurden auf der nativen Oxidschicht des Siliziums durchgeführt.

deutliche Schulter im den C1s-Detailspektrum im Bereich von  $285.0 \pm 0,2$  eV im Falle des mPEG350 ist auf den aliphatischen Anteil des GOPTES zurückzuführen. Die über die Abschwächung des Siliziumsubstrats ermittelten Schichtdicken betragen für das mPEG350  $5.7 \pm 1$  Å, für das mPEG750  $9.1 \pm 1$  Å, für das mPEG2000  $20.6 \pm 2$  Å und für das PEG6000  $22.6 \pm 3$  Å. Die Schichtdicken aller in dieser Arbeit untersuchten PEG-Systeme wie auch deren Oberflächenbedeckung und Packungsdichten werden in Kapitel 6.1.5 zusammengefasst und diskutiert.



**Abbildung 6-1: C1s- und Si2p-Detailspektren der mit mPEG350, mPEG750, mPEGA2000 bzw. PEG6000 auf GOPTES funktionalisierten Siliziumoberflächen**

Analog zu den (m)PEGs wurde bei den mPEGAs eine zunehmende Schichtdicke mit steigendem Molekulargewicht beobachtet, was sich sowohl in der Zunahme der C1s- wie auch in der Abnahme der Si2p-Signalintensitäten in den entsprechenden Detailspektren widerspiegelt (Abbildung 6-2). Ebenso zeigt sich ein Rückgang der Signalintensität in den N1s-Detailspektren mit zunehmender Kettenlänge, was zum einen auf eine geringere Oberflächendichte zum anderen auf eine stärkere Abschwächung auf Grund der erhöhten Schichtdicke zurückgeführt wurde.



**Abbildung 6-2: C1s-, Si2p- und N1s-Detaillenspektren der mit mPEGA750 bis mPEGA20000 auf GOPTES funktionalisierten Siliziumoberflächen.**

Die Breite der N1s-Signale in den XP-Detaillenspektren deutet auf eine teilweise Protonierung des sekundären Aminstickstoffs auf der Oberfläche hin, ein Verhalten, das ebenfalls bei oberflächengebundenem mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin (**6**) beobachtet wurde (Kapitel 6.1.2.3). Die über die Abschwächung des Siliziumsubstrats ermittelten Schichtdicken betragen für das mPEGA750  $14.4 \pm 2 \text{ \AA}$ , für das mPEGA2000  $23.9 \pm 3 \text{ \AA}$ , für das mPEG5000  $31.9 \pm 3 \text{ \AA}$ , für das mPEG10000  $38.3 \pm 4 \text{ \AA}$  und für das mPEG20000  $41.4 \pm 4 \text{ \AA}$ . Die Schichtdicken dieser untersuchten PEG-Systeme wie auch deren Oberflächenbedeckung und Packungsdichten werden in Kapitel 6.1.5 zusammengefasst und diskutiert.

## 6.1.2 Passivierung mit Polyethylenglykolen durch Selbstaggregation auf der Oberfläche

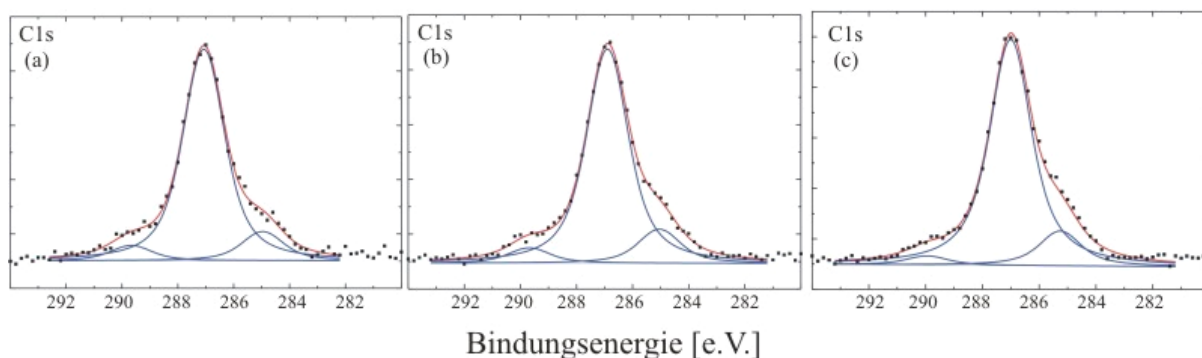
### 6.1.2.1 Passivierung mit mPEG-Urethanen (1) und (2)

Wie in Kapitel 4.5 beschrieben wurden unter anderem (3-Triethoxysilyl-propyl)-carbamidsäure-( $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol)-ester [Abk.: mPEGMG-Urethan; MG ist das Molekulargewicht der PEG-Kette] zur Oberflächenpassivierung eingesetzt. Die XP-

spektroskopische Untersuchungen der mit mPEG750-Urethan (**1**) und mPEG2000-Urethan (**2**)<sup>o</sup> beschichteten Siliziumoberflächen ergaben folgende Resultate:

	Signal	Signallage [eV]	Signalverhältnis	Theor. Signalverhältnis	relative Intensität
(a)	N1s	400.3	-	-	1 (1)
	C1s	285.0, 287.1, 289.6	1.81 : 13.11: 1	2 : 32 : 1	13.32 (35)
(b)	N1s	400.1	-	-	1 (1)
	C1s	285.1, 286.9, 289.7	1.93 : 11.71: 1	2 : 32 : 1	11.66 (35)
(c)	N1s	400.1	-	-	1 (1)
	C1s	285.3, 287.0, 289.9	3.83 : 24.85: 1	2 : 92 : 1	14.04 (95)

**Tabelle 6-1: Signallage, Signalverhältnis und relative Intensität (Sollwerte in Klammern)<sup>p</sup> der an die XP-Spektren einer mPEG-Urethanschicht auf Silizium angepassten Kurven; (a) Präparation von (1) in Toluol bei Raumtemperatur; (b) Präparation von (1) in Toluol bei 80°C in Gegenwart von Triethylamin; (c) Präparation von (2) in Toluol bei 80°C in Gegenwart von Triethylamin; Fehler bei Signallage  $\pm 0.2$  eV und bei Signalverhältnis  $\pm 3$  %.**



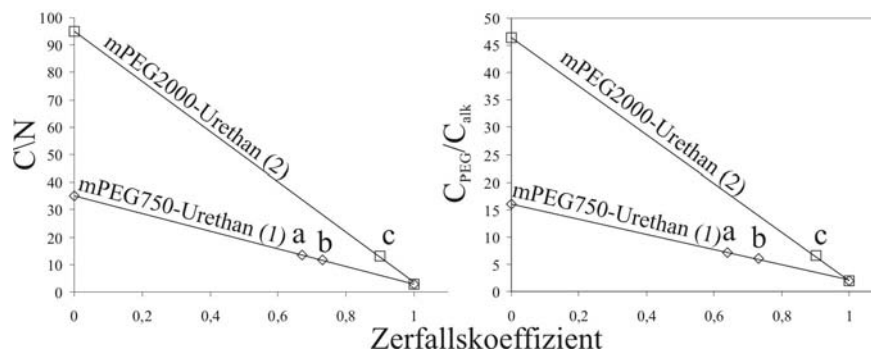
**Abbildung 6-3 C1s-XP-Detailspektren der mPEG-Urethanderivate (1) und (2); (a) Präparation von (1) in Toluol bei Raumtemperatur; (b) Präparation von (1) in Toluol bei 80°C in Gegenwart von Triethylamin; (c) Präparation von (2) in Toluol bei 80°C in Gegenwart von Triethylamin.**

In Tabelle 6-1 ist für beide Moleküle ein deutliches Defizit an Kohlenstoff zu erkennen. Ein ähnliches Verhalten von Urethanverbindungen ist bereits bei Biphenylsystemen beobachtet worden, bei denen die XP-spektroskopischen Daten eine Fragmentierung innerhalb der Urethangruppe, möglicherweise durch Ethanololyse, vermuten ließen.<sup>25,30</sup> Zudem wiesen die mPEG-Harnstoffe (**3**) und (**4**), welche sich von den mPEG-Urethanen (**1**) und (**2**) strukturell nur in ihrer Kopplungseinheit zwischen PEG-Kette und aliphatischem Spacer mit der Ankergruppe unterscheiden, kein solches Verhalten auf. Unter der oben beschriebenen Annahme, dass (**1**) und (**2**) an der Urethaneinheit fragmentieren, so dass bei einem kompletten Zerfall nur 3-Aminopropylsilylanker auf der Oberfläche zurückbleiben, wurde unter der

<sup>o</sup> Beschichtungen bei Raumtemperatur waren auf Grund der geringen Löslichkeit von (**2**) in Toluol nicht möglich

<sup>p</sup> der Sollwert bezieht sich auf ein rein statistisches Modell der Oberflächenschicht (siehe Kapitel 4.3.4)

Einbeziehung eines rein statistischen Oberflächenmodells die Verhältnisse  $C/N$  bzw.  $C_{\text{PEG}}/C_{\text{alkylisch}}$  gegen den Zerfallskoeffizienten aufgetragen (Abbildung 6-4).



**Abbildung 6-4:** Statistisches Modell der  $C/N$ - bzw.  $C_{\text{PEG}}/C_{\text{alkylisch}}$ -Verhältnisse der mPEG-Urethane (1) und (2). Der Zerfallskoeffizient bezieht sich auf einen Zerfall des Moleküls in der Urethaneinheit. (1) wurde bei Raumtemperatur (a) bzw. bei 80°C (b) und (2) nur bei 80°C (c) auf Silizium angebunden.

Die mittels XP-Spektroskopie ermittelten  $C/N$ - bzw.  $C_{\text{PEG}}/C_{\text{alkylisch}}$ -Verhältnisse ergaben unter Verwendung dieses Modells folgende Zerfallskoeffizienten:

mPEG-Urethan	Zerfallskoeffizient aus $C/N$	Zerfallskoeffizient aus $C_{\text{PEG}}/C_{\text{alkylisch}}$
750 (Raumtemperatur)	$0.64 \pm 0.02$	$0.67 \pm 0.02$
750 (80°C)	$0.73 \pm 0.02$	$0.73 \pm 0.02$
2000 (80°C)	$0.90 \pm 0.02$	$0.90 \pm 0.02$

**Tabelle 6-2:** Mittels XP-Spektroskopie und unter Verwendung von Abbildung 6-4 ermittelte Zerfallskoeffizienten

Aus Tabelle 6-2 ergibt sich, dass im Falle des mPEG750-Urethans (1) bei einer Funktionalisierung bei Raumtemperatur etwa 65 % der oberflächlich gebundenen 3-Aminopropylsilylanker ohne PEG-Einheit vorliegen, bei einer Präparation bei 80°C sind es sogar 73 %. Das mPEG2000-Urethan (2) weist einen Verlust in Höhe von 90 % auf. Ob (1) und (2) in Lösung oder auf der Oberfläche zerfallen wurde nicht weitergehend untersucht. Die über die Abschwächung des Siliziumsubstrats ermittelten Schichtdicken betragen für das mPEG750-Urethan (1)  $9.0 \pm 1 \text{ \AA}$  (Präparation bei Raumtemperatur) bzw.  $5.1 \pm 1 \text{ \AA}$  (Präparation bei 80°C) und für das mPEG2000-Urethan (2)  $11.4 \pm 1 \text{ \AA}$ .



### 6.1.2.2 Passivierung mit mPEG-Harnstoffen (3)-(5)

Eine weitere Verbindungsklasse, die zur Passivierung eingesetzt wurde, ist N-3-Triethoxysilylpropyl-N'- $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol-harnstoff [Abk.: mPEGMG-Harnstoff; *MG* ist das Molekulargewicht der PEG-Kette]. Die verwendeten Derivate unterscheiden sich lediglich in der Länge bzw. im Molekulargewicht ihrer PEG-Kette.

mPEG750-Harnstoff (3) stellt in der mPEG-Harnstoffreihe das kürzeste Derivat dar. Im Hinblick auf die Funktionalisierung von Glas- bzw. Siliziumoberflächen mit mPEG750-Harnstoff (3) wurden verschiedene Präparationen, bei denen Aktivierung, Lösungsmittel, Temperatur und Inkubationszeit variiert wurden, getestet und XP-spektroskopisch untersucht. In der folgenden Tabelle werden lediglich die besten Beschichtungsmöglichkeiten in Bezug auf mPEG750-Harnstoff (3) dargestellt. Nicht zufrieden stellende Versuchsreihen, z.B. Präparation in Cyclohexan oder aus der Schmelze, werden nicht aufgeführt. XP-spektroskopische Untersuchungen der mit mPEG750-Harnstoff (3) beschichteten Silizium- [(a)-(d)] bzw. Glasoberflächenoberflächen [(e)-(g)] ergaben folgende Resultate:

	Signal	Signallage [eV]	Signalverhältnis	Theor. Signalverhältnis	relative Intensität
(a)	N1s	400.0	-	-	2 (2)
	C1s	285.0, 286.9, 289.2	2.11 : 33.33 : 1	2 : 32 : 1	34.62 (35)
(b)	N1s	400.3	-	-	2 (2)
	C1s	285.3, 287.2, 289.9	2.32 : 33.45 : 1	2 : 32 : 1	35.02 (35)
(c)	N1s	400.1	-	-	2 (2)
	C1s	285.2, 286.9, 289.1	2.59 : 33.76 : 1	2 : 32 : 1	33.78 (35)
(d)	N1s	400.4	-	-	2 (2)
	C1s	285.3, 287.1, 289.1	2.38 : 35.38 : 1	2 : 32 : 1	29.76 (35)
(e)	N1s	399.7	-	-	2 (2)
	C1s	284.4, 286.4, 288.7	2.51 : 36.31 : 1	2 : 32 : 1	30.01 (35)
(f)	N1s	399.8	-	-	2 (2)
	C1s	284.6, 286.6, 289.1	2.24 : 34.51 : 1	2 : 32 : 1	34.24 (35)
(g)	N1s	399.9	-	-	2 (2)
	C1s	284.8, 286.7, 288.7	2.38 : 35.23 : 1	2 : 32 : 1	31.68 (35)

**Tabelle 6-3: Signallage, Signalverhältnis und relative Intensität (Sollwerte in Klammern) der an die XP-Spektren einer mPEG750-Harnstoffschicht (3) auf Silizium bzw. Glas angepassten Kurven; (a) Präparation in Toluol 5 d bei RT (Si mit Caroscher Säure gereinigt); (b) Präparation in Toluol 5 d bei RT (Si nach Strukturierung mit PS(500)-b-P2VP(270) [5mg/ml; Beladung 0.5] und anschließender Plasmabehandlung); (c) Präparation in Ethanol 5 d bei RT (Si mit Caroscher Säure gereinigt); (d) Präparation in Toluol bei 80°C in Gegenwart von Triethylamin (Si mit Caroscher Säure gereinigt); (e) Präparation in Toluol 5 d bei RT (Glas mit Caroscher Säure gereinigt); (f) Präparation in Toluol 5 d bei RT (Glas nach Strukturierung mit PS(500)-b-P2VP(270) [5mg/ml; Beladung 0.5] und anschließender Plasmabehandlung); (g) Präparation in Toluol bei 80°C in Gegenwart von Triethylamin (Glas mit Wasserstoffplasma gereinigt); Fehler bei Signallage  $\pm 0.2$  eV und bei Signalverhältnis  $\pm 3$  %.**

Aus Tabelle 6-3 (a) bis (c) ergibt sich für die Anbindung des mPEG750-Harnstoffs (**3**) auf Silizium bei Raumtemperatur annähernd vergleichbare Schichtzusammensetzungen; bis auf einen leicht höheren aliphatischen Kohlenstoffanteil im Falle der in Ethanol (c) präparierten Oberflächen sind alle Signallagen wie auch deren Intensitätsverhältnisse nahezu konstant. Aus Toluol bei 80°C in Gegenwart von Triethylamin beschichtete Siliziumoberflächen (d) weisen einen erhöhten Stickstoffanteil auf (15 %). Dieser könnte an einem Einbau des Triethylamins liegen; eine höhere Packungsdichte kann auf Grund konstanter Schichtdicken ausgeschlossen werden. XPS-Daten des mPEG750-Harnstoffs (**3**) auf Glas sind in Tabelle 6-3 von (e) bis (g) zusammengestellt. Der signifikanteste Unterschied zu Silizium liegt in der Reinigung und Aktivierung mittels Caro'scher Säure. Hier zeigt sich im Falle der Glassubstrate sowohl für Kohlenstoff als auch im Kohlenstoff-Stickstoff-Vergleich eine erhöhte Oberflächenkonzentration an aliphatischem Kohlenstoff wie auch an Stickstoff.

An dieser Stelle ist zu bemerken, dass Siliziumoberflächen, die vor einer Funktionalisierung Wasserstoffplasma ausgesetzt waren, sei es zur Reinigung oder im Rahmen der Nanostrukturierung, im XP-Spektrum eine Stickstoffspezies bei einer Bindungsenergie von  $398 \pm 0.2$  eV aufwiesen (Abbildung 6-5). Vergleichsmessungen auf Siliziumnitridoberflächen, welche keinem Plasma ausgesetzt wurden, zeigten vergleichbare N1s-Signallagen. Somit wurde die beobachtete zweite Stickstoffspezies Siliziumnitrid zugeordnet. Der im Plasmaprozess notwendige Stickstoff ist höchstwahrscheinlich auf eine Undichtigkeit des Plasmaofens und dem damit verbundenen Eindringen von Luft zu erklären. Die Intensität des XP-Signals schwankte bezogen auf die des N1s-Signals von mPEG750-Harnstoff (**3**) um etwa 20 bis 200 %. Auf Glasproben wurde ein solches Verhalten nicht beobachtet.

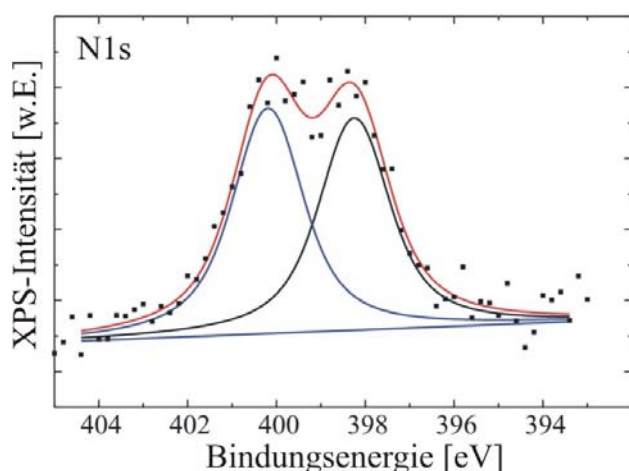
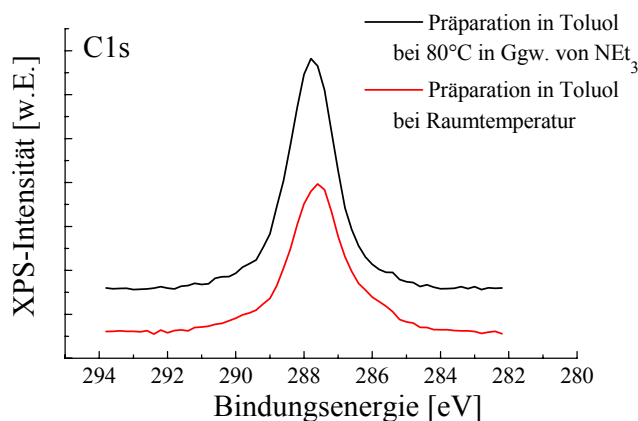


Abbildung 6-5: N1s-XP-Detaillenspektrum einer mittels PS(500)-b-P2VP(270) [5mg/ml; Beladung 0.5] strukturierten und mit (**3**) passivierten Siliziumprobe. Das Signal bei  $400.2 \pm 0.2$  eV kann dem Stickstoff aus (**3**) und das bei  $398 \pm 0.2$  eV dem entstandenen Siliziumnitrid zugeordnet werden.

Im Gegensatz zum mPEG750-Harnstoff (**3**) ließen sich mit dem längeren Derivat mPEG2000-Harnstoff (**4**) keine vergleichbaren Schichten bezüglich der Inkubation der Oberflächen bei

Raumtemperatur bzw. bei 80°C erzielen. XP-C1s-Detailspektren zeigen einen um bis zu 40 % niedrigeren Polyethylenglykolanteil (Verlust an Intensität bei  $287 \pm 0.2$  eV) im Spektrum und ein um bis zu 250 % höheres Kohlenstoffsignal im aliphatischen Bereich ( $285 \pm 0.2$  eV), welcher sich in einer ausgeprägten Schulter im Spektrum äußert (Abbildung 6-6).



**Abbildung 6-6: XP-C1s-Detail-spektren von mPEG2000-Harnstoff (4) auf Silizium (mit Extran, Millipore©-Wasser und Wasserstoffplasma gereinigt); [rot]: 5 Tage bei Raumtemperatur in Toluol; [schwarz] 18 h bei 80°C in Toluol in Gegenwart von Triethylamin.**

Auf Grund dieser XP-spektroskopischen Daten wurden daher für die Folgeexperimente sämtliche Funktionalisierungen von Glas und Silizium mit mPEG2000-Harnstoff (4) bei 80°C durchgeführt.

Ebenso wie bei mPEG750-Harnstoff (3) wurden mit mPEG2000-Harnstoff (4) sowohl Glas- als auch Siliziumoberflächen beschichtet. XP-spektroskopische Untersuchungen solcher Beschichtungen ergaben folgende Resultate:

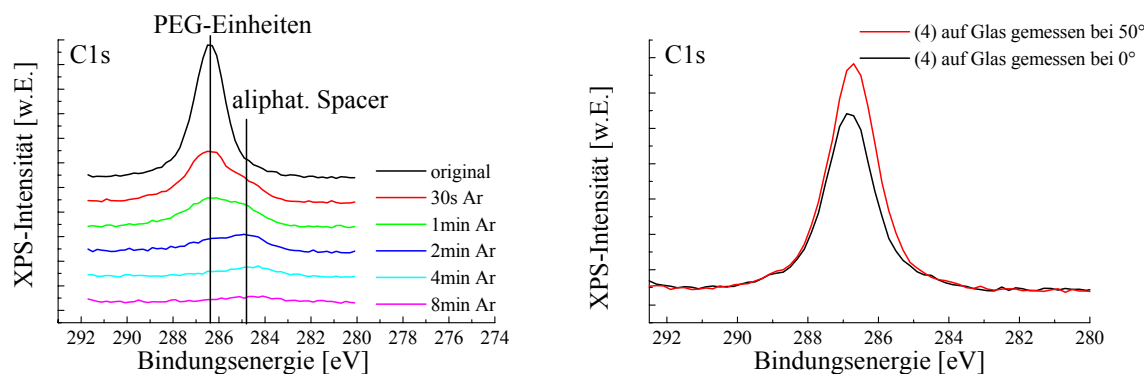
	Signal	Signallage [eV]	Signalverhältnis	Theor. Signalverhältnis	relative Intensität
(a)	N1s	400.3	-	-	2 (2)
	C1s	285.2, 287.3, 289.3	1.82 : 79.56 : 1	2 : 88 : 1	86.82 (91)
(b)	N1s	400.3	-	-	2 (2)
	C1s	285.3, 287.3, 289.4	1.85 : 76.64 : 1	2 : 88 : 1	86.02 (91)
(c)	N1s	399.8	-	-	2 (2)
	C1s	284.6, 286.7, 288.7	1.74 : 80.58 : 1	2 : 88 : 1	83.14 (91)
(d)	N1s	399.9	-	-	2 (2)
	C1s	284.8, 286.8, 288.9	1.95 : 80.38 : 1	2 : 88 : 1	82.59 (91)

**Tabelle 6-4: Signallage, Signalverhältnis und relative Intensität (Sollwerte in Klammern) der an die XP-Spektren einer mPEG2000-Harnstoffschicht (4) auf Silizium bzw. Glas angepassten Kurven; alle Präparation in Toluol bei 80°C in Gegenwart von Triethylamin (a) Si mit Caroscher Säure gereinigt; (b) Si mit Extran, Millipore©-Wasser und Wasserstoffplasma gereinigt; (c) Glas mit Caroscher Säure gereinigt; (d) Glas nach Strukturierung mit PS(1780)-b-P2VP(525) [2mg/ml; Beladung 0,2] und anschließender Plasmabehandlung; Fehler bei Signallage  $\pm 0.2$  eV und bei Signalverhältnis  $\pm 3$  %.**

Die XP-spektroskopischen Daten aus Tabelle 6-4 zeigen für mPEG2000-Harnstoff (4) im Falle der Präparation auf Silizium [(a) und (b)] kaum Unterschiede bezüglich der

Schichtzusammensetzung. Sowohl die relativen Intensitäten (C1s zu N1s) wie auch die Signalverhältnisse der verschiedenen Oxidationsstufen des Kohlenstoffs bleiben nahezu konstant. Die gemessenen C1s/N1s-Verhältnisse liegen in beiden Fällen etwa 5 % unterhalb des Theoriewertes, wogegen der Anteil des Carbonylkohlenstoffes um etwa 10 % höher ist als nach der Stöchiometrie anzunehmen ist. Beschichtungen von Glas [(c) und (d)] mit mPEG2000-Harnstoff (**4**) zeigen ebenfalls nur geringe Unterschiede voneinander bezüglich ihrer Schichtzusammensetzung. Die Abweichung von den Theoriewerten liegt mit einem Stickstoffüberschuss von etwa 10 % in einer ähnlichen Größenordnung wie im Falle des mPEG750-Harnstoffes (**3**).

Durch schichtweises Abtragen des mPEG2000-Harnstoffes (**4**) [Glasprobe vergleichbar zu Tabelle 6-4-(d); Strukturierung mittels PS(500)-P2VP(275); Beladung 0.5] mit Argonionen im Ultrahochvakuum konnte die Chemisorption von mPEG2000-Harnstoff (**4**) gezeigt werden. Von Beginn des Argonionenbeschusses an nimmt die C1s-Intensität der PEG-Einheiten ab (Abbildung 6-7, links). Damit verbunden steigt zunächst die C1s-Intensität des aliphatischen Spacers auf Grund geringerer Abschwächung durch den dünneren PEG-Film an. Nach bereits einer Minute Argonbeschuss ist die PEG-Schicht soweit entfernt, dass auch der Spacer abgetragen wird.

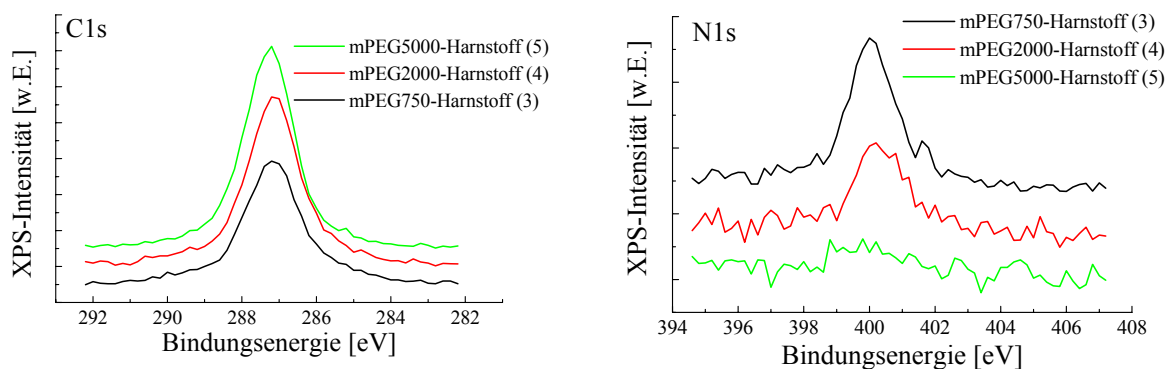


**Abbildung 6-7:** [links] C1s-XP-Detaillösungen nach jedem schichtweisen Abtragen von (**4**) auf Glas durch Beschuss mit Argonionen; [rechts] winkelabhängige C1s-XP-Detaillösungen von (**4**) auf Glas

Winkelabhängige XP-Messungen auf mit mPEG2000-Harnstoff (**4**) beschichtetem Glas belegten diese Chemisorption (Abbildung 6-7, rechts). Bei einem Messwinkel von 50° ergaben die C1s-Intensitäten ein Verhältnis von 1.82 : 99.56 : 1. Im Vergleich zu Tabelle 6-4 ergibt sich hieraus eine Zunahme an Intensität aus den Ethylenglykoleinheiten bezogen auf die Carbonyleinheit. Signalverlust ist beim aliphatischen Spacer zu erkennen. Das C/N-Verhältnis wurde mit 2 : 106.22 ermittelt. Damit zeigt sich, wie bereits beim Argonbeschuss,

dass sich die Ethylenglykoleinheiten des mPEG2000-Harnstoffs (**4**) oberhalb des aliphatischen Spacers in der Schicht befinden.

Beschichtungen von Silizium und Glas mit mPEG5000-Harnstoff (**5**), wurden wie beim mPEG2000-Harnstoff (**4**) bei 80°C durchgeführt. Eine Bestimmung der Signalverhältnisse mittels XPS war auf Grund der geringen Mengen an Stickstoff bzw. aliphatischem und carbonylischem Kohlenstoff nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Spektren qualitativ mit der kürzeren Homologen (**3**) und (**4**) verglichen.



**Abbildung 6-8: Zusammenstellung der C1s- und N1s-XP-Detaillspektren der mPEG-Harnstoffderivate (**3**), (**4**) und (**5**) auf Silizium**

Aus Abbildung 6-8 erkennt man die Abnahme der Stickstoffkonzentration mit steigendem Molekulargewicht des angebondenen mPEG-Harnstoffderivats. Die nur leichte Zunahme der Kohlenstoffkonzentration bezogen auf (**5**) im Vergleich zu (**4**) spiegelt sich in der nur etwa 10 % dickeren Schicht auf Silizium wider. Die über die Substratschwächung ermittelten Schichtdicken betragen für den mPEG750-Harnstoff (**3**)  $16.5 \pm 2 \text{ \AA}$ , für den mPEG2000-Harnstoff (**4**)  $21.5 \pm 2 \text{ \AA}$  und für den mPEG5000-Harnstoff (**5**)  $23.8 \pm 3 \text{ \AA}$ . Die Schichtdicken für (**3**) und (**5**) weichen sehr stark von den Literaturwerten ab, die mit  $58 \pm 10 \text{ \AA}$  für das bzw.  $102 \pm 10 \text{ \AA}$  für die entsprechenden Trimethoxysilylderivate von (**3**) und (**5**) angegeben sind.<sup>15</sup> Die entsprechenden veröffentlichten XP-Daten zeigen zwar einen erwarteten Rückgang der Stickstoffkonzentration auf der Oberfläche, jedoch bleiben die C1s/Si2p-Verhältnisse nahezu konstant. Bei einer Zunahme der PEG-Schicht von 58 auf 102 Å wäre bei einer Abschwächungslänge von etwa 35 Å für Si2p (siehe Tabelle 5-2) eine Abnahme des Substratsignals um 70 bis 75 % zu erwarten, die jedoch nicht beobachtet wird; daher stellt sich hier die Frage der Richtigkeit dieser Literaturwerte. Den für (**4**) und (**5**) ermittelten Schichtdicken entsprechen neuere auf Gold ermittelte PEG-Schichten vergleichbarer Kettenlänge. Der hierbei angewandte zweistufige Mechanismus beinhaltet zunächst eine Aminierung der Goldoberfläche mittels Cysteamin mit anschließender

irreversibler Ankopplung von NHS-PEGs. Diese Irreversibilität lässt den Vergleich zur Anbindung von (4) und (5) auf Glas bzw. Silizium zu, da diese ebenfalls irreversibel ist. Die ermittelten Schichtdicken liegen bei 19.1 Å für ein PEG-Derivat der Molmasse 2025 g/mol [ $21.5 \pm 2$  Å bei (4)] und 26.1 Å für ein PEG-Derivat der Molmasse 5261 g/mol [ $23.8 \pm 3$  Å bei (5)].<sup>17</sup>

Die Schichtdicken dieser untersuchten PEG-Systeme wie auch deren Oberflächenbedeckung und Packungsdichten werden in Kapitel 6.1.5 zusammengefasst und diskutiert.

### 6.1.2.3 Passivierung mit mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin (6)

XP-spektroskopische Untersuchungen der mit mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin (6) beschichteten Siliziumoberflächen ergaben folgende Resultate:

	Signal	Signallage [eV]	Signalverhältnis	Theor. Signalverhältnis	relative Intensität
(a)	N1s	400.4, 402.4	1 : 1.78	-	1 (1)
	C1s	285.2, 287.1	2 : 32.30	2 : 35	34.60 (37)
(b)	N1s	400.0, 402.4	1 : 0.89	-	1 (1)
	C1s	285.2, 287.1	2 : 32.40	2 : 35	39.87 (37)

Tabelle 6-5: Signallage, Signalverhältnis und relative Intensität (Sollwerte in Klammern) der an die XP-Spektren einer mPEG750- $\beta$ -Hydroxyaminschicht (6) auf Silizium angepassten Kurven; (a) Präparation von (6) in Toluol 5d bei Raumtemperatur; (b) Präparation von (6) in Ethanol 5d bei Raumtemperatur; Fehler bei Signallage  $\pm 0.2$  eV und bei Signalverhältnis  $\pm 3$  %.

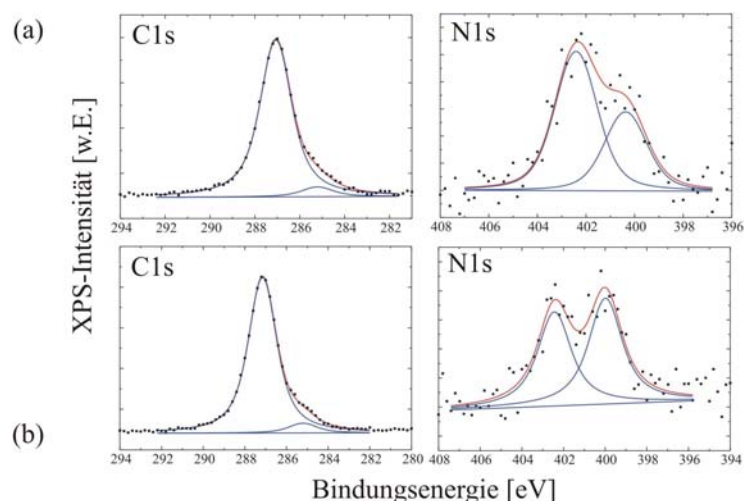


Abbildung 6-9: C1s- und N1s-XP-Detaillspektren einer mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin (6) beschichteten Siliziumoberfläche angepassten Kurven; (a) Präparation von (6) in Toluol 5d bei Raumtemperatur; (b) Präparation von (6) in Ethanol 5d bei Raumtemperatur

Die N1s-XP-Detailspektren weisen auf zwei unterschiedliche Stickstoffspezies hin. Das Signal bei  $400.2 \pm 0.2$  eV wurde dem sekundären Amin und das bei  $402.4 \pm 0.2$  eV seiner protonierten Form zugeordnet. Proben präpariert aus dem unpolare Lösungsmittel Toluol weisen einen höheren Ammoniumanteil auf und besitzen insgesamt eine höhere Stickstoffkonzentration. Dieses Verhalten wurde nicht weitergehend untersucht. Die mittels der Substratabschwächung ermittelte Schichtdicke beträgt  $16.5 \pm 2$  Å. mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin (**6**) sollte chemisch analoge Schichten zur zweistufigen Funktionalisierung mittels GOPTES und mPEGA750 ergeben. Es erwies sich jedoch bereits als Rohsubstanz als sehr polymerisationsempfindlich. Dies ist höchst wahrscheinlich auf die freie Hydroxygruppe zurückzuführen.

### 6.1.3 Untersuchung der proteinresistenten Eigenschaften der Polyethylenglykolschichten mittels Zelladhäsion

Zur Ermittlung der Proteinresistenz lassen sich neben den spektroskopischen Methoden auch biologische heranziehen. Durch Kultivieren von Zellen auf den zu unterscheidenden Oberflächen lassen sich auch Aussagen über ihre adhäsiven oder resistenten Eigenschaften treffen. Die in Kapitel 6.1.1 und 6.1.2 vorgestellten Systeme wurden auf diese Eigenschaften hin untersucht, indem Fibroblasten (GFP-3T3) bei einer FBS-Konzentration von 1% auf diesen beschichteten Oberflächen ausgesät und über 48 Stunden kultiviert wurden.

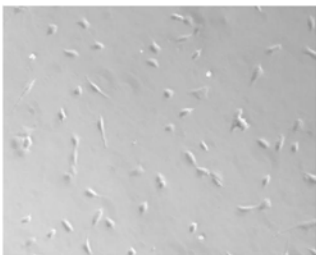
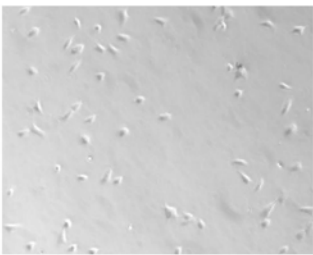
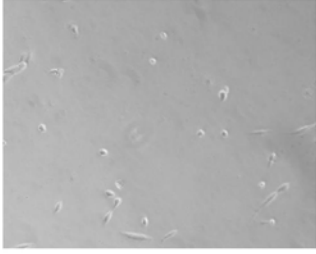

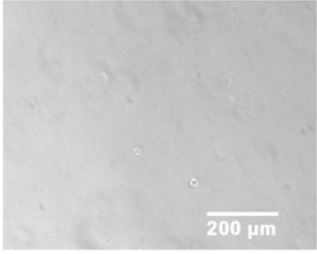
Tabelle 6-6 zeigt exemplarisch Aufnahmen der Zelladhäsionsversuche auf unterschiedlich beschichteten Glasoberflächen. Die mPEG-Harnstoffe (**3**)<sup>q</sup>, (**4**), (**5**) und das mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin (**6**) wie auch die mPEGAs mit einem Molekulargewicht  $\geq 5000$  zeigten sehr gutes zellresistentes Verhalten. mPEG750-Urethan (**1**)<sup>r</sup>, mPEGA750 und -2000 wie auch mPEG2000 und PEG6000 wiesen vereinzelt Zellen auf, die jedoch nicht sonderlich gut adhäreren konnten und bei längerer Kultivierung als 48h dem Zelltod erlagen. Die kurzen mPEG-Systeme der Molmassen 350 und 750 waren gegenüber Fibroblasten unzureichend resistent. Ebenso verhielt sich das mPEG2000-Urethan (**2**), welches trotz größerer Schichtdicke als sein 750er Analogon (**1**) schlechter die Zelladhäsion verhinderte. Höchstwahrscheinlich ist dies auf die geringe Oberflächendichte auf Grund der hohen Fragmentierungsrate zurückzuführen (Kapitel 6.1.2.1).

---

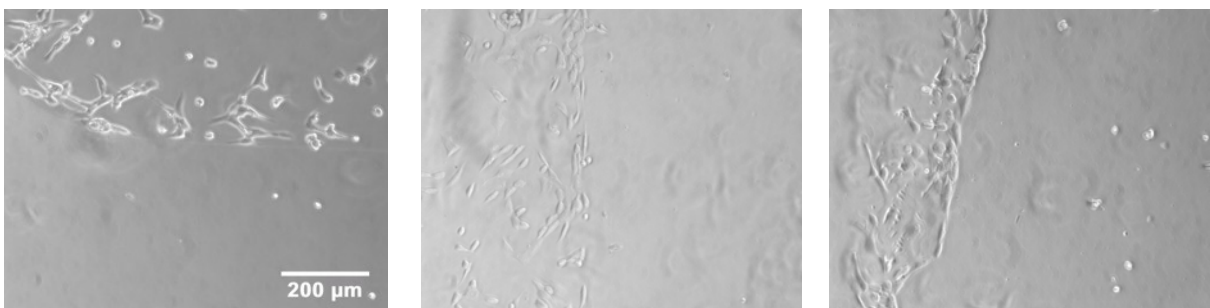
<sup>q</sup> Zelladhäsionsexperimente zeigten konstantes Verhalten unabhängig von der Präparationsmethode der Oberfläche (vgl. Tabelle 6-3)

<sup>r</sup> Präparation: 5 Tage bei Raumtemperatur in Toluol

Einige Systeme wurden auf ihre proteinresistenten Eigenschaften auf PDMS getestet. Hierzu wurde nach der partiellen Passivierung die PDMS-Probe 2 h mit einer Fibronectinlösung (10 µg/ml) inkubiert und auf dieser anschließend Fibroblasten bei einer FBS-Konzentration von 1 % 24 h kultiviert. Für mPEG750-Harnstoff (3)<sup>s</sup>, mPEG750-β-Hydroxyamin (6)<sup>s</sup> und PEG6000 erkennt man in Abbildung 6-10 eine deutliche Kante zwischen resistentem und unpassiviertem Teil der Probe.

PEG-System	mPEG: 350, 750 mPEG2000-Urethan (2)	(m)PEG: 2000, 6000 mPEGA: 750, 2000 mPEG750-Urethan (1)	mPEGA: 5000, 10000, 20000 mPEG750- β-Hydroxyamin (6) mPEG-Harnstoff: 750 (3), 2000 (4), 5000(5)
	Referenz (Petrischale)		
Mit entspr. PEG-System beschichtete Glasoberfläche			

**Tabelle 6-6:** Lichtmikroskopische Aufnahmen nach 48 h der mit den unterschiedlichen PEG-Systemen beschichteten Glasoberflächen, auf denen Fibroblasten bei einer FBS-Konzentration von 1 % kultiviert wurden. Die Referenzaufnahmen (Petrischale, in der die Glasprobe zur Zellkultivierung eingelegt wurde) zeigen das Wachstum der Zellen auf einer nicht resistenten Oberfläche.



**Abbildung 6-10:** Mikroskopische Aufnahmen von partiell passivierten PDMS-Proben. [links] mPEG750-Harnstoff (3) [mitte] mPEG750-β-Hydroxyamin (6) [rechts] PEG6000

<sup>s</sup> Präparation: 5 Tage bei Raumtemperatur in Ethanol

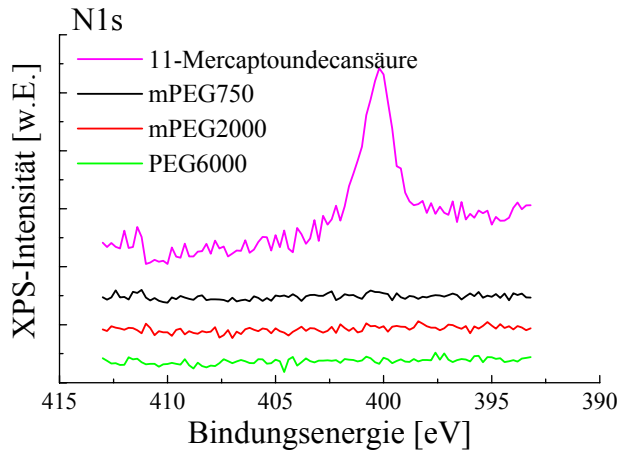


### 6.1.4 Untersuchung der proteinresistenten Eigenschaften der Polyethylenglykolschichten mittels XPS

Die Behandlung der mit unterschiedlichen PEGs beschichteten Silizium- und Glasoberflächen mit einer PBS gepufferten Avidinlösung (50 µg/ml; 75 min bei Raumtemperatur) wurde nach dem Abspülen mit einer 1 %-igen Tween20/PBS-Lösung, anschließend mit PBS und zuletzt mit Millipore®-Wasser mittels XP-Spektroskopie untersucht.

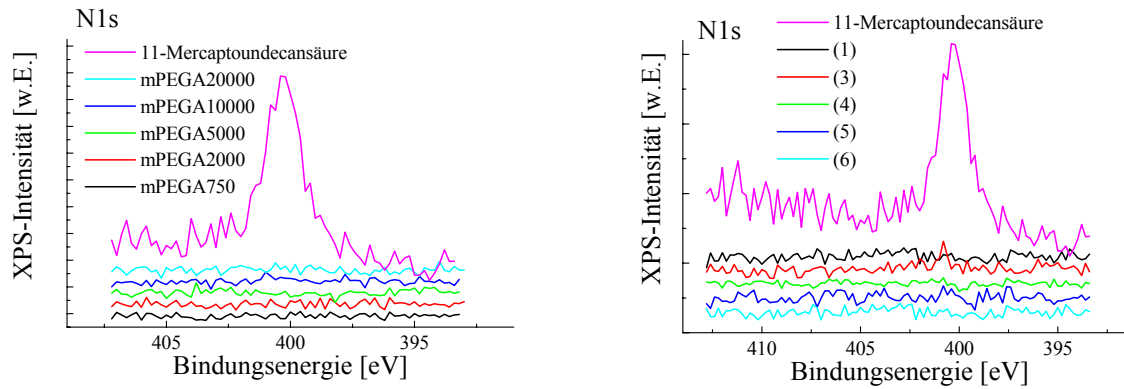
In Abbildung 6-11 sind die N1s-Detailspektren der mittels GOPTES und (m)PEGs funktionalisierten Glasoberflächen nach der oben erläuterten Avidininkubation dargestellt. Als Referenz wurde die in Kapitel 6.2.3.1 untersuchte unspezifische Anbindung von Avidin auf einer mit 11-Mercaptoundecansäure funktionalisierten polykristallinen Goldschicht herangezogen. Die Oberflächenbedeckung mit Avidin betrug hier etwa  $26 \pm 2 \%$  (siehe Kapitel 6.2.3.1). Die geschätzte Empfindlichkeit liegt etwa bei 10 % des ermittelten Referenzsignals, somit sollte eine Oberflächenbedeckung von  $\geq 2.6 \%$  Avidin nachweisbar sein. In Abbildung 6-11 ist für keines der untersuchten (m)PEG-Systeme ein N1s-Signal zu erkennen, somit liegt die Proteinbedeckung unterhalb 2.6 % der Oberfläche.

Auf Grund seiner schlechten Zellresistenz wurde das mPEG350 hier nicht untersucht.



**Abbildung 6-11:** N1s-XP-Detailspektren verschiedener mittels GOPTES und (m)PEG beschichteter Si(100)-Oberflächen bzw. einer mit 11-Mercaptoundecansäure funktionalisierten Goldoberfläche (Referenz) nach deren Behandlung mit einer PBS gepufferten Avidinlösung.

Für alle anderen PEG-Systeme [mPEGAs bzw. (1) bis (6)] wurden die N1s-Messsignale vor und nach der Avidininkubation verglichen. Die gemessenen N1s-Signale wurden voneinander subtrahiert [ $I = I(N1s_{\text{PEG+Avidin}}) - I(N1s_{\text{PEG}})$ ] und graphisch aufgetragen. Die auf diese Weise ermittelten Differenzspektren sind in Abbildung 6-12 dargestellt. Das ermittelte Differenzreferenzspektrum zeigt auf Grund der Proteinanbindung ein positives N1s-Signal.



**Abbildung 6-12:** ermittelte N1s-XP-Differenzspektren aus  $[I = I(N1s_{PEG+Avidin}) - I(N1s_{PEG})]$ ; [links] mPEGAs (MW 750 bis 20000) auf mit GOPTES funktionalisiertem Glas; [rechts] mPEG-Alkoxysilanderivate (1) bis (6) auf Silizium; Referenz: 11-Mercaptoundecansäure auf Gold; alle Oberflächen wurden 75 min einer PBS-gepufferten Avidinlösung (50  $\mu\text{g/ml}$ ) ausgesetzt.

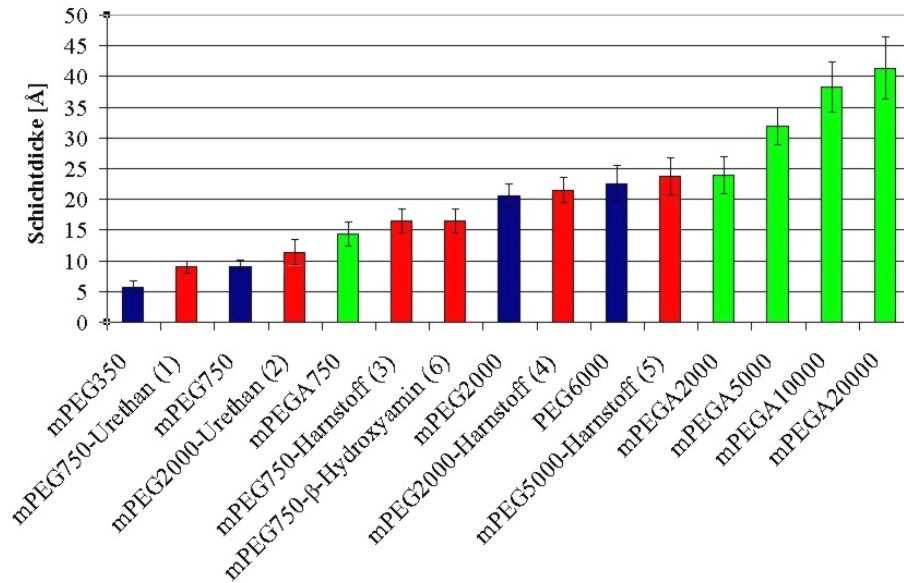
Aus den bereits oben beschriebenen Gründen kann man anhand der dargestellten Differenzspektren sowohl für die mPEGAs auf mit GOPTES behandeltem Glas als auch für (1) bis (6) auf Silizium wiederum eine Avidinbedeckung kleiner als 2.6 % folgern.

Auf Grund seiner schlechten Zellresistenz wurde das mPEG2000-Urethan (2) hier nicht untersucht.

### 6.1.5 Übersicht über sämtliche dargestellten Polyethylenglykolschichten und deren protein- und zellresistenten Eigenschaften

Zusammenfassend werden hier die wichtigsten ermittelten Daten aus den vorangegangenen Kapiteln über die einzelnen PEG-Systeme und deren resistenten Eigenschaften bezüglich Proteinen (Avidin) und Zellen (Fibroblasten) aufgeführt um eine Auswahl für die Übertragung auf die Goldnanostrukturen zu treffen.

Die ermittelten Schichtdicken der vorgestellten PEG-Systeme sind in Abbildung 6-13 dargestellt.



**Abbildung 6-13:** Übersicht über alle dargestellten Polyethylenglykolschichten: [blau] mit hydroxyterminierten (m)PEGs und GOPTES; [grün] mit aminoterminierten mPEGAs und GOPTES; [rot] mit den verschiedenen mPEG-Alkoxysilanderivaten (1)-(6) zur Selbstaggregation

Mittels der in Kapitel 4.1 dargestellten Methode<sup>1,2</sup> und des Polymermodells von de Gennes<sup>4</sup> wurden für die dargestellten PEG-Systeme anhand ihrer Schichtdicke über die Oberflächenbedeckung die Packungsdichte  $\Sigma$ , der Abstand der Ankerpunkte  $\mathbf{D}$  (*engl.*: grafting points), der Flory-Radius  $\mathbf{R}_F$  und die Schichtdicke  $\mathbf{L}$  der in einem guten Lösungsmittel gequollenen bzw. partiell entfalteten PEG-Ketten berechnet und in Tabelle 6-7 zusammengestellt. Die mPEG-Urethane (1) und (2) wurden auf Grund ihres instabilen Verhaltens nicht einbezogen. Zur Übersicht sind die zell- und proteinresistenten Eigenschaften ebenfalls aufgeführt.

Wie in Tabelle 6-7 ersichtlich nimmt die Packungsdichte  $\Sigma$  innerhalb homologer Reihen [(m)PEG; mPEGA bzw. mPEG-Harnstoffe] mit ansteigendem Molekulargewicht erwartungsgemäß ab, was auf die verstärkte sterische Hinderung auf Grund der zunehmenden Kettenlängen zurückzuführen ist. Weiterhin erkennt man, dass bei kurzen PEGs (750er) über die einstufige Funktionalisierung mittels der Alkoxysilangruppe [(3) und (6)] höhere Packungsdichten erzielt werden können als bei dem Zweistufenmechanismus [mPEG750 und mPEGA750]. Die Zellresistenz bezogen auf Fibroblasten zeigt ein interessantes Verhalten. Bei einer Packungsdichte von 0.79 Molekülen/nm<sup>2</sup> [mPEG750] ist keine Zellresistenz zu beobachten. Steigt die Dichte auf 1.18 Moleküle/nm<sup>2</sup> [mPEGA750] so verbessert sich die Resistenz deutlich und erreicht ab 1.29 Molekülen/nm<sup>2</sup> [(6) bzw. (3)] ihr Maximum. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Grundsysteme Unterschiede aufweisen. mPEG750 und mPEGA750 befinden sich auf einer mittels 3-Glycidylpropyl-triethoxysilan (GOPTES)

aktivierten Oberfläche, d.h. die PEGs befinden sich auf einem GOPTES-Film, der eine höhere Packungsdichte ( $\sim 5$  Moleküle/nm<sup>2</sup>; mit etwa 3 Å Schichtdicke ermittelt via XPS und einer Dichte<sup>16</sup> von 1.2 g/cm<sup>3</sup>) vorweist als die PEGs; möglicherweise hat dieser Überschuss Einfluss auf die Passivierung. mPEG750-Urethan (**1**) hat insgesamt die gleiche Schichtdicke wie mPEG750 auf GOPTES (vgl. Abbildung 6-13). Jedoch wurde in Kapitel 6.1.2.1 gezeigt, dass (**1**) zu über 60 % auf der Oberfläche fragmentiert vorliegt, d.h. keine PEG-Kette mehr trägt. Somit ist die Packungsdichte von (**1**) bezogen auf intakte PEG-Ketten geringer als die des mPEG750 und trotzdem sind seine zellresistenten Eigenschaften besser (siehe Tabelle 6-7). Folglich ist der Zusammenhang zwischen Packungsdichte und Passivierung dieser PEG750-Derivate präparations- und systemabhängig, jedoch zeigt sich tendenziell im Vergleich von mPEG750 zu mPEGA750 bzw. mPEG750-Urethan (**1**) zu mPEG750-Harnstoff (**3**) und mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin (**6**) eine Verbesserung der Passivierung mit steigender Packungsdichte.

PEG	$\Sigma$ [N/nm <sup>2</sup> ]	D [nm]	R <sub>F</sub> [nm]	L [nm]	Zellre- sistenz	Avidin- resistenz
mPEG350	0.93 ± 0.16	1.17 ± 0.10	1.15	1.2	-	n.u.
mPEG750	0.79 ± 0.09	1.27 ± 0.07	1.70	2.1	-	+
mPEG2000	0.72 ± 0.08	1.33 ± 0.07	2.92	4.9	+	+
PEG6000	0.27 ± 0.04	2.17 ± 0.16	5.58	10.4	+	+
mPEGA750	1.18 ± 0.17	1.04 ± 0.07	1.75	2.5	+	+
mPEGA2000	0.82 ± 0.11	1.25 ± 0.07	2.96	5.3	+	+
mPEGA5000	0.45 ± 0.05	1.68 ± 0.08	5.05	10.5	++	+
mPEGA10000	0.27 ± 0.03	2.17 ± 0.12	7.58	17.4	++	+
mPEGA20000	0.15 ± 0.02	2.91 ± 0.20	11.45	28.5	++	+
mPEG750-Urethan ( <b>1</b> )	x	x	x	x	+	+
mPEG2000-Urethan ( <b>2</b> )	x	x	x	x	-	n.u.
mPEG750-Harnstoff ( <b>3</b> )	1.36 ± 0.17	0.97 ± 0.06	1.75	2.6	++	+
mPEG2000-Harnstoff ( <b>4</b> )	0.75 ± 0.08	1.30 ± 0.07	2.92	5.0	++	+
mPEG5000-Harnstoff ( <b>5</b> )	0.35 ± 0.05	1.91 ± 0.14	4.95	9.3	++	+
mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin ( <b>6</b> )	1.29 ± 0.16	0.99 ± 0.06	1.80	2.7	++	+

**Tabelle 6-7: Packungsdichte ( $\Sigma$ ), Abstand zwischen Ankerpunkten (D), Flory-Radius (R<sub>F</sub>) und Länge der Polymerketten (L;  $\pm 15$  %) in einem guten Lösungsmittel.<sup>1-4</sup> Zur Berechnung wurde für PEG eine mittlere Dichte  $\rho^{16}$  von 1.2 g/cm<sup>3</sup> und eine Monomerengröße  $\alpha^2$  von 2.9 Å angenommen. Zellresistenz wurde nach Tabelle 6-6 in drei Klassen unterteilt [(-), (+), (+ +)]; (+) bei Avidinresistenz geht von einer Oberflächenbedeckung  $\leq 2.6$  % aus (siehe Kapitel 6.1.4); n.u. bedeutet nicht untersucht.**

Im Falle der 2000er PEGs [mPEG, mPEGA, mPEG-Harnstoff] erkennt man vergleichbare Molekülkonzentrationen auf der Oberfläche (alle drei um  $1.3 \text{ Moleküle/nm}^2$ ; Tabelle 6-7). Bei dieser Molekülgröße macht es in Bezug auf die Packungsdichte keinen Unterschied nach welcher Methode die Passivierung durchgeführt wird. Trotzdem ist ein Unterschied in der Zellresistenz zu erkennen. Während sie bei mPEG2000 und mPEGA2000 zwar insgesamt gut ist (Zellen erliegen nach spätestens 48 h dem Zelltod; vgl. Kapitel 6.1.3), zeigt mPEG2000-Harnstoff von Beginn der Zellkultivierung ein abstoßendes Verhalten. Hier kommt wohl der oben erläuterte Einfluss des GOPTES zum tragen.

Bei hohem Molekulargewicht zeigt sich der Vorteil des zweistufigen Passivierungsmechanismus über die Aktivierung der Oberfläche mittels GOPTES gegenüber der alkoxyilantragenden PEGs. mPEGA5000 hat im Vergleich zu mPEG5000-Harnstoff **(5)** eine etwa 30 % höhere Packungsdichte; es weisen aber beide sehr gute Zellresistenz auf.

Die Auswahl der PEG-Systeme für die Übertragung auf die Goldnanostrukturen auf Glas sollte folgende Anforderungen erfüllen:

- gute passivierende Eigenschaften
- geringe Schichtdicken, welche die Goldstrukturen für weitere Funktionalisierung zugänglich lassen sollten
- leichte Handhabbarkeit bzw. Präparation

Es wurden die mPEG-Harnstoffe **(3)** bis **(5)** ausgewählt, da sie im Vergleich zu den anderen PEG-Systemen Vorteile in Handhabbarkeit und Präparationsaufwand [im Vergleich zu (m)PEG(A)], bessere Zell- und Proteinresistenz [im Vergleich zu **(2)** bzw. kurze mPEGs] und höhere Stabilität [im Vergleich zu **(1)**, **(2)** und **(6)**] aufwiesen. Bezogen auf die verwendeten Goldnanopunkte (5-7 nm) konnten so unter der Betrachtung von de Gennes<sup>4</sup> drei unterschiedliche Fälle verglichen werden:

1. aus der PEG-Matrix herausragende und dadurch relativ leicht zugängliche Goldpartikel mit mPEG750-Harnstoff ( $L = 2.6 \text{ nm}$ ; siehe Tabelle 6-7)
2. Goldnanodots und umgebende PEG-Schicht in etwa gleicher Größenordnung ( $L = 5.0 \text{ nm}$ )
3. abgeschirmte Nanopartikel mit mPEG5000-Harnstoff ( $L = 9.3 \text{ nm}$ )

## 6.2 Chemisorption auf Gold

Um eine chemische Funktionalisierung der Goldnanopartikel zu erreichen wurden zunächst die dafür verwendeten Thiolderivate auf polykristallinen Goldoberflächen mittels XPS untersucht.

### 6.2.1 $\beta$ -Mercapto-N-polyethylenglykol-propionsäureamid

Polykristalline Goldoberflächen wurden 26 h mit 50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercapto-N-polyethylenglykol-propionsäureamid der Molmasse 3000 [Abk.: PEG3000-Thiol; HS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>H] sowohl in Ethanol als auch in DMF inkubiert und nach der Aufarbeitung XP-spektroskopisch untersucht.

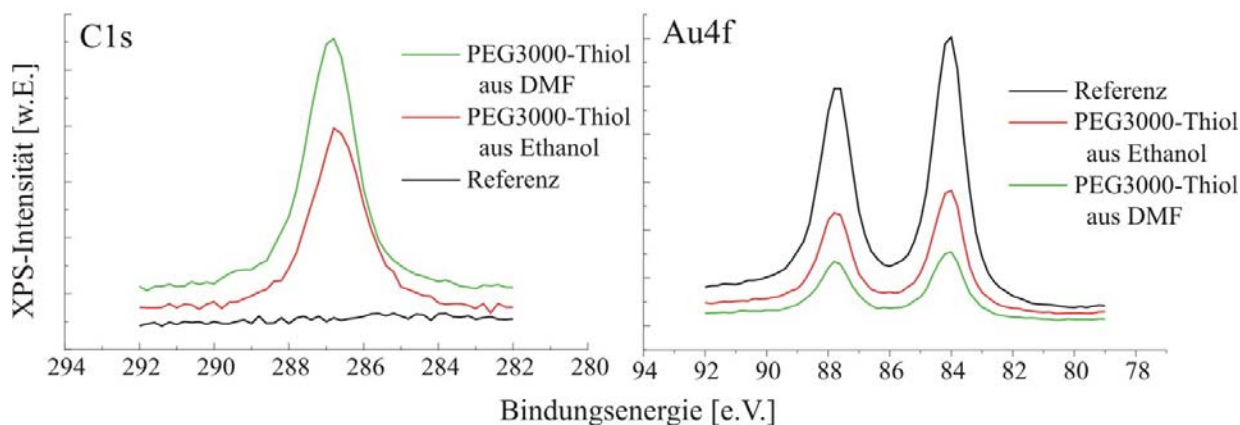


Abbildung 6-14: XP-Detailspektren des PEG3000-Thiols auf Gold präpariert aus DMF bzw. Ethanol

Aus den C1s- wie auch aus den Au4f-XP-Detailspektren zeigt sich eine höhere Oberflächenbedeckung an PEG3000-Thiol präpariert aus DMF. Dies äußert sich in der Zunahme des Kohlenstoff- bzw. in der Abnahme des Substratsignals (Au4f), womit auch die Schichtdicke des Films bestimmt wurde. Aus DMF ergibt sich unter den oben genannten Bedingungen eine Schichtdicke von  $51.0 \pm 3$  Å, aus Ethanol hingegen nur  $30.2 \pm 2$  Å. Die jeweils ermittelten C1s/O1s-Verhältnisse von  $2.06 \pm 0.04$  (EtOH) bzw.  $2.13 \pm 0.04$  (DMF) stimmen recht gut mit dem theoretischen Wert (2.01) überein, der sich aus der Stöchiometrie des Moleküls berechnen lässt.

## 6.2.2 11-Mercaptoundecansäure

XP-spektroskopische Untersuchungen der mit 11-Mercaptoundecansäure (200  $\mu\text{M}$  in Ethanol 16 h bei Raumtemperatur) beschichteten Goldoberflächen ergaben folgende Resultate:

Signal	Signallage [eV]	Signalverhältnis	relative Intensität
C1s	284.8, 289.1	9.24 : 1 (10 : 1)	10.67 (11)
O1s	532.2	-	2 (2)
S2p	162.12, 163.6	1.99 : 1 (2 : 1)	0.55 (1)

Tabelle 6-8: Signallage, Signalverhältnis und relative Intensität (Sollwerte in Klammern) der an die XP-Spektren einer 11-Mercaptoundecanschicht auf Gold angepassten Kurven; Fehler bei Signallage  $\pm 0.2$  eV und bei Signalverhältnis  $\pm 3$  %.

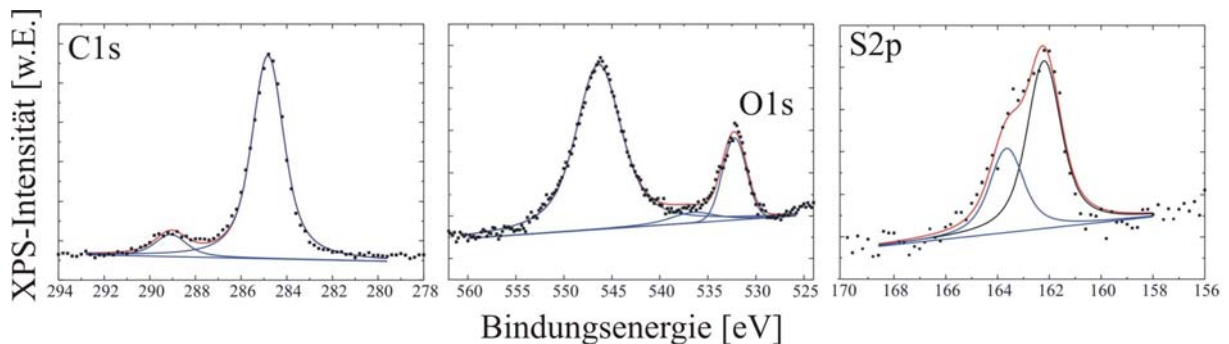


Abbildung 6-15: C1s-, O1s- und S2p-Detailspektren von 11-Mercaptoundecansäure auf Gold

Die stöchiometrischen Verhältnisse zeigten gute Übereinstimmung mit den erwarteten Werten. Die geringe S2p-Intensität ist auf die Abschwächung der darüber liegenden Undecansäureeinheit auf der Oberfläche zurückzuführen. Die mittels der Substratabschwächung ermittelte Schichtdicke beträgt  $14.3 \pm 1$  Å.

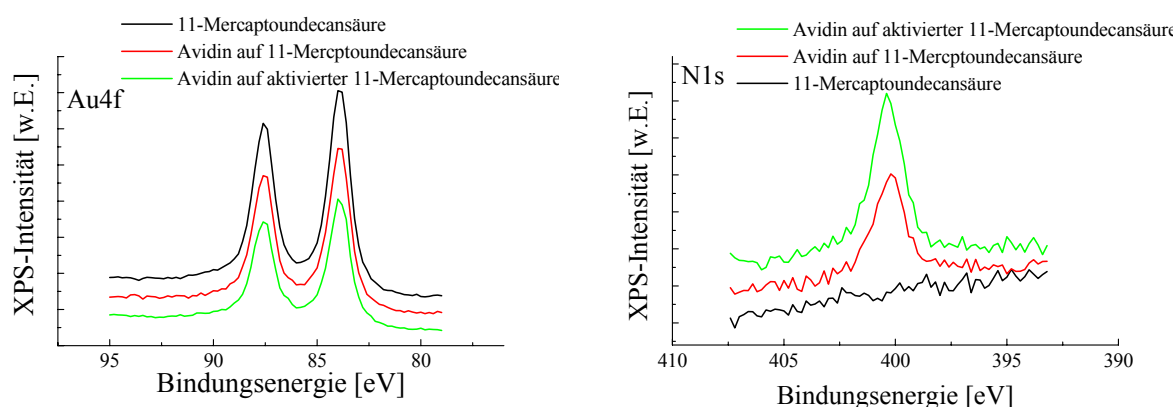
## 6.2.3 Anbindung von Avidin auf Gold

### 6.2.3.1 Kovalente Anbindung von Avidin an Gold

Die kovalente Anbindung von Avidin sollte in insgesamt drei Stufen bewerkstelligt werden. Zunächst wurde auf die polykristalline Goldoberfläche 11-Mercaptoundecansäure (MUS) über Selbstaggregation aufgebracht (vgl. Kapitel 6.2.2). Die anschließende Umsetzung der endständigen Carbonsäurefunktion zu einem Succinimidylester wurde nach Herrwerth *et al.*<sup>13,23</sup> mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)/N'-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbo-diimid-

hydrochlorid (EDC) durchgeführt. An den entstandenen Aktivester wurde schließlich Avidin über Substitution der NHS-Einheit des Esters kovalent gebunden.

In Abbildung 6-16 erkennt man die Zunahme der C1s bzw. der N1s Signale durch die Anbindung von Avidin an die 11-Mercaptoundecansäure, wobei durch die Aktivierung der Säure eine deutlich höhere Oberflächenbedeckung erreicht wird als ohne. Dies wird vor allem in den N1s- und Au4f- Detailspektren deutlich. Während das N1s-Signal im Vergleich zur nicht aktivierten Probe wächst, nimmt das Au4f-Signal auf Grund der größeren Schichtdicke der Avidinlage ab.



**Abbildung 6-16:** Au4f- und N1s-Detaillenspektren von 11-Mercaptoundecansäure und mit angebondenem Avidin (mit und ohne Aktivierung mit NHS/EDC).

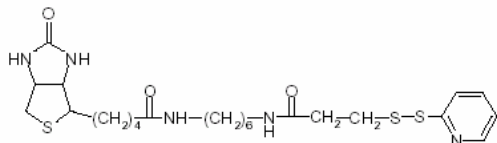
Die durch die Abschwächung des Goldsignals ermittelte Avidinbedeckung auf der Oberfläche liegt bei etwa  $26 \pm 2 \%$  für die nicht aktivierte und bei etwa  $50 \pm 3 \%$  für die aktivierte Anbindungsvariante. Im Hinblick auf eine Funktionalisierung von Goldnanopartikeln auf Glas- oder Siliziumoberflächen mit Avidin sollte dieser Ansatz geeignet sein. Erste Versuche, biotinylierte Lipidvesikel an eben genannte Oberflächen anzubinden, waren viel versprechend.<sup>113</sup>

### 6.2.3.2 Affine Anbindung von Avidin an Gold

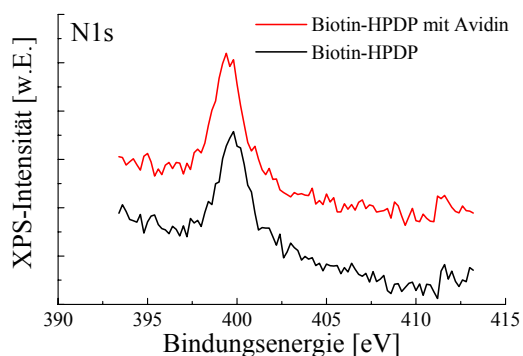
Avidin besitzt vier Bindungstaschen zur selektiven Anbindung von Biotin.<sup>114</sup> Daher ist durch die Kopplung eines biotinylierten Alkylthiols an Gold eine spezifische Avidinanbindung möglich.<sup>115</sup> Die Spaltung des unsymmetrischen Disulfids N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2-pyridyldithio)propionamid (Biotin-HPDP, siehe Abbildung 6-17) *in situ* zeigte jedoch unzureichende Spezifität bezüglich der Anbindung an Gold.<sup>116</sup> Daher wurde das Disulfid ohne



vorherige Dissoziation an die Goldoberfläche angebunden und anschließend mit Avidin umgesetzt.



**Abbildung 6-17: N1s-Detailspektrum von Biotin-HPDP und von dessen Umsetzung mit Avidin auf Gold.**



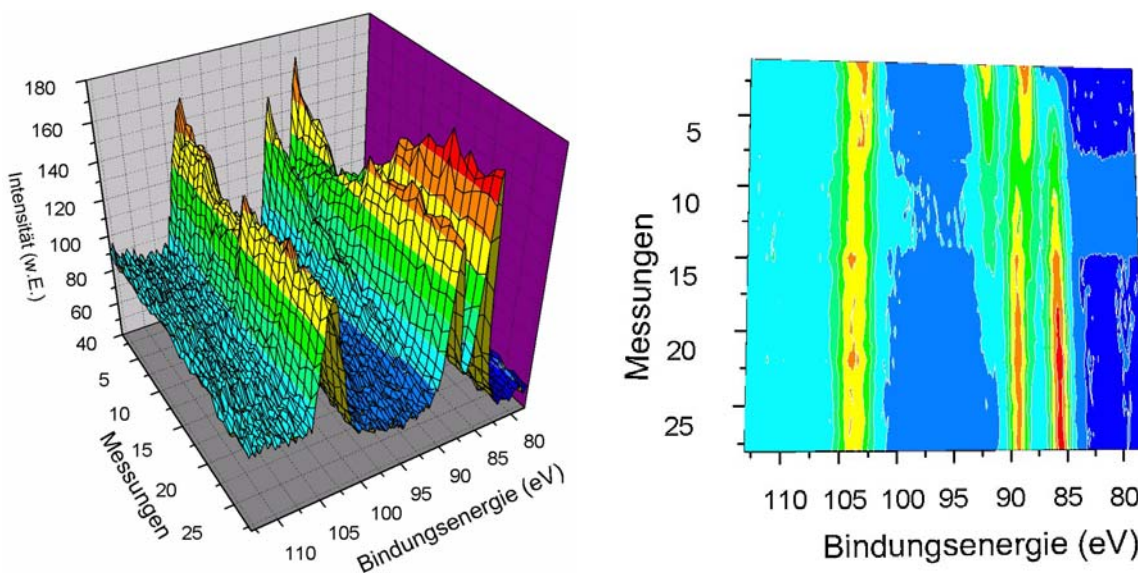
Das XP-Spektrum (Abbildung 6-17) zeigt eine nur geringe Zunahme des Stickstoffanteils nach der Umsetzung des auf der Goldoberfläche angebundenen Biotin-HPDP nach der Umsetzung mit Avidin. Die geringe Proteinanbindung könnte daran liegen, dass die Biotindichte zu hoch und somit die Wechselwirkung zu Protein gehemmt ist. Ein solches inhibierendes Verhalten wurde bereits von Häußling *et al.* beschrieben, wobei er durch Coadsorption mit andern Thiolen die Biotindichte verringert hat um dieser Hemmung entgegen zu wirken.<sup>115</sup>

### 6.3 XP-Untersuchungen monomizellarer Filme

Durch großflächige Elektronenbestrahlung der monomizellaren Filme (vgl. Kapitel 4.2.2) auf leitenden Substraten mit einer Dosis von etwa  $10000 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  bei 300 eV kann eine Vernetzung der Polymere erzielt und somit eine Fixierung dieser erreicht werden<sup>31</sup>. Unbestrahlte Filme zeigen im Au4f-Detailspektrum ein Dublett (89.9 eV bzw. 86.1 eV), welches der oxidierten Au(III)-Spezies zugeordnet werden kann, wogegen bestrahlte Filme ein Dublett bei 88.6 eV bzw. 85.0 eV aufweisen. Bei homogenen Goldoberflächen findet man das Dublett bei 87.7 eV bzw. 84.0 eV. Diese Abweichung könnte durch Aufladungseffekte der in der Polymermatrix isolierten Goldpartikel herrühren.<sup>31</sup>

Langzeit-XP-Messungen unbestrahlter monomizellarer Filme auf leitenden und nicht leitenden Oberflächen wiesen auf eine langsame chemische Umwandlung der Au(III)-Ionen hin. In Abbildung 6-18 erkennt man deutlich die Abnahme des Au(III)4f-Dubletts (88.3 und 92 eV) mit steigender Röntgendosis und die Entstehung eines „neuen“ diskreten Dubletts (85.5 und 89.2 eV). Die bei mit Röntgenstrahlung frei geschlagenen Elektronen bzw. auftretende Sekundärelektronen induzieren möglicherweise ähnliche chemische Reaktionen

wie eine direkte Elektronenbestrahlung. Ob es sich bei der neu entstandenen Goldspezies um elementares Gold handelt, das auf Grund von Aufladungseffekten in der Polymermatrix einer Signalverschiebung um 1.5 eV unterliegt<sup>31</sup>, oder ob hier die weniger stabile erste Oxidationsstufe Au(I) vorliegt bleibt ungeklärt. Da Au(I) leicht zu Au(0) und Au(III) disproportioniert<sup>117</sup> und trotz weiterer Röntgenbestrahlung keine weiteren Signale erkennbar waren, liegt das Gold wahrscheinlich elementar vor. Durch Integration der an das Messsignal angepassten Kurven wurde der Anteil des Au(III) für jede Messung bestimmt (Abbildung 6-19 links). Hierbei wurden konstante Halbwertsbreiten für alle Goldsignale angenommen, wie auch ein konstantes Verhältnis von  $Au4f_{5/2}$  zu  $Au4f_{7/2}$  mit 3:4 mit einer Multipliettaufspaltung von 3.7 eV. Zudem wurde der erste Satellit des Substratsignal ( $\Delta 9.8$  eV; 6.4 % der Substratgesamtintensität) bei 93.5 eV einbezogen (Abbildung 6-19 rechts). Man erkennt deutlich den exponentiellen Abfall der  $Au4f(III)$ -Intensität.



**Abbildung 6-18:** XP-Detaillspektren von Si2p und Au4f: 28 nacheinander auf der gleichen Stelle gemessene Detailspektren eines monomizellaren mit Goldsäure beladenen Polymerfilmes [PS(500)-b-P2VP(270), Beladung 0.5] auf Glas; [links]: 3D-Darstellung; [rechts]: Höhenprofilprojektion derselben Messungen

Vergleichbare Messungen auf Silizium oder mit Graphit bedampftem Glas zeigten eine um etwa 30 % langsamere Umwandlung. Ob diese allein auf die Leitfähigkeit der verwendeten Substrate zurückzuführen ist oder ob sie durch andere Faktoren wie z. B. Anzahl der Sekundärelektronen, Eindringtiefe der Röntgenstrahlung, Austrittsarbeit der Elektronen und Reaktions- und Anregungsmechanismen beeinflusst wird, wurde nicht weitergehend untersucht.

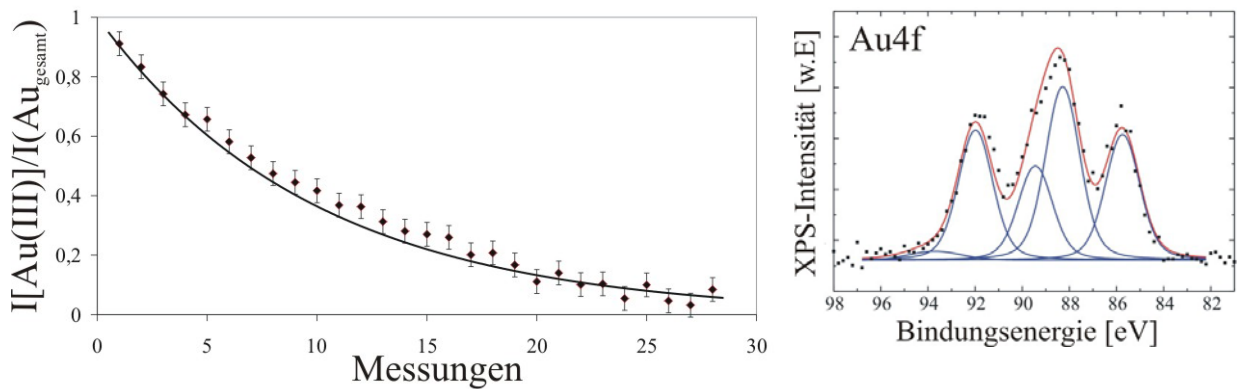


Abbildung 6-19: [links]: Au4f(III)-Signalabnahme in Abhängigkeit der XP-Messungen aller 28 Messungen aus Abbildung 6-18; [rechts]: Au4f-XP-Detaillspektrum der Messung Nr. 6 mit den angepassten Kurven.

## 6.4 Übertragung auf Goldnanostrukturen

Im Kapitel 6.1 wurden ausgehend von zwei unterschiedlichen Funktionalisierungsmethoden insgesamt 15 verschiedene PEG-Systeme diskutiert und ihre protein- und zellresistenten Eigenschaften untersucht. Im Hinblick auf eine Übertragung auf Goldnanostrukturen auf Glas wurden zusätzlich theoretische Abschätzungen über ihre Schichtdicken  $L$  nach de Gennes<sup>4</sup> bzw. über ihr Quellverhalten in wässrigen Lösungen durchgeführt. Die Auswahl der PEG-Systeme für diese Übertragung sollte folgende Anforderungen erfüllen:

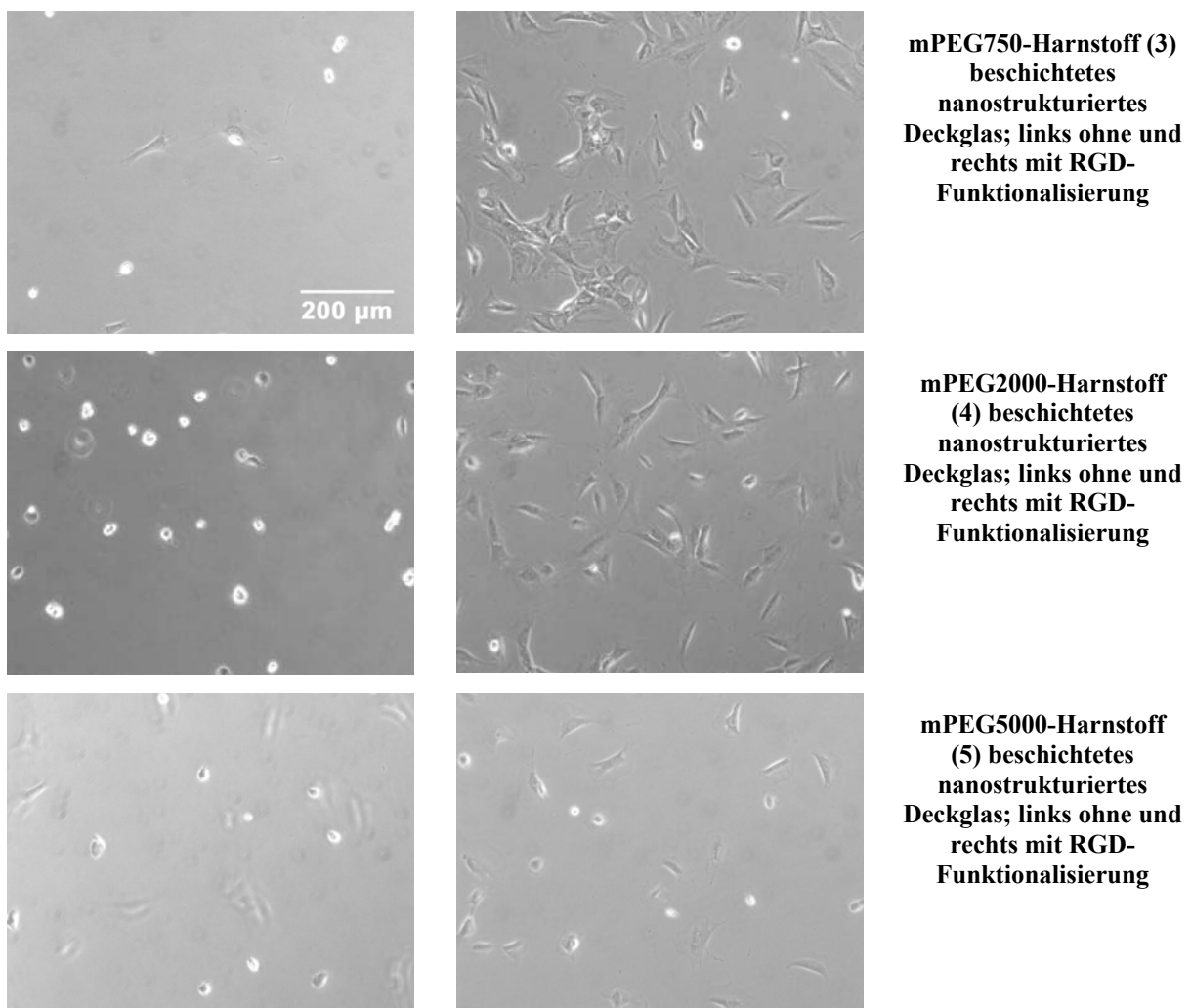
- gute protein- und zellresistente Eigenschaften
- Schichtdicken, die einer Funktionalisierung der Goldstrukturen ermöglicht
- leichte Handhabbarkeit bzw. Präparation

Alle drei Anforderungen wurden von den mPEG-Harnstoffen **(3)** und **(4)** erfüllt, jedoch wurde ebenfalls **(5)** als langkettiges Homolog in die folgenden Untersuchungen einbezogen. Im Hinblick auf die verwendeten Goldnanopunkte (5-7 nm) konnten so unter der Betrachtung von de Gennes<sup>4</sup> drei unterschiedliche Fälle verglichen werden:

1. aus der PEG-Matrix herausragende und dadurch relativ leicht zugängliche Goldpartikel mit mPEG750-Harnstoff **(3)** ( $L = 2.6$  nm; vgl. Kapitel 6.1.5 Tabelle 6-7 )
2. Goldnanodots und umgebenden mPEG2000-Harnstoff **(4)** in etwa gleicher Größenordnung ( $L = 5.0$  nm)
3. abgeschirmte Nanopartikel mit mPEG5000-Harnstoff **(5)** ( $L = 9.3$  nm)

### 6.4.1 Experimente mit Wild Type Ref52 Zellen

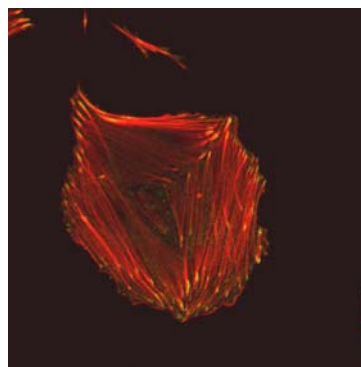
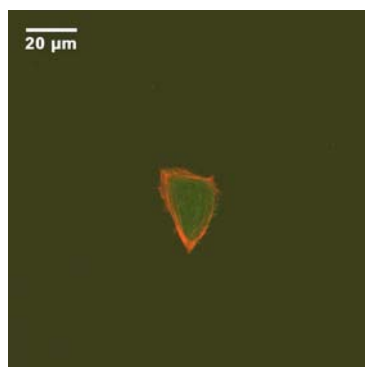
Ein Gebiet der Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Spatz sind Untersuchungen der Aktivierung der Integrinfunktion durch nanostrukturierte adhäsive Oberflächen.<sup>118,119</sup> Hierbei werden auf hexagonalen Goldstrukturen mit unterschiedlichen Goldpunktabständen auf Glasoberflächen eingebettet in einer PEG-Matrix Zelladhäsionsexperimente durchgeführt. Als Rezeptoren für Integrin dienen cyclische RGD-Derivate, welche über eine oder mehrere Thiolfunktionen an die Goldpartikel kovalent gebunden werden. In Anlehnung an diese Arbeiten sollte die Auswirkung der unterschiedlichen mPEG-Harnstoffderivate **(3)-(5)** auf konstanter Goldpartikeldichte qualitativ untersucht werden.



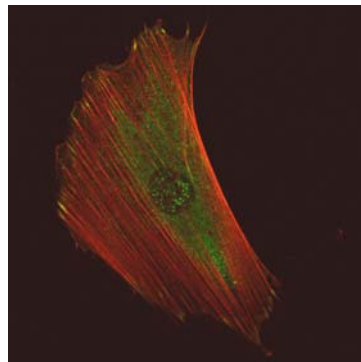
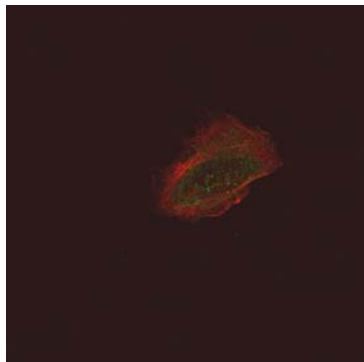
**Abbildung 6-20:** Mit unterschiedlichen mPEG-Harnstoffderivaten beschichtete nanostrukturierte Deckgläschen (Golddurchmesser:  $5 \pm 1$  nm; Goldpunktabstände:  $58 \pm 7$  nm);  $\sim 30$  Ref52WT-Zellen pro  $\text{mm}^2$  in DMEM mit 1 % FBS und 1 % L-Glutamin nach 24 h bei  $37^\circ\text{C}$ ; rechts mit vorangegangener RGD-Funktionalisierung. Die im Falle des mPEG5000-Harnstoffes (5) ohne RGD unscharf abgebildeten Zellen (linke Spalte, unterste Aufnahme) befinden sich unterhalb der Glasprobe.

Die für Zelladhäsionsexperiment verwendeten Glasproben wurden nur zur Hälfte mit einer Goldnanostruktur versehen, jedoch komplett mit den mPEG-Harnstoffen (3) – (5) beschichtet. Dieser unstrukturierte Bereich diente in allen Experimenten als Referenz.

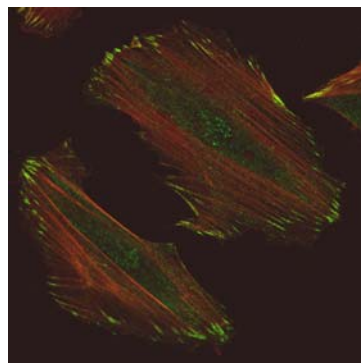
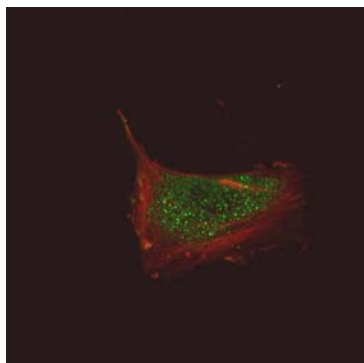
Abbildung 6-20 zeigt die erhöhte Zelladhäsion der Zellen nach einer RGD-Funktionalisierung, wobei die Zelldichte mit zunehmender Kettenlänge der mPEG-Harnstoffderivate (3) – (5) auf Grund der größeren Abschirmung der Goldpartikel abnimmt. Langzeitexperimente, bei denen die Zellen mehrere Tage auf den Proben inkubiert wurden, wiesen für die Referenzseite bei einer Beschichtung mit mPEG2000-Harnstoff (4) selbst nach einer Woche noch zellresistentes Verhalten auf.



**mPEG750-Harnstoff(3)  
beschichtetes nanostrukturiertes  
Deckglas; links ohne und rechts  
mit RGD-Funktionalisierung**



**mPEG2000-Harnstoff(4)  
beschichtetes nanostrukturiertes  
Deckglas; links ohne und rechts  
mit RGD-Funktionalisierung**



**mPEG5000-Harnstoff (5)  
beschichtetes nanostrukturiertes  
Deckglas; links ohne und rechts  
mit RGD-Funktionalisierung**

**Abbildung 6-21: Mit unterschiedlichen mPEG-Harnstoffderivaten beschichtete nanostrukturierte Deckgläschen (Golddurchmesser:  $5 \pm 1$  nm; Goldpunktabstände:  $58 \pm 7$  nm); 10000 Ref52WT-Zellen pro Probe in DMEM mit 1 % FBS und 1% L-Glutamin nach 24 h bei 37°C; rechts mit vorangegangener RGD-Funktionalisierung**

Zur Visualisierung der fokalen Kontakte wurden die Proben fixiert und Aktin und Vinculin immunohistochemisch angefärbt. In Abbildung 6-21 erkennt man bei den RGD-funktionalisierten Proben in rot die so genannten Stressfasern (Aktin), die an ihren Enden in fokalen Kontakten (grün) zusammenlaufen. Signifikant ist der Größenunterschied zwischen Zellen auf funktionalisierten und unfunktionalisierten Oberflächen.<sup>118</sup>

## 6.4.2 Motility Assays mit Eg5 und Mikrotubuli auf Goldnanostrukturen

### 6.4.2.1 Mikrotubuli binden an Eg5-funktionalisierte Goldstruktur

Das verwendete Motorprotein Eg5 zeigte die Fähigkeit an die Goldcluster der Nanostruktur direkt zu binden. Insgesamt wies jedoch das System eine starke Abhängigkeit von der Qualität der proteinresistenten PEG-Matrix auf. Abbildung 6-22 zeigt die mangelnde Reproduzierbarkeit der Mikrotubulianbindung auf mit mPEG750-Harnstoff (**3**) passivierten und mit Goldpunkten strukturierten Glasproben. Obwohl zahlreiche Experimente eine zufrieden stellende Anbindung zeigten (links: Anbindung nur auf dem mit Gold strukturierten Teil der Probe), kam es in mehr als zu vernachlässigbarem Rahmen zu einer vollständigen Belegung der Oberfläche mit Mikrotubuli (mitte) und in einigen Fällen sogar zu inversem Verhalten (rechts: Anbindung auf der unstrukturierten Seite).

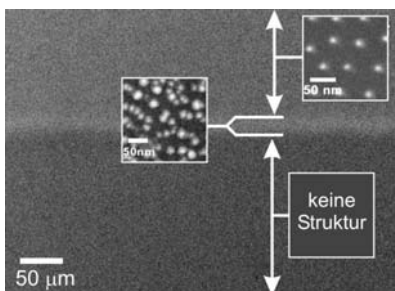
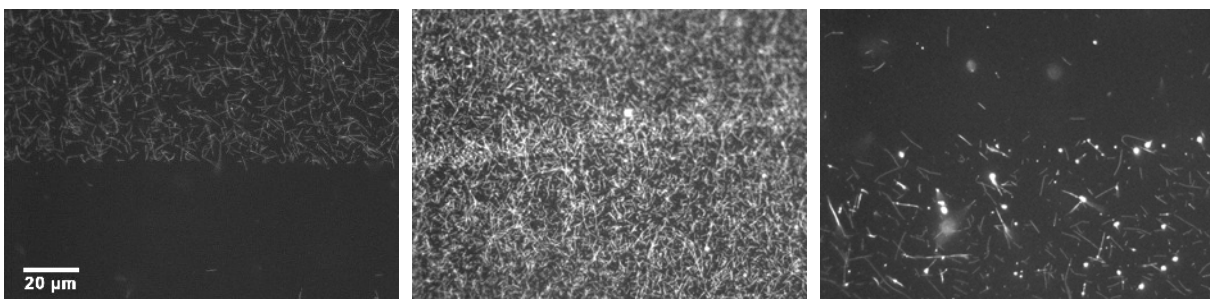
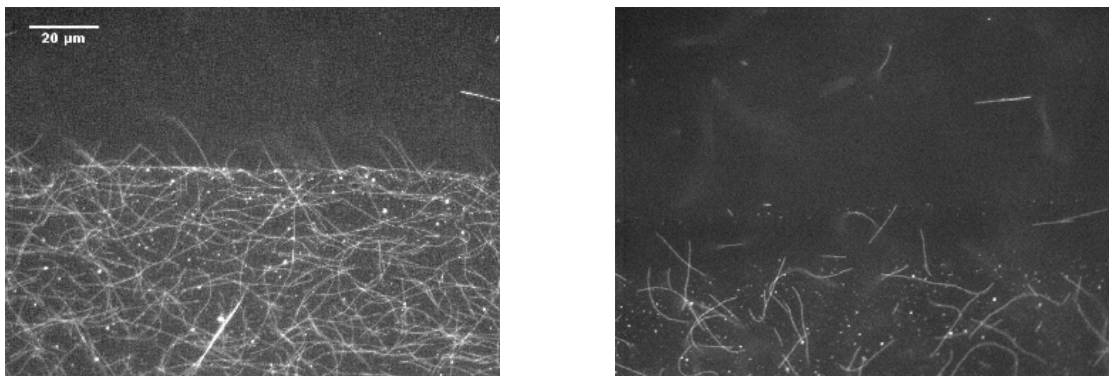


Abbildung 6-22: [links] typischer Aufbau der verwendeten mit Goldnanopunkten und mPEG-Harnstoff passivierten Glasproben: großer Bereich mit Goldnanopartikeln in quasi hexagonalen Anordnung (oben), schmaler Übergang aus ungeordneten und polydispersen Goldpunkten (mitte), unstrukturierter Bereich (unten); [untere Reihe]: Mikrotubuli (TAMRA) via Eg5 auf mit mPEG750-Harnstoff (**3**) passivierten und mit Goldpunkten strukturierten Glasproben (Golddurchmesser:  $5 \pm 1$  nm; Goldpunkt-abstände:  $58 \pm 7$  nm).



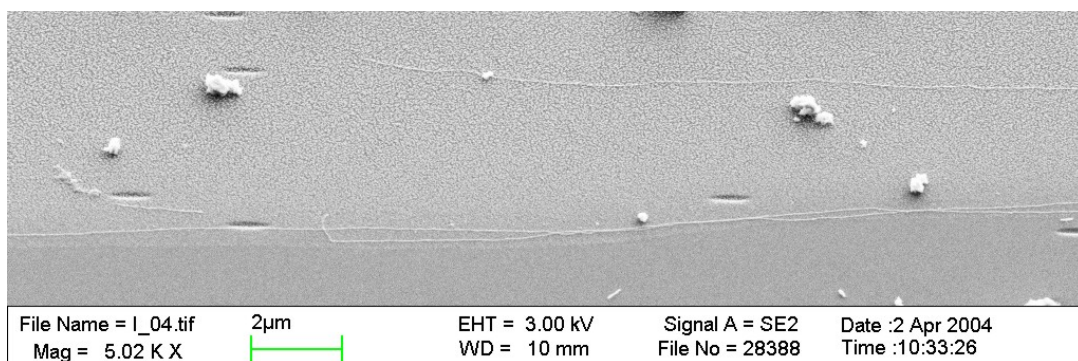
Durch Erhöhung der Kettenlänge der PEG-Polymere ließen sich reproduzierbare Ergebnisse erzielen. Abbildung 6-23 zeigt zwei unterschiedlich passivierte Proben [links: mPEG2000-Harnstoff (**4**), rechts: mPEG5000-Harnstoff (**5**)] bei konstanter Goldpunktstruktur; die

Anbindungsexperimente wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die geringere Mikrotubulidichte lässt sich durch die höhere Schichtdicke des mPEG5000-Harnstoffs (5) und der damit verbundenen stärkeren Abschirmung der Nanostruktur erklären (vgl. Kapitel 6.1.5). Deutlich erkennt man bei der mit mPEG2000-Harnstoff (4) beschichteten Goldstruktur, dass Mikrotubuli, die über die Dipkante hinausragen, in diesem unstrukturierten Bereich nicht gebunden sind und sich im Puffer durch den Flüssigkeitsfluss frei bewegen und daher unscharf abgebildet werden.



**Abbildung 6-23:** fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Mikrotubuli (TAMRA) über Eg5 auf Goldnanostrukturen; [links]: mit mPEG2000-Harnstoff (4) passivierte mit Goldpunkten strukturierte Glasprobe; [rechts]: analoge Probe mit mPEG5000-Harnstoff (5) passiviert (Golddurchmesser:  $5 \pm 1$  nm; Goldpunktabstände:  $58 \pm 7$  nm);

Zur Überprüfung der Anbindung der Mikrotubuli auf der Goldstruktur wurde eine Probe nach erfolgreichem Anbindungsexperiment (vgl. Abbildung 6-23) mit 2 %-iger Glutaraldehydlösung in PBS 14h fixiert, anschließend mit Ethanol entwässert (sukzessiver Anstieg der Ethanolkonzentration), mit überkritischem Kohlendioxid getrocknet, mit einem dünnen Graphitfilm bedampft ( $\sim 5$  nm) und im Rasterelektronenmikroskop untersucht.

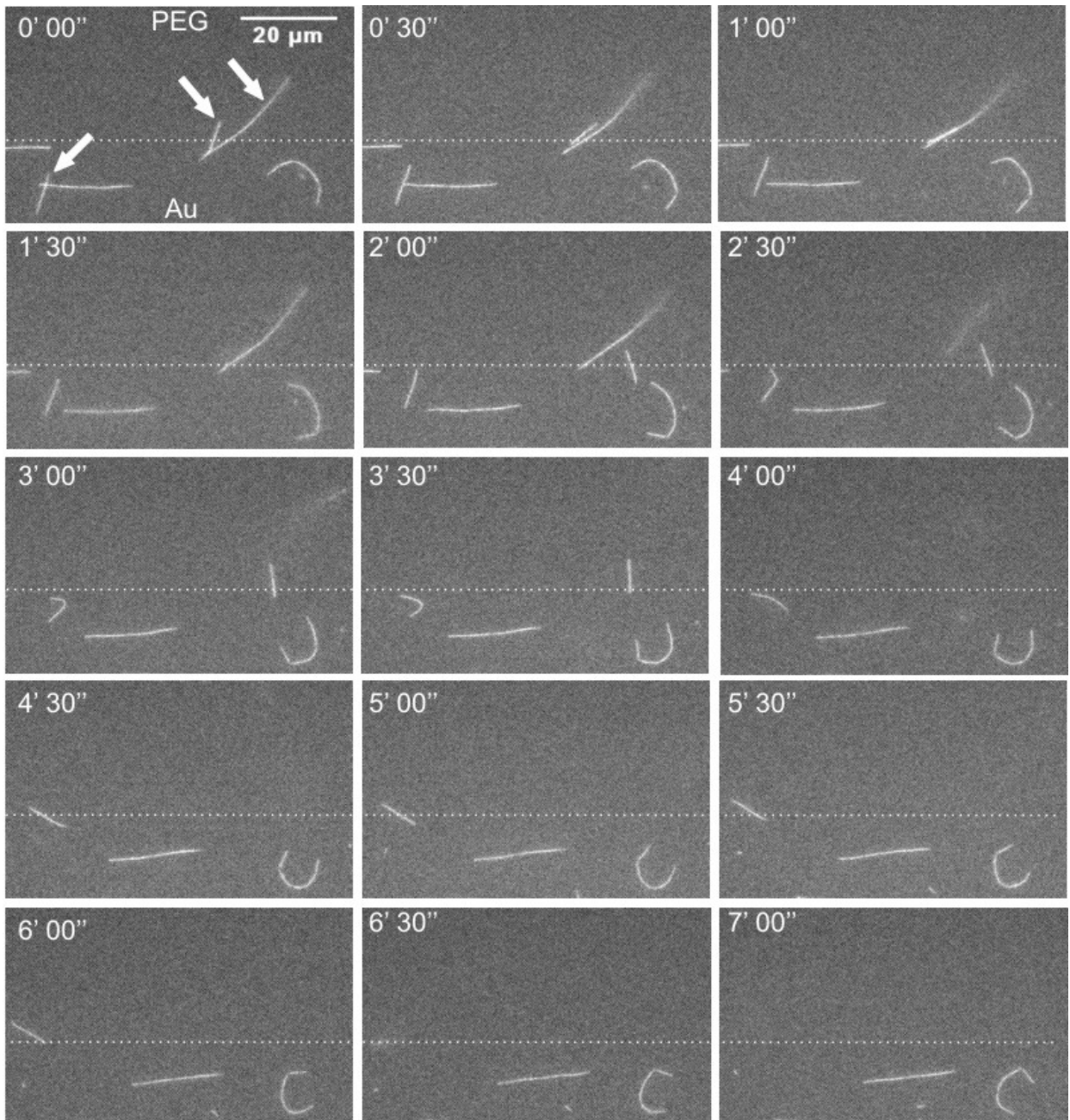


**Abbildung 6-24:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer zur Hälfte mit Goldpunkten strukturierten und mit mPEG2000-Harnstoff (4) passivierten Glasprobe nach Anbindung von Eg5-Motor und Mikrotubuli (Golddurchmesser:  $5 \pm 1$  nm; Goldpunktabstände:  $58 \pm 7$  nm)

In Abbildung 6-24 erkennt man die Dipekte des strukturierten Bereiches (oben) und angebundene Mikrotubuli, die sich entlang dieser Grenze orientiert haben.

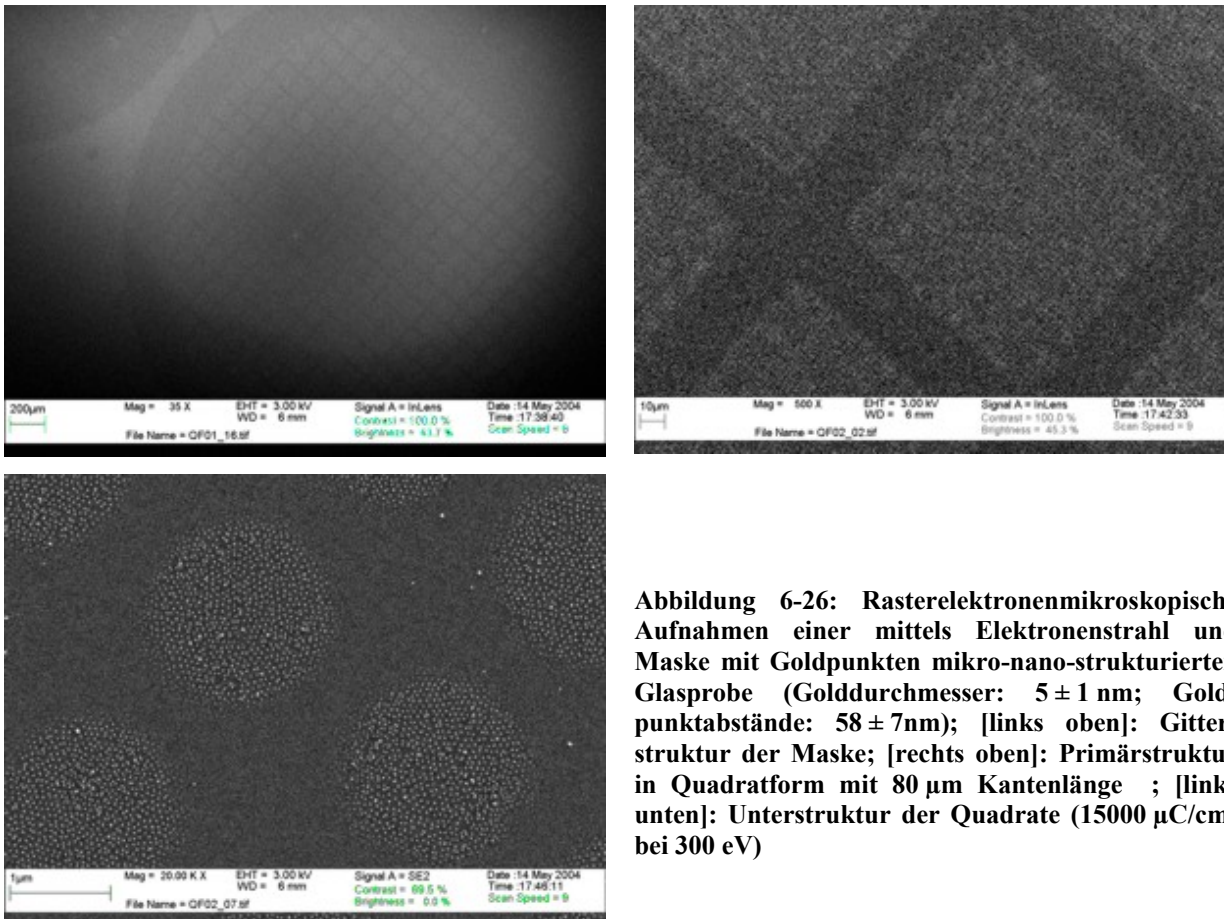
Experimente mit dem Motorprotein Eg5 auf gereinigten Glasoberflächen haben gezeigt, dass die Aktivität des Motors in Bezug auf die Transportfähigkeit der Mikrotubuli stark von der Versuchsanordnung abhängt. Reproduzierbare Resultate ließen sich nur dann erzielen, wenn Eg5 von Anfang an in Gegenwart von ATP an die Oberfläche gebunden wurde. In allen darauf folgenden Schritten (waschen und Mikrotubulianbindung) musste ebenfalls in Anwesenheit von ATP gearbeitet werden um eine Bewegung der Mikrotubuli auf Grund der Motoraktivität zu beobachten. Versuche, den Motor erst im letzten Schritt durch Zusatz von ATP zu starten, schlugen in den meisten Fällen fehl. Untersuchungen der Mikrotubulibewegung im Grenzbereich zwischen dem mit Goldpunkten strukturierten und dem unstrukturierten Bereich der Glasproben zeigten erwartetes Verhalten. Mikrotubuli, die sich über den strukturierten Bereich hinausbewegten, lösten sich bei vollständigem Verlassen der Goldpunkte von der Oberfläche ab und gingen auf Grund der Diffusion in Lösung. In Abbildung 6-25 erkennt man dies anhand von drei Mikrotubuli, die sich nach überschreiten der Dipekte (gepunktete Linie) ablösen. Anhand des längsten dieser drei wird die Affinität zum Motorprotein auf der Goldstruktur am deutlichsten: Der Teil, der die Strukturgrenze bereits überschritten hat, bewegt sich ungebunden in Lösung und erscheint auf Grund seiner Diffusion unscharf während der Rest, welcher noch an das Eg5 gebunden ist und von diesem weiter in Richtung Goldpunktgrenze transportiert wird, weiterhin im Fokus bleibt bis sich der ganze Mikrotubulus ablöst (Zeitintervall 0 bis 2' 30'').





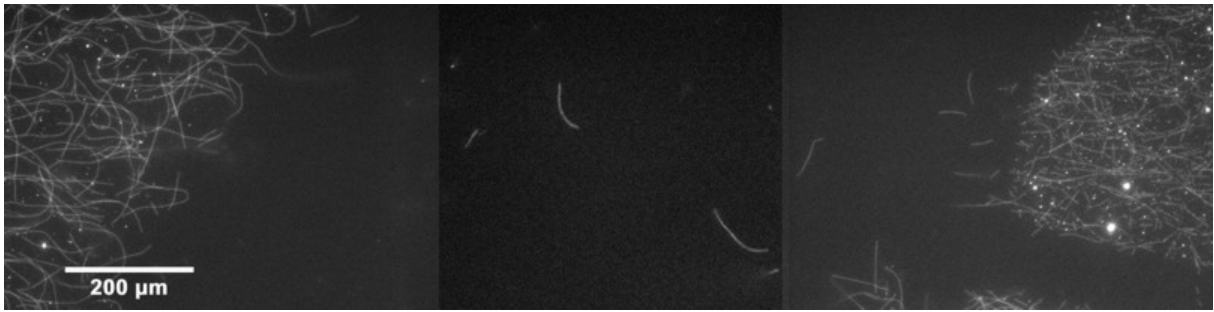
**Abbildung 6-25:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Mikrotubuli (TAMRA) an der Grenze zwischen mit dem mit Goldpunkten strukturierten und unstrukturierten Bereich der Glasprobe passiviert mit mPEG2000-Harnstoff (4) nach Anbindung des Motorproteins Eg5 in Gegenwart von ATP (Golddurchmesser:  $5 \pm 1$  nm; Goldpunktabstände:  $58 \pm 7$  nm). Mikrotubuli, welche die Grenze aus Richtung der Struktur verlassen, lösen sich wegen des fehlenden Eg5 von der Oberfläche ab.

Mittels Proben, deren Goldnanocluster durch Elektronenstrahlolithographie mit einer Überstruktur im Mikrometerbereich versehen wurden (siehe auch Kapitel 5.10.3), konnte untersucht werden, wie sich die an Eg5 angebondenen Mikrotubuli auf einer solchen Oberfläche verhalten.



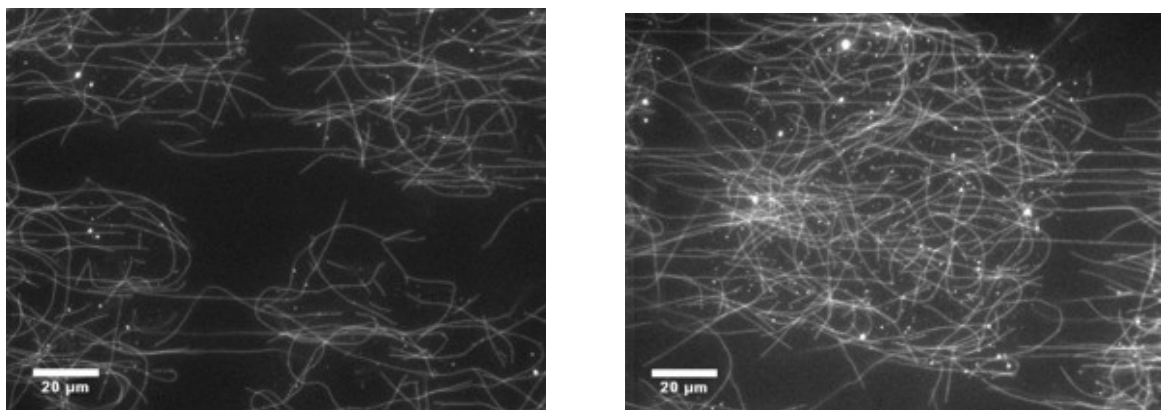
**Abbildung 6-26:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer mittels Elektronenstrahl und Maske mit Goldpunkten mikro-nano-strukturierten Glasprobe (Golddurchmesser:  $5 \pm 1$  nm; Goldpunktabstände:  $58 \pm 7$  nm); [links oben]: Gitterstruktur der Maske; [rechts oben]: Primärstruktur in Quadratform mit  $80 \mu\text{m}$  Kantenlänge ; [links unten]: Unterstruktur der Quadrate ( $15000 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  bei 300 eV)

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der verwendeten Mikro-nano-Strukturen sind in Abbildung 6-26 dargestellt. Man erkennt deutlich die Form der verwendeten Maske, die als Primärstruktur ein Muster aus Quadraten mit  $80 \mu\text{m}$  Kantenlänge aufweist, welche aus etwa  $1.5 \mu\text{m}$  großen Kreisen aus Goldnanopartikeln aufgebaut sind.



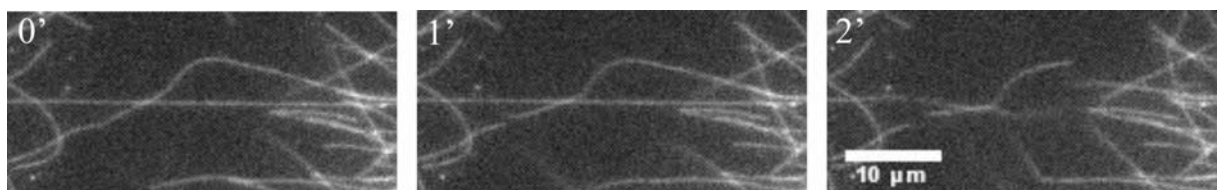
**Abbildung 6-27** (aus drei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zusammengesetzt): Randbereich der mittels Elektronenstrahl und Maske erzeugten Überstruktur; links: Mikrotubuli (TAMRA) auf Goldstruktur außerhalb der Maske; mitte: Rand der Maske; rechts: Beginn der Primärstruktur;

Die erfolgreiche Anbindung der Mikrotubuli über Eg5 auf diese Mikro-nano-Strukturen wird in Abbildung 6-27 dargestellt. Anhand der angebondenen Mikrotubuli wird die quadratische Primärstruktur deutlich (Abbildung 6-28).



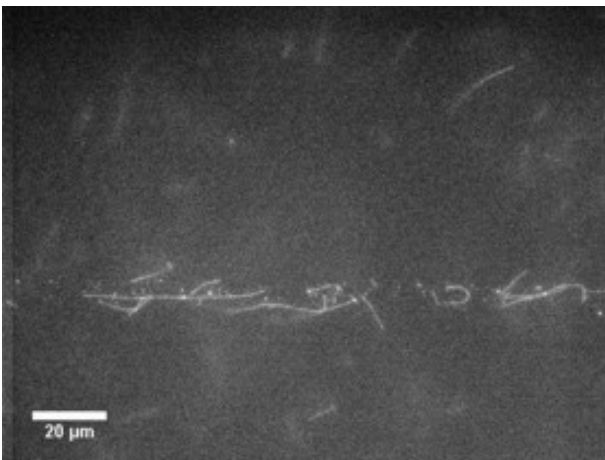
**Abbildung 6-28:** fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der auf die Mikro-nano-Struktur angebondenen Mikrotubuli (TAMRA); Gitter (links) bzw. Quadrate (rechts) der Primärstruktur

Abbildung 6-29 zeigt eine Bildfolge von über zwei Goldpunktquadrate gespannten Mikrotubuli, die auf Grund entstandenen Photoschadens fragmentieren; Bruchstücke, die keinen Kontakt zur Goldstruktur haben, diffundieren in Lösung, während die Enden innerhalb der Struktur gebunden bleiben.



**Abbildung 6-29:** Zerfall der Mikrotubuli (TAMRA) zwischen den Goldstrukturen auf Grund des Photoschadens

Als Negativexperiment wurde durch Behandlung der mit mPEG2000-Harnstoff (4) passivierten und mit Goldpunkten strukturierten Glasproben mit PEG3000-Thiol-Lösung [HS-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>66</sub>H] die Anbindung des Motors auf die Oberfläche gehemmt. Abbildung 6-30 zeigt eine solche Glasprobe, welche zusätzlich mit einer 1 μM PEG3000-Thiol-Lösung (Lösungsmittel DMF) über 26 h in einer Schutzgasatmosphäre bei RT inkubiert wurde. Die Anbindung des Eg5 und schließlich der Mikrotubuli gelang ausschließlich direkt auf der Dipekante, auf der sowohl die Golddottdichte als auch die Partikelgröße höher und die Struktur ungeordneter ist (vgl. Abbildung 6-22 links).



**Abbildung 6-30:** Eine mit mPEG2000-Harnstoff (4) passivierte mit Goldpunkten strukturierte Glasprobe, die zusätzlich über 26 h unter Schutzgas in einer 1 μM PEG3000-Thiol-Lösung (LM: DMF) inkubiert wurde. Die Anbindung der Mikrotubuli (TAMRA) über das Motorprotein Eg5 zeigt sich nur an der Dipekante (Golddurchmesser:  $5 \pm 1$  nm; Goldpunktabstände:  $58 \pm 7$  nm)

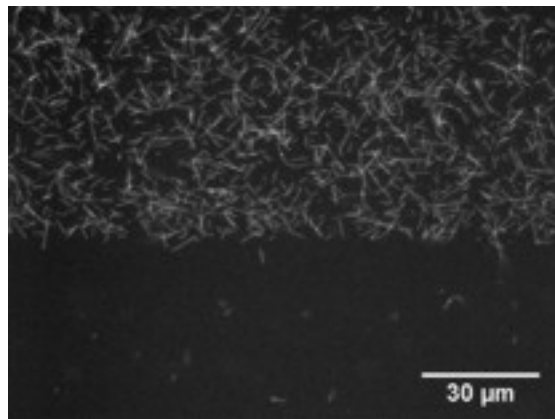
Ebenso konnte gezeigt werden, dass Mikrotubuli unter den Versuchsbedingungen nicht auf unfunktionalisierte Goldpartikel physisorbierten.

Die in diesem Kapitel dargelegten Ergebnisse zeigen deutlich den Zusammenhang zwischen Goldnanostruktur (umgeben von einer proteinresistenten Schicht) und ihrer Funktionalisierung mit dem Motorprotein Eg5, welche durch Anbindung fluoreszenzmarkierter Mikrotubuli sichtbar wird. Diese Anbindung gelingt nur auf mit Goldnanopartikeln strukturierten Bereichen und wird fast vollständig unterdrückt, wenn die Goldpartikel blockiert werden.

#### 6.4.2.2 Anforderungen an die Versuchsanordnung

Chemische (über Aktivester) und affine (mittels Antikörper) Funktionalisierungen der Goldpunkte mit Eg5 als Alternative zur direkten Anbindung zeigten keine befriedigenden Resultate. Zwar ließen sich dimere Eg5sh-Fragmente (Abbildung 6-31) mit His-Tag über anti-PentaHis-Antikörper auf die Goldstrukturen anbinden, vergleichbare Resultate waren mit dem homotetrameren Eg5 aber nicht möglich. Zur Anbindung des Eg5sh-Fragments wurden die

Goldnanostrukturen zunächst mit 11-Mercaptoundecansäure (MUS) funktionalisiert (200  $\mu\text{M}$  in Ethanol; 16 h bei RT), welche anschließend mit NHS/EDC<sup>13</sup> zum N-Succinimidylester umgesetzt und sofort mit einem anti-PentaHis-Antikörper (12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS; 105 min bei 4°C) zur Reaktion gebracht wurde. Die Anbindung des Eg5sh-Fragments (0.2 mg/ml in PBS; 20 min auf Eis) ermöglichte die Fixierung von Mikrotubuli auf der Goldnanostruktur (Abbildung 6-31). Direkte Funktionalisierung der Goldpunkte mit dem Eg5sh-Fragment ließ sich nicht bewerkstelligen, die direkte Bindung des Antikörpers ohne aktivierte MUS erforderte Inkubationen von etwa 24 h bei den oben genannten Bedingungen.

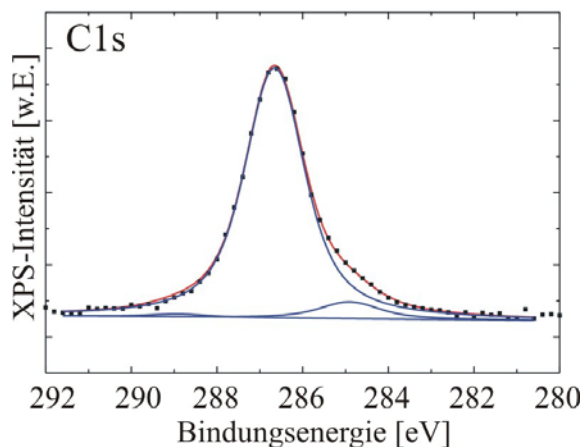


**Abbildung 6-31:** fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Mikrotubuli (TAMRA) an der Grenze der Goldnanostruktur (Golddurchmesser:  $5 \pm 1 \text{ nm}$ ; Goldpunktabstände:  $58 \pm 7 \text{ nm}$ ) passiviert mit mPEG750-Harnstoff (3). Die Goldpartikel wurden zunächst mit 11-Mercaptoundecansäure funktionalisiert, anschließend mit NHS/EDC aktiviert und schließlich mit anti-PentaHis-Antikörper umgesetzt.

Dieser Ansatz zur Anbindung von Eg5 zeigte bereits Komplikationen nach der Funktionalisierung der Goldpartikel mit MUS. Einzige Konzentrationen bis etwa 50  $\mu\text{M}$  MUS in Ethanol oder Triethylglykoldimethylether zeigten unter den oben genannten Bedingungen spezifische Anbindung nur auf dem strukturierten Bereich der Probe, wobei keine höheren Mikrotubulidichten erzeugt werden konnten als bei direkter Adsorption des Motorproteins auf den Goldpartikeln; somit ist eine höhere Eg5-Konzentration auf der Goldstruktur unwahrscheinlich. Variation der Lösungsmittel (Diethylether, Toluol, Diglyme) zur Funktionalisierung der Goldnanopartikel mit MUS bewirkte unspezifische Adsorption von Eg5 und Mikrotubuli. Unter der Annahme, dass sich MUS in den mPEG2000-Harnstofffilm einlagert, wurden Konkurrenten angeboten, die bevorzugt eingelagert werden sollten (mPEG350, Triethylglykoldimethylether), jedoch wurde nicht der gewünschte Effekt erzielt.

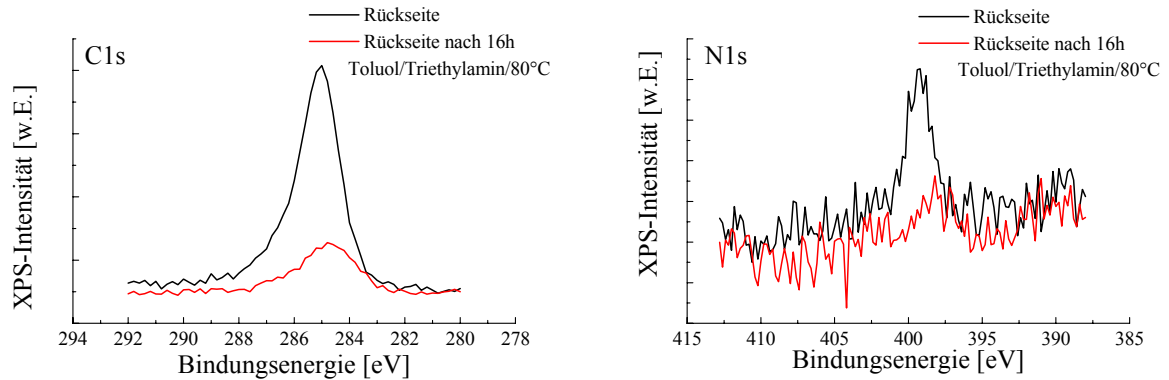
Wie bereits in Kapitel 6.4.2.1 erläutert zeigten sich die besten Resultate unter Verwendung des mPEG2000-Harnstoffes (4) als proteinresistente Matrix. Experimente mit

Goldpunktstrukturen, die mittels des Polymers PS(1780)-*b*-P2VP(525) generiert wurden, wiesen jedoch zunächst unzureichende Proteinresistenz bezüglich des Eg5-Motors auf. Diese äußerte sich durch eine unverhältnismäßig hohe Belegungsichte an Mikrotubuli auf den Goldstrukturen wie auch unspezifische Anbindung auf den unstrukturierten Bereichen. Bei Experimenten in Gegenwart von ATP zeigte sich Mikrotubulitransport auf der gesamten Probe. XPS-Untersuchungen der mittels PS(1780)-*b*-P2VP(525) strukturierten und mit mPEG2000-Harnstoff (**4**) passivierten Glasproben wiesen eine Störung der PEG-Matrix auf. Abbildung 6-32 verdeutlicht diese Defekte in Form eines Überschusses an aliphatischem Kohlenstoff ( $284.8 \pm 0.2$  eV). Die Signalverhältnisse wurden mit 5.67 : 85.07 : 1 ermittelt; im Vergleich mit Tabelle 6-4 zeigt sich ein etwa 200 %-iger Überschuss an aliphatischem Kohlenstoff.



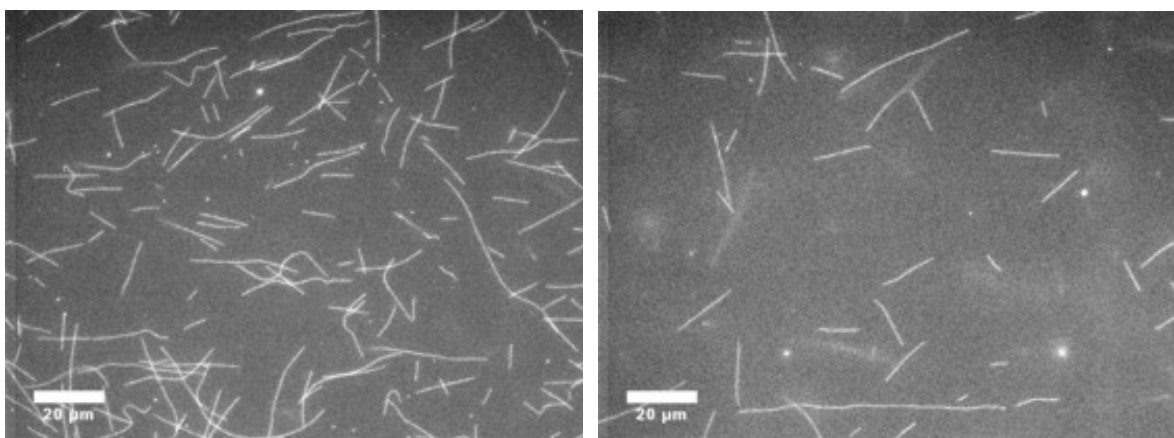
**Abbildung 6-32:** C1s-Detailspektrum einer mittels PS(1780)-*b*-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0,5</sub>(525) strukturierten und mit mPEG2000-Harnstoff (**4**) passivierten Glasprobe; Spektrum enthält die an das XP-Messsignal angepassten Kurven.

Unter der Annahme, dass auf Grund des flachen Aufliegens der Proben während der Plasmabehandlung auf deren Rückseiten Reste des PS(1780)-*b*-P2VP(525) zurückbleiben, welche sich bei der Passivierung mit mPEG2000-Harnstoff (**4**) ablösen und in den PEG-Film einlagern, wurden diesbezüglich XPS-Untersuchungen durchgeführt. Zum einen wurden besagte Probenrückseiten direkt nach dem Plasmaprozess vermessen, zum anderen wurden sie zunächst mit Toluol/Triethylamin bei 80°C unter Schutzgas behandelt, wobei kein PEG angeboten wurde. Aus Abbildung 6-33 erkennt man deutlich Polymerreste auf der Glasoberfläche, die sich nach Erhitzen im Lösungsmittel/Katalysator-Gemisch extrem verringern. Mit Hilfe spezieller Halter, welche ein beidseitiges Abbrennen der Proben im Plasma gewährleisten, konnten die Polymerkontamination der PEG-Filme beseitigt und somit reproduzierbare Messungen erzielt werden.



**Abbildung 6-33: C1s- und N1s-XP-Detailspektren der Probenrückseiten {[PS(1780)-b-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0,5</sub>(525)]-Mizellen auf Glas nach 30 min Wasserstoffplasma} direkt bzw. nach 16 h Toluol/Triethylamin bei 80°C**

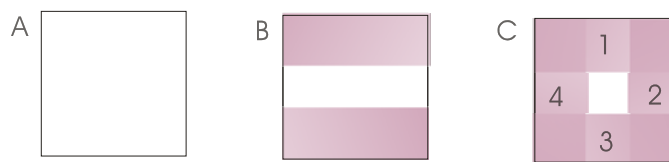
Ebenso empfindlich erwiesen sich die mit Goldpunkten strukturierten und mit mPEG2000-Harnstoff (**4**) beschichteten Glasproben bezogen auf die Bedingungen der Eg5-Anbindung. Spezifische Goldpunktfunktionalisierung gelang nur in PBS Puffer, Versuche in BRB80 hingegen zeigten unspezifische Anbindung der Mikrotubuli und deren Transport durch das Motorprotein. In Abbildung 6-34 erkennt man zwar einen deutlichen Dichteunterschied an oberflächlich gebundenen Mikrotubuli (links auf Struktur, rechts unstrukturiert), welcher jedoch auf Grund der hohen Unspezifität experimentell ungeeignet ist. Es wird im PBS-Fall auf Grund der höheren Salzkonzentration eine kompaktere PEG-Schicht vermutet, die auf Grund geringeren Quellverhaltens einen dichteren, Eg5-resistenten Film ausbildet.<sup>5</sup> Möglicherweise bildet Eg5 in salzärmeren BRB80 Aggregate, welche eine höhere Affinität zu den verwendeten Oberflächen haben könnten.



**Abbildung 6-34: links: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Mikrotubuli (TAMRA) auf mit Goldpunkten strukturierten und mit mPEG2000-Harnstoff (**4**) beschichtetem Glas [PS(500)-b-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0,5</sub>(270)] [5 mg/ml]; rechts: unstrukturierter Bereich der Probe**

### 6.4.2.3 Einfluss der Goldpunktdichte auf die Mikrotubulianbindung

Um die Anbindung auf unterschiedliche Goldstrukturen miteinander vergleichen zu können wurde ein etwas modifiziertes Strukturierungsverfahren angewandt. Gereinigte Glasproben wurden zunächst von zwei gegenüberliegenden Seiten etwa 1/3 in zwei unterschiedliche Mizellösungen eingetaucht, anschließend 5 min bei 0.4 mbar und 150 W im Wasserstoffplasma fixiert, erneut mit zwei unterschiedlichen Mizellösungen von gegenüberliegenden Seiten zu etwa 1/3 beschichtet, 30 min bei oben genannten Bedingungen im Wasserstoffplasma abgebrannt und schließlich mit mPEG2000-Harnstoff (4) passiviert. Auf diese Weise ließen sich Glasproben mit 4 unterschiedlichen Golddichten herstellen (vgl. Abbildung 6-35).

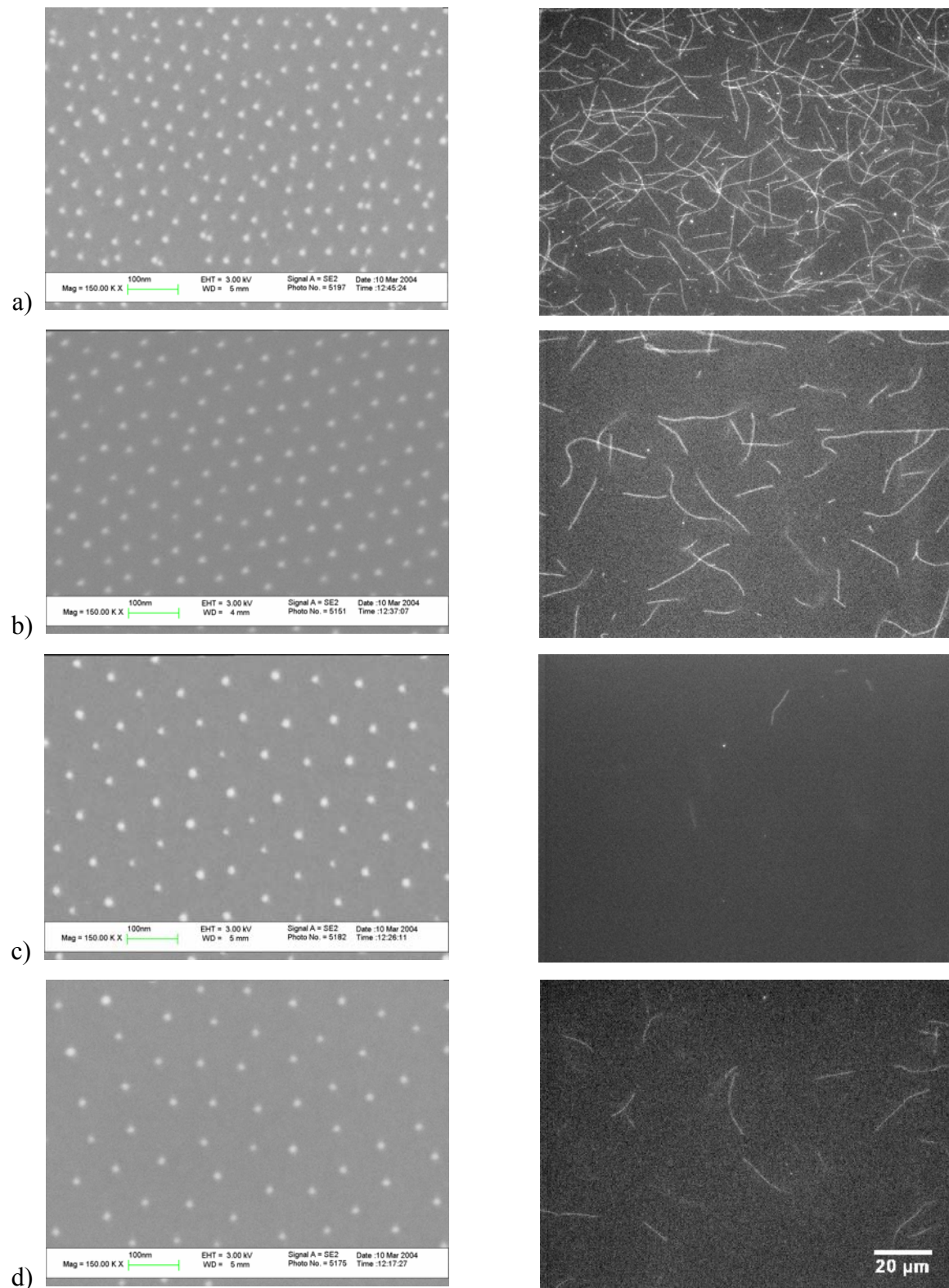


**Abbildung 6-35:** [A]: gereinigte Glasprobe; [B]: mit zwei Mizellösungen behandelte, im H<sub>2</sub>-Plasma fixierte Glasprobe; [C]: mit vier verschiedenen Goldstrukturen versehene Probe

Abbildung 6-36 zeigt rasterelektronenmikroskopische (REM; links) und fluoreszenzmikroskopische (rechts; nach Inkubation mit Eg5 und Mikrotubuli) Aufnahmen einer mit vier unterschiedlichen Goldstrukturen versehene Glasprobe.

Man erkennt in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eine Abnahme der Goldpunktdichte von a) nach d), wobei die Ordnung in a) signifikant von den anderen abweicht [Partikeldichte: (a)  $\sim 500/\mu\text{m}^2$ , (b)  $\sim 370/\mu\text{m}^2$ , (c)  $\sim 160/\mu\text{m}^2$ , (d)  $\sim 130/\mu\text{m}^2$ ]. Auffällig ist ebenso die Inhomogenität der Goldpunktdurchmesser bei c). Die Mikrotubulidichte verhält sich bis auf c) konsistent mit der Goldpunktdichte. Das abweichende Verhalten von c) könnte mit der großen Variabilität der Partikeldurchmesser zusammenhängen. Unter der Annahme, dass eine Mindestpartikelgröße für die Anbindung des Motorproteins Eg5 nötig ist, liegt die effektive Partikelkonzentration von (c) wahrscheinlich unterhalb der von (d).

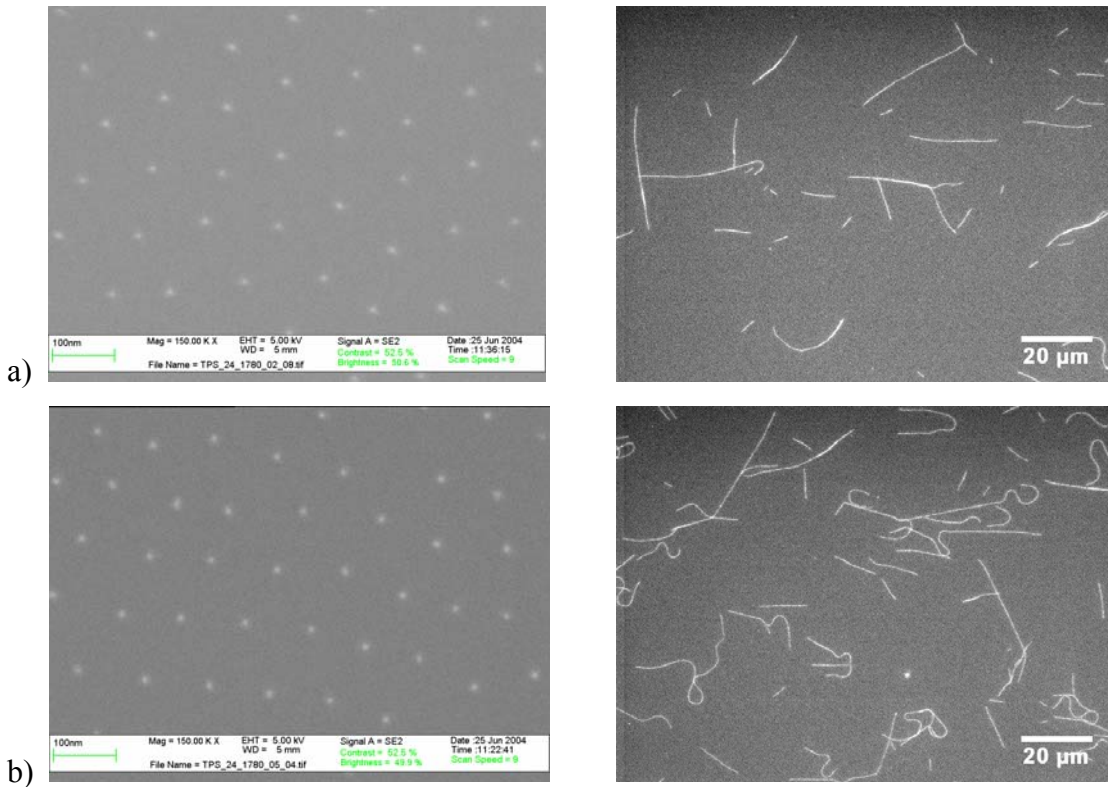




**Abbildung 6-36:** Anbindung von Mikrotubuli (TAMRA) über Eg5 auf einer mit 4 unterschiedlichen Goldstrukturen versehenen und mit mPEG2000-Harnstoff (4) passivierten Glasprobe; a) PS(245)-b-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0.5</sub>(225) [5 mg/ml]; b) PS(500)-b-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0.5</sub>(270) [5 mg/ml]; c) PS(990)-b-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0.5</sub>(385) [5 mg/ml]; d) PS(1780)-b-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0.2</sub>(525) [3 mg/ml].

Durch Erzeugung zweier Goldstrukturen mit annähernd gleicher Goldpartikeldichte jedoch unterschiedlicher Goldpunktgröße wird zum einen die Vermutung der Mindestpartikel

unterstützt, jedoch gleichzeitig eine weitere Schwierigkeit dieser Experimente verdeutlicht. Abbildung 6-37 zeigt REM-Aufnahmen solcher Strukturen [ $\approx 95/\mu\text{m}^2$ ;  $7 \pm 1 \text{ nm}$  (a) bzw.  $10 \pm 1 \text{ nm}$  (b)] und die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach Funktionalisierung mit Eg5 mit anschließender Mikrotubulianbindung.



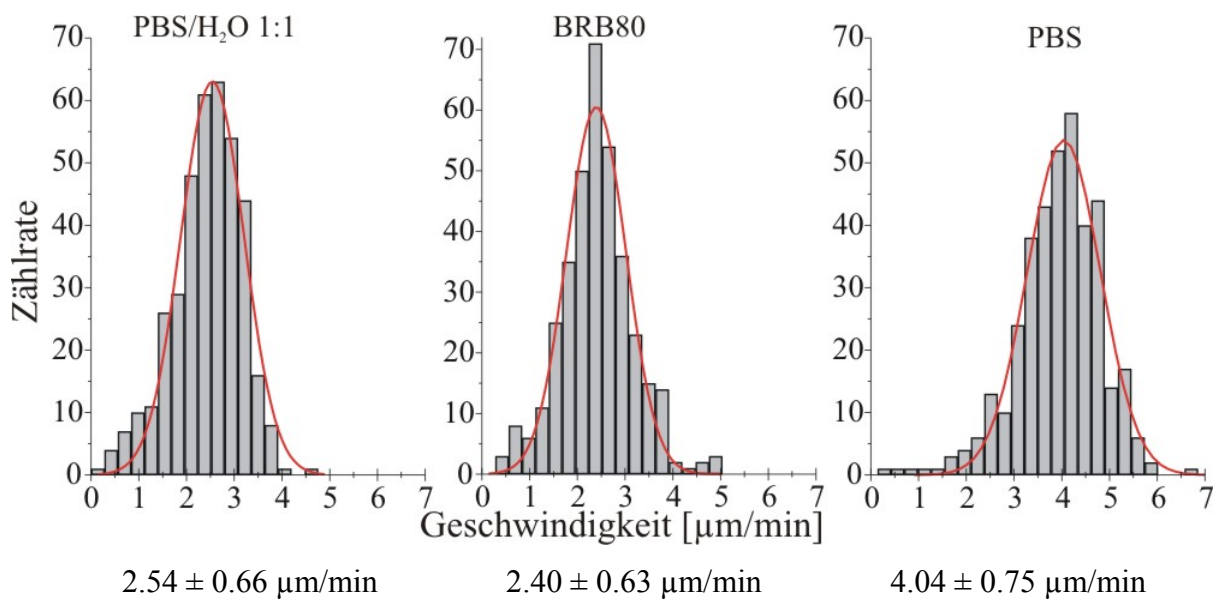
**Abbildung 6-37: Anbindung von Mikrotubuli (TAMRA) über Eg5 auf einer mit 2 unterschiedlichen Goldstrukturen versehenen und mit mPEG2000-Harnstoff (4) passivierten Glasprobe; a) PS(1780)-*b*-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0,2</sub>(525) [2 mg/ml;  $7 \pm 1 \text{ nm}$ ]; b) PS(1780)-*b*-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0,5</sub>(525) [2 mg/ml;  $10 \pm 1 \text{ nm}$ ].**

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Mikrotubulidichte bei größeren Goldpunkten (b) gegenüber der kleineren Nanopartikel (a) erhöht ist. Hiermit zeigt sich, dass neben der Partikeldichte die Funktionalisierungskinetik unter den untersuchten Bedingungen (Temperatur, Konzentration von Eg5, Puffer) einen Einfluss auf die Motordichte auf der Oberfläche hat. Da beide angewendete Goldstrukturen annähernd die gleiche Partikeldichte aufweisen, sollte bei einer vollständigen Funktionalisierung (ein Motor pro Goldpunkt) kein Unterschied in der Belegungsichte zu erkennen sein, zumal beide Strukturen auf der gleichen Probe generiert und somit unter den gleichen Bedingungen funktionalisiert wurden. Für das beobachtete Verhalten sind zwei Gründe denkbar, zum einen eine höhere Motorbedeckung der größeren Goldpunkte auf Grund kinetisch begünstigter Funktionalisierung, zum anderen wäre auch eine mehrfache Belegung der größeren Partikel denkbar. Bei einer Teilchengröße von  $10 \pm 1 \text{ nm}$  und der sphärischen Form ist es durchaus möglich, dass zwei Eg5-

Motorproteine über je eine ihrer vier Motordomänen (je etwa 4.5 nm im Durchmesser)<sup>89</sup> an einen Goldpunkt binden. Dadurch würde ebenfalls die Motorkonzentration auf der Oberfläche und damit die Mikrotubulidichte erhöht werden. Um letzteren Effekt zu minimieren wurden alle Geschwindigkeitsmessungen mit Eg5 (Kapitel 6.4.2.4 und 6.4.2.5) auf Goldpunkten der Größen 5-7 nm durchgeführt.

#### 6.4.2.4 Einfluss der Salzkonzentration auf die Mikrotubuligeschwindigkeit

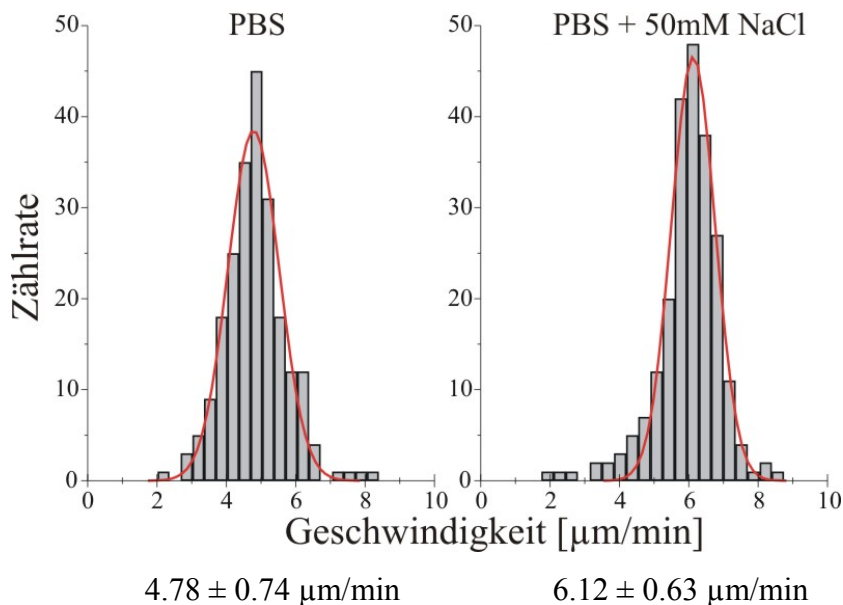
Motility Assays auf verschiedenen Proben der gleichen Präparationsreihe ergaben erhöhte Geschwindigkeit mit steigender Ionenstärke der Pufferlösung. Abbildung 6-38 zeigt die Geschwindigkeitsverteilungen dreier nacheinander durchgeführter Messungen. Die Proben {strukturiert mit [PS(245)-*b*-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0.5</sub>(225)] und passiviert mit mPEG2000-Harnstoff (4)} wurden nach dem gleichen Protokoll mit Eg5 und Mikrotubuli funktionalisiert. Daraufhin wurde der Puffer ausgetauscht, wobei die Ionenstärke bzw. die Puffer selbst variiert, die Konzentrationen der Zusatzkomponenten (Taxol, BSA, oxygen scavenger, ATP) jedoch konstant gehalten wurden.



**Abbildung 6-38:** Geschwindigkeitsverteilungen dreier gliding assays auf mittels [PS(245)-*b*-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0.5</sub>(225)] strukturierten, mit mPEG2000-Harnstoff (4) passivierten und mit Eg5 und Mikrotubuli beladenen Glasproben bei unterschiedlichen Pufferbedingungen. [links]: Gemisch PBS/H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:1; [mitte]: BRB80; [rechts]: PBS; alle anderen Komponenten konstant.

Aus Abbildung 6-38 ist eine deutliche Abhängigkeit der ermittelten Geschwindigkeit vom jeweiligen Puffer zu erkennen. Es handelt sich hierbei um ein bislang unbekanntes Verhalten von Eg5. BRB80 und PBS/Wasser (1/1) haben vergleichbare Ionenstärke und weisen somit

ähnliche Geschwindigkeiten auf. Im Puffer mit doppelter Salzkonzentration (PBS) steigt die Geschwindigkeit um etwa  $1.5 \mu\text{m}/\text{min}$ . Bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration (Abbildung 6-39) konnte eine weitere Geschwindigkeitserhöhung beobachtet werden. Durch Zugabe von  $50 \text{ mM NaCl}$  zu PBS unter Beibehaltung aller Konzentrationen der Zusatzkomponenten (Taxol, BSA, oxygen scavenger, ATP) konnte auf der gleichen Probe eine Geschwindigkeitszunahme von etwa  $1.3 \mu\text{m}/\text{min}$  gemessen werden.

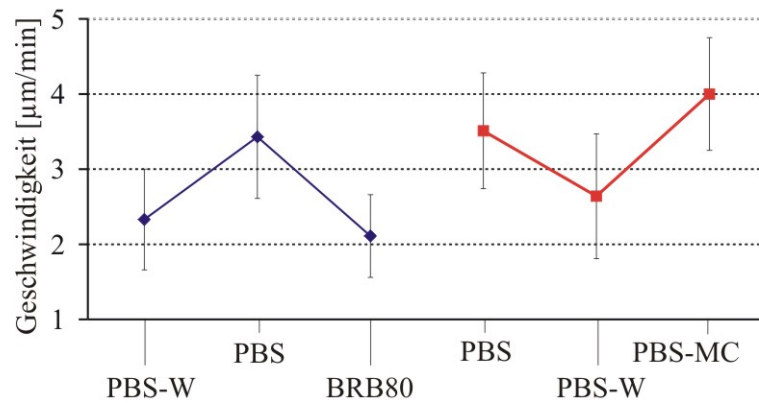


**Abbildung 6-39:** Geschwindigkeitsverteilungen zweier gliding assays auf einer mittels [PS(500)-*b*-P2VP(HAuCl<sub>4</sub>)<sub>0.5</sub>(270)] strukturierten, mit mPEG2000-Harnstoff (4) passivierten und mit Eg5 beladenen Glasprobe bei unterschiedlichen Salzbedingungen durch Lösungsaustausch. [links]: PBS; [rechts]: PBS mit  $50 \text{ mM}$  extra NaCl; alle anderen Komponenten konstant.

Durch weitere Erhöhung der Salzkonzentration ( $100 \text{ mM}$  bzw.  $200 \text{ mM NaCl}$ ) wurden die Bindungen zwischen Eg5 und Mikrotubuli so sehr geschwächt, dass kein gleichförmiges Gleiten mehr beobachtet wurde. Es entstanden äußerst labile Zustände (teilweises Ablösen und Neuanbindung von Mikrotubuli)<sup>106,120</sup>, die mittels der verwendeten Methoden nicht mehr analysierbar waren. Diese Labilität konnte durch Erhöhung der Viskosität mittels Methylcellulose ( $0.5 \%$ ) reduziert werden, so dass Gleitgeschwindigkeiten bei hohen Salzzusätzen ( $100 \text{ mM}$  bzw.  $200 \text{ mM NaCl}$ ) ermittelt werden konnten. Dabei zeigten sich keine weiteren Geschwindigkeitserhöhungen.

Durch Austausch der Versuchslösungen auf der gleichen Probe unter Variation der Salzkonzentration bei konstanten Zusätzen (ATP, Taxol, BSA, OS) konnte zudem gezeigt werden, dass die Geschwindigkeitsveränderungen reversibel sind (Abbildung 6-40; 2 verschiedene Versuchsdurchführungen). Dies verdeutlicht, dass die beobachteten

Veränderungen weder auf Ablösen des Motorproteins von der Goldnanostruktur noch auf seine Denaturierung zurückgeführt werden können. Somit konnte bei Geschwindigkeitsuntersuchungen in verschiedenen Pufferlösungen von einer gleich bleibenden aktiven Motorkonzentration auf der Oberfläche ausgegangen werden.



**Abbildung 6-40: Reversibilität der ermittelten Geschwindigkeiten. Austausch von Puffern beeinflusst reversibel die Geschwindigkeit der Mikrotubuli auf Eg5 funktionalisierten Goldnanostrukturen eingebettet in einer mPEG2000-Harnstoff-Matrix (4) [PBS-W: PBS/Wasser 1:1; PBS-MC: PBS mit 0.5 % Methylcellulose; Struktur:  $110 \pm 10$  nm].**

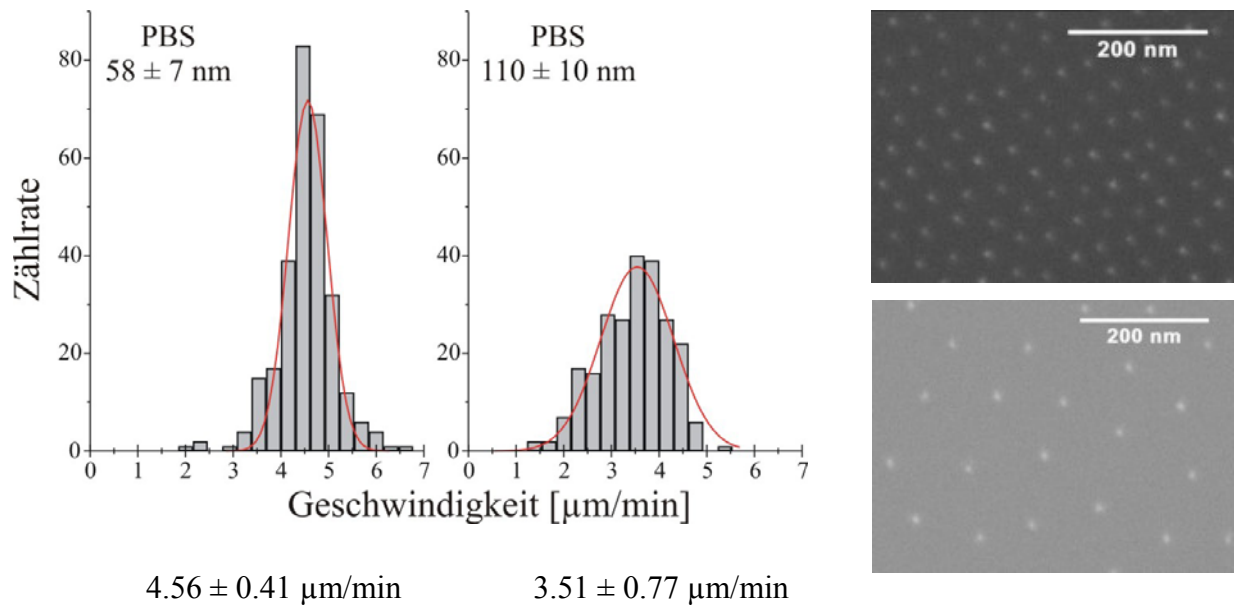
Eine Salzabhängigkeit der Gleitgeschwindigkeit von Mikrotubuli auf mit Kinesin oder mit kinesinverwandten Motorproteinen funktionalisierten Oberflächen ist bislang in dieser Größenordnung nicht beobachtet worden.<sup>121</sup> Eine Geschwindigkeitserhöhung der Mikrotubuli bei Steigerung der Salzkonzentration bedeutet eine größere Anzahl einzelner oder synchroner „8 nm-Schritte“ durch das Motorprotein Eg5 pro Zeiteinheit. Untersuchungen an dimeren Eg5-Fragmenten zeigten eine leichte Abnahme von  $k_{cat}$  bei Erhöhung der Salzkonzentration,<sup>102</sup> wohingegen an einem monomeren Fragment von KSP (Humananalogon zu Eg5) keine Änderung von  $k_{cat}$  gemessen wurde.<sup>106</sup> Eine Erhöhung von  $k_{cat}$  und somit der Einzelschrittfrequenz eines einzelnen Motorproteins im Falle des hier verwendeten homotetrameren Eg5 ist daher unwahrscheinlich. Einige Mitglieder der Kinesin-Superfamilie weisen zusätzlich zur Motordomäne weitere Bindungsstellen für Mikrotubuli auf.<sup>120,122</sup> Träfe dies ebenfalls für Eg5 zu, so könnte eine solche Bindungsstelle eine Gegenkraft erzeugen. Durch Erhöhung der Salzkonzentration würde durch Kompensation elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Motor und Mikrotubulus diese Bremswirkung geschwächt und die Gleitgeschwindigkeit der Mikrotubuli in einem gliding assay nähme zu. Untersuchungen an einem dimeren Eg5 (aufgebaut aus den ersten 590 Aminosäuren des vollständigen Motorproteins), zeigten selbst in Anwesenheit von ATP eine hohe Affinität zu Mikrotubuli.<sup>123</sup>

Dieses Verhalten könnte auf eine zusätzliche Bindungsstelle an Eg5 für Mikrotubuli zurückzuführen sein. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der höheren Gleitgeschwindigkeiten durch steigende Salzkonzentration wäre im Falle eines unprozessiven Motors eine Erniedrigung des „duty ratio“, dem Quotienten aus der Zeit, in der ein Motor an einem Filament gebunden ist, und der Dauer eines ATP-Hydrolysezyklus. Mit einer Verringerung des „duty ratio“ würde eine höhere Sättigungsgeschwindigkeit einhergehen, da im gleichen Zeitintervall eine höhere Anzahl sukzessiver Schritte durch unterschiedliche Motoren durchgeführt werden könnte. Eine eindeutige Erklärung für diese Salz-Geschwindigkeits-Korrelation im Falle des Eg5 kann nicht gegeben werden.

#### **6.4.2.5 Einfluss der Goldpunktdichte auf die Mikrotubuligeschwindigkeit**

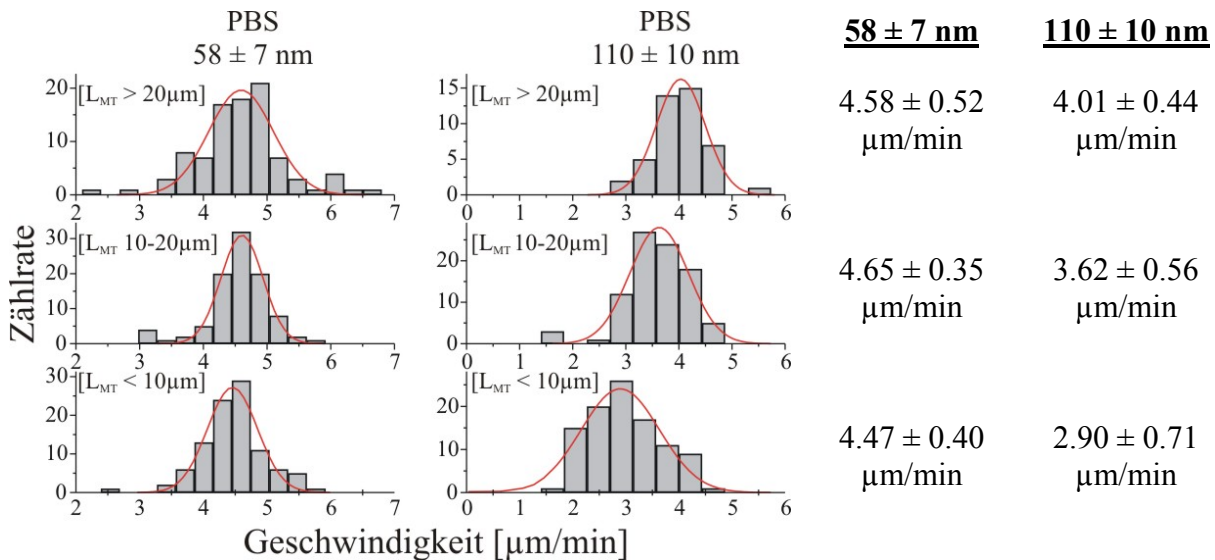
Um den Einfluss der Goldpunktstruktur auf die Geschwindigkeit unter vergleichbaren Bedingungen zu untersuchen (Eg5-Konzentration, Puffer und Zusätze, Inkubationszeiten, Temperatur) wurden pro Glasprobe zwei unterschiedliche Strukturen aufgebracht (vgl. Abbildung 6-35 B). Die für die Experimente verwendete Flusszelle wurde so aufgebaut, dass die zwei strukturierten Bereiche parallel zum Durchfluss ausgerichtet waren. Durch diesen symmetrischen Aufbau der Flusszelle konnten Gradienteneffekte (z. B. Eg5-Konzentrationschwankungen auf der Oberfläche) vermieden werden.

Aus Abbildung 6-41 wird die Abhängigkeit der Gleitgeschwindigkeit von der ausgehenden Goldpunktdichte deutlich. Auf der geringen Partikeldichte zeigt sich in PBS eine geringere Geschwindigkeit ( $3.51 \pm 0.77 \mu\text{m}/\text{min}$ ) als auf der hohen Dichte ( $4.56 \pm 0.41 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Nach Kapitel 6.4.2.3 steht diese Partikeldichte in direktem Zusammenhang mit der Eg5-Konzentration auf der Oberfläche, somit ist die gemessene Geschwindigkeit eine Funktion der oberflächlichen Motorkonzentration und es zeigt sich die selbe Abhängigkeit, welche bereits für nicht prozessives Myosin II berichtet wurde (siehe Kapitel 4.4.2.3 Abbildung 4-17).<sup>89</sup> Diese Dichteabhängigkeit der Geschwindigkeit wurde in verschiedenen Puffern nachgewiesen. Hierbei wurden sowohl salzarme (BRB80 bzw. PBS/Wasser 1:1) wie auch salzreiche Puffer (PBS mit 50 mM extra NaCl) und höher viskose Puffer [0.5 % Methylcellulose in PBS (auch mit 50 bis 200 mM extra NaCl) bzw. in BRB80 (auch mit extra 20 mM NaCl)] eingesetzt. In allen Untersuchungen lagen die Geschwindigkeitsunterschiede im Bereich von 0.5 bis 1.4  $\mu\text{m}/\text{min}$ .



**Abbildung 6-41:** Geschwindigkeitsverteilungen eines gliding assays in PBS auf einer mit zwei unterschiedlichen Goldpunktstrukturen versehenen, mit mPEG2000-Harnstoff (4) passivierten und mit Eg5 und Mikrotubuli beladenen Glasprobe. [links]:  $5 \pm 1$  nm Goldpunkte im Abstand von  $58 \pm 7$  nm; [mitte]:  $7 \pm 1$  nm Goldpunkte im Abstand von  $110 \pm 10$  nm; [rechts]: REM-Aufnahmen der beiden Goldpunktstrukturen.

Auffällig in Abbildung 6-41 ist die höhere Halbwertsbreite der Geschwindigkeitsverteilung bei geringerer Goldpunktdichte. Dies impliziert einen zusätzlichen Effekt, der durch längenabhängige Einteilung der Mikrotubuli in drei Kategorien deutlich wird ( $\text{MT} < 10$   $\mu\text{m}$ ,  $10$   $\mu\text{m} < \text{MT} < 20$   $\mu\text{m}$ ,  $\text{MT} > 20$   $\mu\text{m}$ ). Während auf hohen Goldpunktdichten die ermittelten Geschwindigkeiten unabhängig von der Mikrotubuluslänge ist (Abbildung 6-42 links) weist sie auf geringen Partikeldichten eine deutliche Längenabhängigkeit auf (Abbildung 6-42 mitte). Je länger der Mikrotubulus ist, desto höher ist seine Geschwindigkeit, wobei diese in unterhalb derer der hohen Golddichten lagen (Abbildung 6-42 Tabelle). Dieser Effekt steht im Einklang mit dem in Abbildung 6-41 gezeigten Partikeldichteeffekt: Je mehr Motoren an den Mikrotubulus binden, umso schneller wird dieser, bis eine Geschwindigkeitssättigung erreicht ist. Abnehmende Geschwindigkeiten aufgrund zu hoher Motordichten wurden nicht beobachtet.

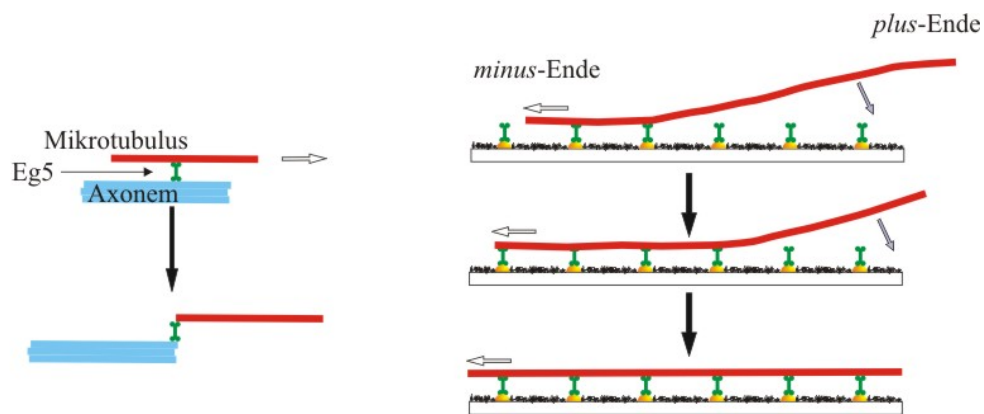


**Abbildung 6-42: Ermittelte Geschwindigkeiten des gliding assays aus Abbildung 6-41 in Abhängigkeit von der Mikrotubullänge**

Diese Ergebnisse lassen ein nicht prozessives Verhalten des Motorproteins Eg5 vermuten, jedoch weisen neueste Forschungsergebnisse von Kapitein *et al.*<sup>96</sup> auf eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die ermittelte Abhängigkeit von Motordichte und Mikrotubulusgeschwindigkeit hin. Gliding assays auf Axonemen mit Eg5 und Mikrotubuli zeigten ein bislang unbekanntes Verhalten. Erreichten die transportierten Mikrotubuli mit ihrem *plus*-Ende das *plus*-Ende des Axonems wurde in vielen Fällen kein Ablösen beobachtet. Stattdessen blieben die Mikrotubuli am Axonem gebunden (Abbildung 6-43 links). Es konnte jedoch nicht ermittelt werden, ob nur ein Motorprotein oder ob Motoraggregate für dieses Anheften verantwortlich sind. Wäre diese Beobachtung auf das Festhalten eines einzelnen Eg5-Motorproteins zurückzuführen, so sollte sich Eg5 prozessiv verhalten, da bei nicht prozessiven Motoren nach jedem getätigten Schritt ein Ablösevorgang vom Filament erfolgen würde. Hier sei jedoch angemerkt, dass die Ablöserate eines prozessiven Motors vom Filament davon abhängt, ob sich der Motor entlang des Filamentgitters bewegt oder ob er bereits dessen Ende erreicht hat. Es wird davon ausgegangen, dass das Ablösen der gebundenen Motordomäne mit der Anbindung der ungebundenen Motordomäne gekoppelt ist.<sup>82</sup> Am Ende des Filaments angekommen, kann das Motorprotein mit seiner freien Motordomäne nicht mehr binden. Dadurch wird die Dissoziation der gebundenen Domäne vom Filament verzögert: Der Motor „bleibt hängen“. Unter der Annahme, dass nur ein einzelnes Eg5 an diesem Festhaltevorgang beteiligt ist, wäre es nun möglich, dass in den bislang vorgestellten gliding assays auf Goldnanostrukturen jeweils der letzte Motor am *plus*-Ende des Mikrotubulus einen Bremseffekt auf die

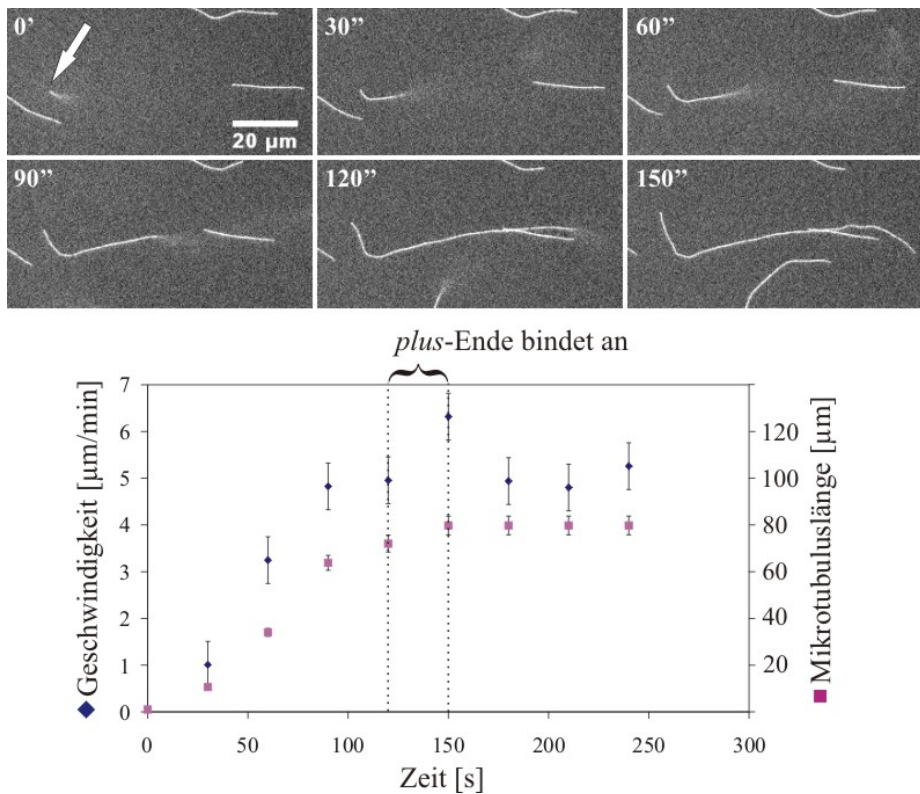


Gleitgeschwindigkeit ausübt. Je mehr Motoren am Transportvorgang beteiligt sind, umso höher wäre die Wahrscheinlichkeit einer Kompensation dieser molekularen Bremse. Mit der oben dargelegten Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Mikrotubuluslänge auf geringen Goldpunktdichten ( $110 \pm 10$  nm Abstände) sollte ermittelt werden, ob ein Bremseffekt durch endständiges Eg5 stattfindet. Hierfür wurden lange Mikrotubuli untersucht ( $> 30 \mu\text{m}$ ), welche mit ihrem *minus*-Ende an die mit Eg5 funktionalisierte Goldnanostruktur gebunden und durch das Motorprotein über die Oberfläche transportiert wurden. Während dieses Transportes sollte das *plus*-Ende ungebunden bleiben um keinen Bremseffekt zu verursachen (Abbildung 6-43 rechts).



**Abbildung 6-43:** [links]: Transport eines Mikrotubulus auf einem Axonem durch das Motorprotein Eg5; bei Erreichen des *plus*-Endes des Axonems bleibt der Mikrotubulus mit seinem *plus*-Ende am Axonem gebunden; aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur ein Eg5 dargestellt, obwohl nicht bestimmt werden konnte, wie viele Motoren an diesem Festhaltevorgang beteiligt sind.<sup>96</sup> [rechts]: Aufbau des Experiments zur Ermittlung des Bremseffektes; lange Mikrotubuli binden mit ihrem *minus*-Ende an die mit Eg5 funktionalisierte Goldnanostruktur [Passivierung der Glaszwischenräume mit mPEG2000-Harnstoff (4)]; solange das *plus*-Ende nicht gebunden ist wird kein Bremseffekt erwartet.

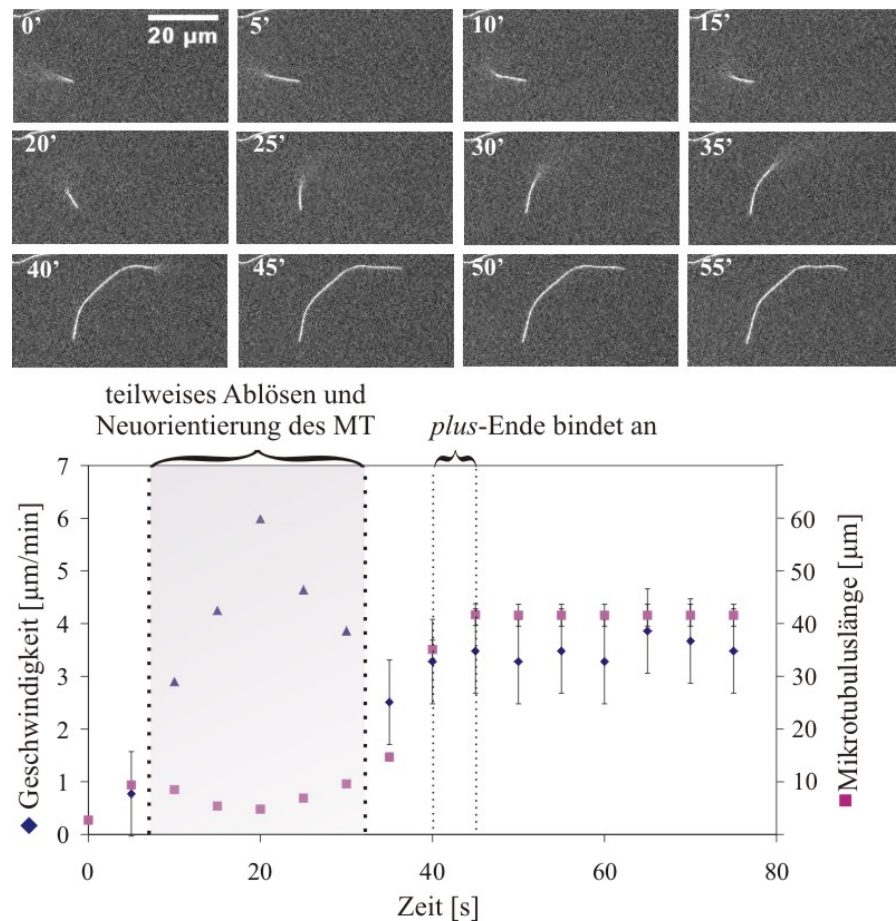
Abbildung 6-44 zeigt ein Beispiel eines auf oben beschriebener Weise an die Oberfläche bindenden Mikrotubulus. Sofort nach Anbindung seines *minus*-Endes an die mit Eg5 funktionalisierte Goldnanostruktur (Pfeil in der ersten Aufnahme in Abbildung 6-44) wurde er durch das Motorprotein über die Oberfläche transportiert. In diesem dargestellten Fall benötigte der Mikrotubulus insgesamt 150 s bis zur vollständigen Anbindung. Durch Auftragung der ermittelten Geschwindigkeiten (Zeitintervall 30 s) und der dazugehörigen Mikrotubuluslänge (nur gebundener Anteil) gegen die Zeit wird die bereits oben dargestellte Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Länge der Mikrotubulus auf geringen Goldpunktdichten ( $110 \pm 10$  nm Abstände) deutlich. Je größer der gebundene Anteil des Mikrotubulus, desto höher seine Geschwindigkeit. Wie zuvor bereits erläutert sollte es hier zu keinem Bremseffekt durch endständiges Eg5 kommen, solange das *plus*-Ende des Mikrotubulus nicht gebunden ist.



**Abbildung 6-44:** [oben]: Anbindung eines Mikrotubulus über sein *minus*-Ende auf einer mit Eg5 funktionalisierten Goldpunktstruktur [ $110 \pm 10$  nm Abstände; passiviert mit mPEG2000-Harnstoff (4)]; [unten]: Auftragung der ermittelten Geschwindigkeit (blaue Rauten) und der Mikrotubuluslänge (violette Quadrate; nur gebundener Anteil) gegen die Zeit.

Die durchschnittliche Maximalgeschwindigkeit des Mikrotubulus, welche im obigen Fall ab einer Mikrotubuluslänge von etwa 60 µm erreicht wurde, liegt bei etwa 4,9 µm/min und ist somit im Bereich der Geschwindigkeiten, die auf geringeren Partikelabständen ( $58 \pm 7$  nm Abstände) unter vergleichbaren Bedingungen ermittelt wurden (4,5 bis 5,1 µm/min). Die ermittelte Gleitgeschwindigkeit liegt somit bereits im Sättigungsbereich, der den möglichen Bremseffekt überkompensiert.

Ein zweites Beispiel aus dem gleichen Experiment ist in Abbildung 6-45 dargestellt. Hierbei zeigt sich eine Schwierigkeit dieser Versuchsdurchführung. Der Mikrotubulus band über sein *minus*-Ende an die mit Eg5 funktionalisierte Goldnanostruktur, löste sich teilweise wieder ab, orientierte sich neu und band dann binnen 25 s komplett auf der Oberfläche. Somit ergaben sich auch Bewegungen, die nicht auf den Transport durch Eg5 verursacht wurden. Durch Auftragen der ermittelten Geschwindigkeit und der Länge des Mikrotubulus gegen die Zeit wird das Zeitintervall der Neuorientierung deutlich (Abbildung 6-45 unten), jedoch ist der im vorherigen Beispiel gezeigte Zusammenhang zwischen Mikrotubuluslänge und seiner Geschwindigkeit auch hier erkennbar.

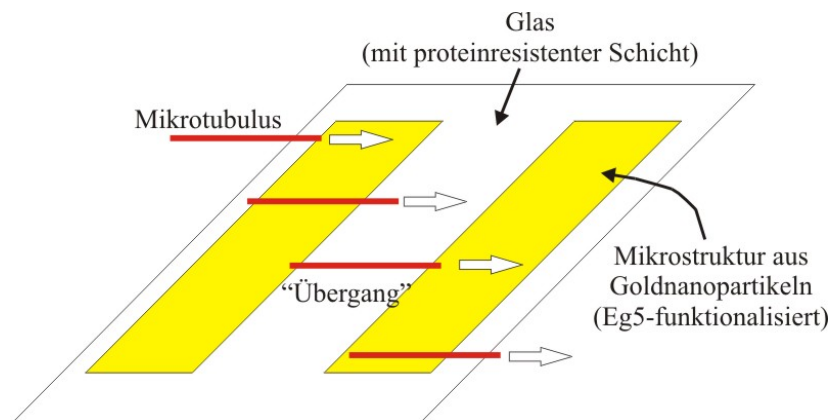


**Abbildung 6-45:** [oben]: Anbindung eines Mikrotubulus über sein *minus*-Ende auf einer mit Eg5 funktionalisierten Goldpunktstruktur [ $110 \pm 10$  nm Abstände; passiviert mit mPEG2000-Harnstoff (4)]; [unten]: Auftragung der ermittelten Geschwindigkeit (blaue Rauten; während Neuorientierung des MT blaue Dreiecke) und der Mikrotubuluslänge (violette Quadrate; nur gebundener Anteil) gegen die Zeit.

Die durchschnittliche Maximalgeschwindigkeit dieses Mikrotubulus liegt bei etwa  $3.5 \mu\text{m}/\text{min}$ . Diese ist geringer als die des Mikrotubulus aus Abbildung 6-44, somit befindet er sich noch nicht im Sättigungsbereich der Geschwindigkeit. Auffallend ist jedoch, dass er bei einer Länge von  $40 \mu\text{m}$  mit gebundenem *plus*-Ende die gleiche Geschwindigkeit aufweist wie der Mikrotubulus aus Abbildung 6-44 bei gleicher Länge mit ungebundenem *plus*-Ende. Wäre ein Bremseffekt vorhanden, so sollte die ermittelte Geschwindigkeit bei gleicher Länge und gebundenem *plus*-Ende geringer sein als mit ungebundenem.

Die Schwierigkeit dieser Experimente besteht in der für eine statistische Auswertung nötigen Anzahl von Bindungsereignissen in erforderlicher Abfolge (Bindung über *minus*-Ende). In den meisten Fällen wurde jedoch eine relativ schnelle Anbindung (innerhalb weniger Sekunden) ausgehend von unterschiedlichen Stellen am Mikrotubulus beobachtet. Die zwei genannten Beispiele dienen somit nur als Hinweis auf einen nicht vorhandenen Bremseffekt des endständigen Eg5-Motors geben.

Durch Erzeugung von mikro-nano-strukturierten Oberflächen, bei denen Bereiche im  $\mu\text{m}$ -Maßstab mit hexagonalen Goldnanopunkten belegt werden, könnte die mögliche Bremswirkung des endständigen Motorproteins untersucht werden. Hierbei würden die Bewegungsereignisse relevant, welche einen Transport von Mikrotubuli in die Eg5-funktionalisierte Goldstruktur „hinein“ und somit eine ungebundenes *plus*-Ende aufweisen. Bei günstiger Auswahl der Größe der Mikrostrukturen mit Abständen zwischen diesen, welche einen „Übergang“ der Mikrotubuli ermöglicht, könnten mit Hilfe eines einzigen Filamentes mehrere dieser relevanten Bewegungsereignisse beobachtet werden (Abbildung 6-46).



**Abbildung 6-46: Mikro-nano-Struktur zu Ermittlung der möglichen Bremswirkung des endständigen Eg5.**

Alle in diesem Kapitel erläuterten Ergebnisse deuten auf ein nicht prozessives Verhalten des Motorproteins Eg5 hin, wobei ein Bremsseffekt eines endständigen Motors nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

#### 6.4.2.6 Trapezartige gliding assays mit Eg5 und Mikrotubuli

Eg5 ist ein essentielles Motorprotein für die Ausbildung des Spindelapparats während der Mitose.<sup>77</sup> Die Vermutung, Eg5 sei in der Lage Mikrotubuli antiparallel zu verschieben<sup>94</sup>, konnte nach neuesten Erkenntnissen experimentell untermauert werden.<sup>96</sup> Um dieses Verhalten zu bestätigen, wurde ein neuartiger Ansatz verfolgt, der es erlauben sollte, Eg5 auf einem „Mikrotubulustrapez“ laufen zu lassen und gleichzeitig weitere Mikrotubuli zu transportieren (siehe Abbildung 6-48). Es wurden Mikrotubuli über deaktiviertes Eg5 quasi senkrecht zu Goldmikrolinien (3 – 5 µm breit im Abstand von etwa 60 µm) auf mit mPEG2000-Harnstoff (4) passiviertem Glas angebunden (Trapez). Anschließend wurden aktives Eg5 in Gegenwart von AMP-PNP und weitere Mikrotubuli angebunden. Letztere sollten sich schließlich durch den aktiven Transport des Motorproteins Eg5 in Gegenwart von ATP auf den anfänglich fixierten Mikrotubuli entlang bewegen. Dieser Ansatz ermöglichte es, „freischwebende“ Bewegung zu untersuchen. Durch die Passivierung des Glases mit mPEG2000-Harnstoff (4) konnte unspezifische Motoranbindung unterdrückt und somit die Transportereignisse von der Oberfläche weg verlagert werden. Durch unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung konnten die statischen Trägermikrotubuli von den mobilen Mikrotubuli unterschieden werden.

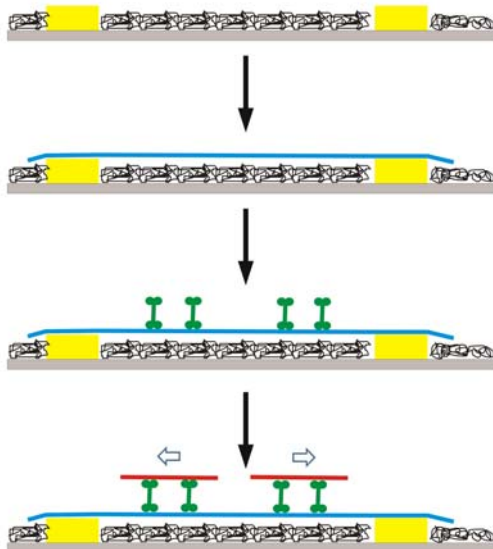
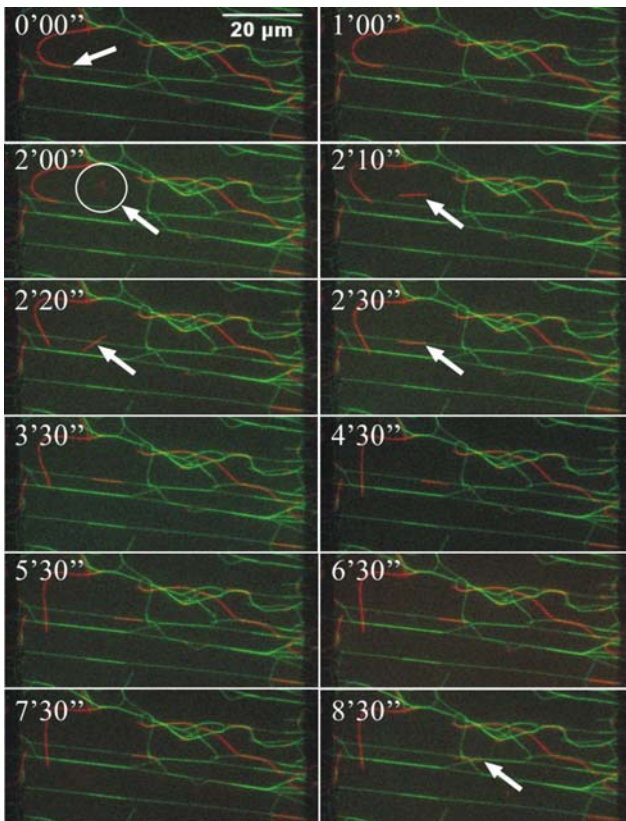


Abbildung 6-47: Ansatz des freischwebenden gliding assays – Goldmikrolinien auf Glas eingebettet in einer mPEG2000-Harnstoff (4) Matrix dienen als Substrat, auf dem lange Mikrotubuli über deaktiviertes Eg5 selektiv an Gold gebunden werden (Schritt 1; deaktiviertes Eg5 aus Übersichtsgründen nicht dargestellt). Anschließend wird Eg5 in Gegenwart von AMP-PNP angebunden (Schritt 2) und weitere Mikrotubuli mit einem von denen der ersten Lage abweichendem Fluorophor immobilisiert (Schritt 3). Durch Austausch des AMP-PNP gegen ATP wird die Bewegung der zweiten Mikrotubulilage (aus Schritt 3) entlang der statischen (aus Schritt 1) beobachtet.

Die spezifische Anbindung der Mikrotubulilagen und deren Transport sind in Abbildung 6-48 dargestellt. Gespannte, statische Mikrotubuli (Alexa-488; grün) dienten als Schiene für Eg5 und transportierte Mikrotubuli (TAMRA; rot). Man erkennt deutlich die gerichtete Bewegung

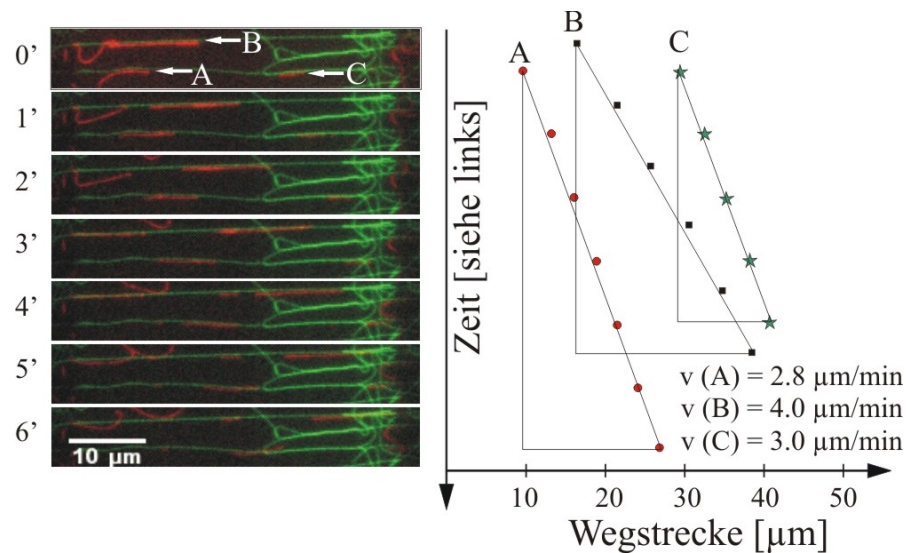
des mobilen Mikrotubulus (Pfeil in Bild 1) und die selektive Anbindung eines kurzen Mikrotubulus und dessen Transport entlang der immobilisierten Filamente (ab 2'00'').



**Abbildung 6-48:** Über deaktiviertes Eg5 auf Goldlinien immobilisierte Mikrotubuli (grün; Alexa-488) dienen als Schiene für angebundenes aktives Eg5 in Gegenwart von ATP und deren Transport von Mikrotubuli (rot; TAMRA). Die spezifische Anbindung wird ab der dritten Aufnahme (2'00'') deutlich. Die Goldstruktur (schwarze Schatten links und rechts in jeder Aufnahme) ist eingebettet in einer mPEG2000-Harnstoffmatrix (4), um unspezifische Anbindung an die Oberfläche und somit unkontrollierten Transport zu unterbinden.

Geschwindigkeitsmessungen an solchen Trapez-assays wiesen trotz geringer Statistik wie bei den bereits erläuterten gliding assays auf geringen Goldnanopunktdichten (vgl. Kapitel 6.4.2.5) eine längenabhängige Geschwindigkeit auf (Abbildung 6-49). Im Gegensatz zu den bislang dargelegten Momentangeschwindigkeiten in einem Zeitintervall von 30 s wurde hier die Durchschnittsgeschwindigkeit über 6 min ermittelt (Fehler ~15 %). Unter der Annahme, dass im Trapezversuch beide Motordomänen unabhängig und unverändert zu gewöhnlichen gliding assays voneinander fungieren, sollten bei antiparalleler Ausrichtung der Mikrotubuli doppelt so hohe Geschwindigkeiten gemessen werden als auf Oberflächen vergleichbarer Eg5-Dichten. Wahrscheinlich sind die am aktiven Mikrotubulitransport beteiligten Eg5-Motoren in einer bedeutend geringeren Konzentration vorhanden als bei den gliding assays auf mit Goldpunkten strukturierten Glasoberflächen, da eine Geschwindigkeitsverdoppelung nicht beobachtet wurde. Diese Nichtverdoppelung durch Deaktivierung nur einer der beiden Motordomänen wurde ausgeschlossen. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei allen am Transport beteiligten Eg5 genau eine Motordomäne aktiv bleibt, ist gering. Es würde erwartet werden, dass diese Deaktivierung eher statistisch erfolgt. Zwar würde es vom Transport keinen

Unterschied machen, welche der beiden Motoreinheiten deaktiviert ist, jedoch sollten auch komplett aktive wie auch komplett inaktive Motorproteine vorhanden sein. Letztere würden aber das gleichmäßige Gleiten des mobilen Mikrotubulus stören, d.h. bei vollständiger Deaktivierung bliebe der mobile Mikrotubulus hängen, eine Eigenschaft, die bei den gliding assays auf Goldnanostrukturen zeitweise beobachtet wurde.



**Abbildung 6-49: Geschwindigkeitsmessung in Trapez-assays. Kurze Mikrotubuli (A) und (C) sind langsamer als der Längere (B);**

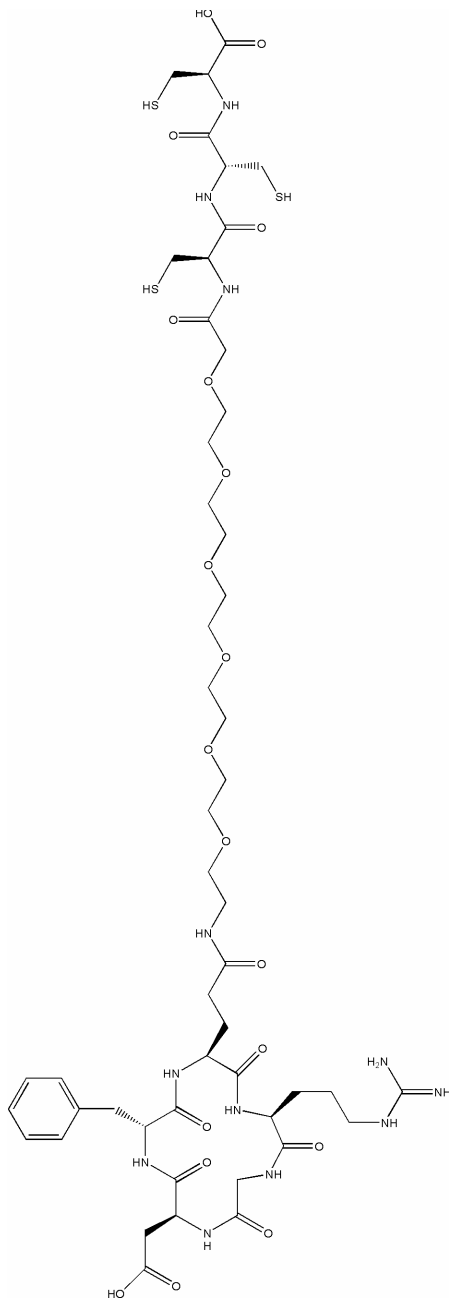
Unter Verwendung polaritätsmarkierter Mikrotubuli, bei denen *plus*- und *minus*-Ende unterschieden werden kann, sollte es nun experimentell möglich sein, parallelen und antiparallelen Mikrotubulitransport durch das Motorprotein Eg5 zu unterscheiden. Leider sind diese Versuche bislang erfolglos geblieben, da die für eine statistische Auswertung nötige Anzahl an eindeutigen Bewegungsereignissen nicht erreicht wurde. Dieser Ansatz birgt jedoch ein großes Potenzial zur Untersuchung verschiedenartiger Motorproteine unter Vermeidung der Interaktion mit dem Substrat.

## 7 Abkürzungsverzeichnis und Konventionen

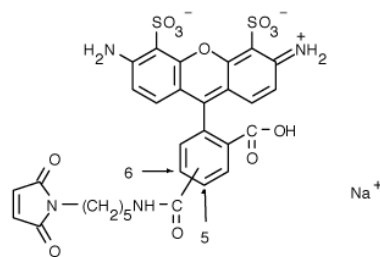
<b><u>Abkürzung</u></b>	<b><u>Bedeutung oder Zusammensetzung</u></b>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Alexa-488	(Struktur siehe nächste Seite)
AMP-PNP	Adenosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)-triphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BG40	50 Massen% BRB80; 50 Massen% Glycerin
Biotin-HPDP	N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2-pyridyldithio)propionamid
BRB80	80 mM PIPES (pH 6.8) + 1 mM MgCl <sub>2</sub> + 1 mM EGTA
BSA	bovine serum albumin
BT	20 $\mu$ M Taxol in BRB80
Cat	Catalase 5mg/ml in BG40
Cc	kritische Konzentration
CCD	charged coupled devices (ladungsgekoppelte Bauelemente)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan
DMF	Dimethylformamid
EDC	N <sup>'</sup> -(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbo-diimidhydrochlorid
Eg5	0,4mg/ml Eg5 in MOPS
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinthiocyanat
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
Glu	1M D-Glukose in Wasser
GOPTES	3-Glycidyloxypropyl-triethoxysilan
GOPTMS	3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan
G-Ox	Glukoseoxidase 5mg/ml in BG40
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
$\gamma$ -TuRC	$\gamma$ -Tubulin-Ringkomplex
HMM	heavy meromyosin
IgG	Immunglobulin G
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MC	Methylcellulose 1% in Wasser
MG	Molekulargewicht
Mg-ATP	Mg <sup>2+</sup> und ATP im Verhältnis 1:1
Mn	Zahlenmittel des Molekulargewichts
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
mPEG	Polyethylenglykolmonomethylether
mPEG750- $\beta$ -Hydroxyamin	1-[2-( $\omega$ -methoxypolyethylenglykol-750)-ethylamino]-3-(3-triethoxysilyl-propoxy)-propan-2-ol (Struktur siehe nächste Seite)
mPEGA	Aminopolyethylenglykolmonomethylether
mPEG-Harnstoff	N-3-Triethoxysilylpropyl-N'- $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol-harnstoff (Struktur siehe nächste Seite)
mPEG-Urethan	(3-Triethoxysilyl-propyl)-carbaminsäure-( $\omega$ -methoxy-polyethylenglykol)-ester (Struktur siehe nächste Seite)
MT	Mikrotubuli
MTOC	mikrotubule organising centre (Mikrotubuli organisierendes Zentrum)
Mw	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
MUS	11-Mercaptoundecansäure
NEM	N-Ethylmaleimid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OS	oxigen scavenger: BRB80/Glu/G-Ox/Cat = 6/2/1/1
p.A.	zur Analyse
P2VP	Poly-(2-vinylpyridin)
PBS	2,63mM KCl; 1,47mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 136,91mM NaCl
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
PMT	20 $\mu$ M Taxol in PBS mit 0.5% Methylcellulose
PMWT	20 $\mu$ M Taxol in PBS/H <sub>2</sub> O 1:1 mit 0.5% Methylcellulose



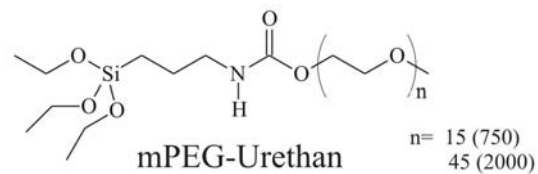
PS	Polystyrol
PT	20µM Taxol in PBS
PWT	20µM Taxol in PBS/H <sub>2</sub> O 1:1
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	cyclisches Oligopeptid mit der Teilsequenz Arg-Gly-Asp [RGD(T1) siehe unten]
SAM	selbst aggregierende Monolagen
TAMRA	Carboxy-tetramethylrhodamin
TRITC	Tetramethylrhodamin-B-isothiocyanat
Tub	Tubulinheterodimer
UV	ultra violett
VE	voll entsalzt
XMAP	MAP aus <i>xenopus laevis</i>
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie
RT	Raumtemperatur



RGD(T1)

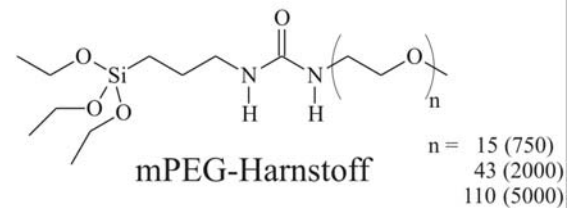


Alexa-488

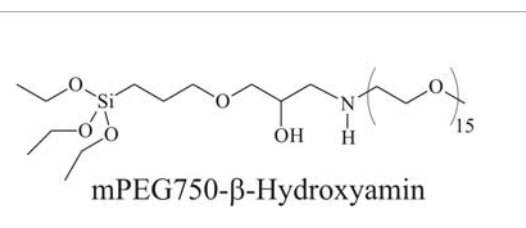


mPEG-Urethan

mPEG750-Urethan (1) und mPEG2000-Urethan (2)



mPEG-Harnstoff

mPEG750-Harnstoff (3), mPEG2000-Harnstoff (4)  
und mPEG5000-Harnstoff (5)

mPEG750-β-Hydroxyamin

mPEG750-β-Hydroxyamin (6)

## 8 Danksagung

Viele Leute haben dazu beigetragen, dass diese Arbeit zustande gekommen ist. Einigen von ihnen möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Joachim Spatz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für seine Betreuung während der vergangenen Jahre bedanken. Interdisziplinäres Arbeiten ermöglichte er mir nicht nur innerhalb des Institutes, sondern auch durch eine sehr interessante und fruchtbare Kooperation mit der Gruppe von Dr. Thomas Surrey vom Europäischen Labor für Molekularbiologie (EMBL). Thomas brachte mir nicht nur alles für die Durchführung der Experimente bei, sondern er erklärte mir stets geduldig die Zusammenhänge der Biologie. Seine Tür war jederzeit für mich offen. Ich hoffe, wir können noch einige interessante Sachen entdecken.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Jürgen Wolfrum als Gutachter dieser Arbeit danken. Mein Dank gilt auch Prof. Rainer Fink, der auf meine Anfrage, ob er als Prüfer fungieren wolle, spontan zusagte.

Weiterhin danke ich der Universität Heidelberg für die Unterstützung nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz.

Ebenso danke ich der guten Seele des AKs. Ohne Frau Boczek wäre ich ziemlich oft an der Bürokratie gescheitert. Ich konnte jederzeit bei ihr anklopfen und wurde selbst dann, wenn sie in Arbeit nahezu ertrunken ist, niemals abgewiesen. Was wären wir ohne sie.....

Ich danke Julie Cahu, Aurélien Aulichon und Jovana Drinjakovic und Matthias Utz für alle Proteine; zudem danke ich der ganzen Surrey-Gruppe (Thomas, Matthias, Aurélien, Marianne, Peter, Cécile, Arne, Julie, Marcus, Jan, Hendrik und Jovana) für jedwede Hilfe und die herzliche Aufnahme. Ich hatte und habe das Gefühl, dazu zu gehören.

Aus unserer Gruppe danke ich....

... Christian Schmitz für die Programmierung von IDL. Ohne dieses Programm wären die Auswertungen sehr komplex geworden. Zudem hat er sich die Mühe gemacht, diese Arbeit Korrektur zu lesen.

... Ada Cavalcanti-Adam für alle Hilfe bezüglich der Zellen. Weiterhin hatte sie jederzeit ein offenes Ohr und überzeugte mich mit ihrem Fachwissen. Diskussionen mit ihr waren stets eine Bereicherung. Außerdem war sie mir bei der englischen Zusammenfassung eine große Hilfe.

... Alexandre Micoulet, mit dem ich lange Zeit das „Franzosenlabor“ teilen durfte. Meine Versuche, naturwissenschaftlich auf Französisch zu diskutieren, entgegnete er offen und ermöglichte mir dadurch meinen Wortschatz zu erweitern.

... Stefan Gräter, Wouter Roos, Jens Ulmer, Roman Glass und Marco Arnold für die unzähligen Diskussionen und Anregungen.

... Tamas Haraszti für die Betreuung des Netzwerks und für die Hilfe bei sämtlichen Computer- und Druckerproblemen.

... Babak Hosseini, der nicht nur mit Tamas unsere neue Plattform Wiki programmiert hat und diese betreut, sondern auch mein neuer Labor-/Bürokollege ist.

... Jevgenij Raskatov für die Hilfe bei der Erzeugung der Mikrostrukturen.

... Heike Böhm für die Hilfe beim Layout dieser Arbeit.

... Simon Schulz für die entspannenden Pausen an der „frischen“ Luft, denen sich auch andere regelmäßig angeschlossen haben (Ulf, Robert, Eva, Marcus, Julia, Hannes).  
... allen übrigen für eine schöne aber teilweise auch anstrengende Zeit.

Zudem danke ich ...

... Alexander Küller. Seit einigen Jahren kenne ich ihn bereits, habe mit ihm alle Praktika im Hauptstudium durchgeführt und war mit ihm zusammen HIWI und Diplomand in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Grunze. Er lernte mich am REM ein und hat die Lithographie auf den von mir verwendeten Oberflächen durchgeführt. Ich schätze Alex gleichermaßen als Wissenschaftler wie auch als Freund.

... Wolfgang Eck. Während meiner Zeit als HIWI und als Diplomand habe ich von seinem enormen Fachwissen und Gefühl für die Wissenschaft profitieren können. Über diese Zeit hinaus hatte er stets ein offenes Ohr und konnte mir jederzeit gute Ratschläge geben.

... Axel Rosenhahn. Er hat sich trotz seines vollen Terminkalenders die Zeit genommen, diese Arbeit Korrektur zu lesen; jedoch sind unsere Gesprächsthemen nicht immer nur fachlich. Axel ist wie ich begeisterter Hobbymusiker, dementsprechend basieren viele Diskussionen auf verschiedenen Musikstilen, Riffs, Patterns oder Grooves.

... Michael Himmelhaus und Svedlana Stoycheva. Ich denke, wir haben unsere Arbeit an der MAX ganz gut gemacht.

... Günther Meinus und Peter Jeschka. Ohne diese zwei Wundermänner aus dem Keller wäre ich sicherlich noch häufiger verzweifelt, und das nicht nur an der MAX.

... allen, die dafür sorgen, dass im Institut gearbeitet werden kann (Verwaltung, Reinigungskräfte, Techniker, Feinmechaniker und Hausmeister).

Ich danke allen Praktikanten, mit denen ich während der letzten Jahre zusammenarbeiten durfte (Sabine Oberhansl, Patrick Hanno-Igels, Nicole Frey, Jonas Schäfer).

Danke sage ich auch SOUL & PEPPER. Seit nunmehr knapp fünf Jahren grooven wir zusammen. Ohne Euch wäre der Alltag und viele Wochenenden nicht so bunt gewesen.

Ich danke meinem ehemaligen Chemielehrer Dr. Jürgen Ries. Wäre er nicht gewesen, hätte ich bereits in der Schule Chemie abgewählt und wäre wohl niemals in den Naturwissenschaften gelandet.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern. Im Laufe meines Studiums und auch danach haben sie mir stets den Rücken frei gehalten und mich in jeder denkbaren Weise unterstützt. Ohne sie wäre alles viel schwieriger gewesen.

Großer Dank gilt auch meiner Freundin Ioulia Zoueva, die mit einer engelsgleichen Geduld stets die richtigen Worte fand, mich zu motivieren und zeitweise auch aufzumuntern. Auch in Zeiten, in denen ich schon fast im Labor gewohnt habe, hat sie mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt. „Ioulia, schön, dass es Dich gibt!“

## 9 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> B. Zdyrko, V. Klep, I. Luzinov, *Langmuir*, **2003**, *19*, 10179-10187.
- <sup>2</sup> B. Zdyrko, S. K. Varshney, I. Luzinov, *Langmuir*, **2004**, *20*, 6727-6735.
- <sup>3</sup> J. H. Lee, H. Bang, Lee, J. D. Andrade, *Progress in Polymer Science*, **1995**, *20*, 1043-1079.
- <sup>4</sup> P. de Gennes, *Macromolecules*, **1980**, *13*, 1069-1075.
- <sup>5</sup> K. Tasaki, *Computational and Theoretical Polymer Science*, **1999**, *9*, 271-284.
- <sup>6</sup> F. E. Bailey Jr, R. W. Callard, *Journal of Applied Polymer Science*, **1959**, *1*, 56-62.
- <sup>7</sup> V. A. Parsegian, *Nature*, **1995**, *378*, 335-336.
- <sup>8</sup> A. Ulman, *Chemical Reviews*, **1996**, *96*, 1533-1554.
- <sup>9</sup> J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chemical Reviews*, **2005**, *105*, 1103-1169.
- <sup>10</sup> F. Schreiber, *Journal of Physics: Condensed Matter*, **2004**, *16*, R881-R900.
- <sup>11</sup> J. Fick, R. Steitz, V. Leiner, S. Tokomitsu, M. Himmelhaus, M. Grunze, *Langmuir*, **2004**, *20*, 3848-3853.
- <sup>12</sup> S. Tokumitsu, A. Liebich, S. Herrwerth, W. Eck, M. Himmelhaus, M. Grunze, *Langmuir*, *18*, 8862-8870.
- <sup>13</sup> S. Herrwerth, T. Rosendahl, C. Feng, J. Fick, W. Eck, M. Himmelhaus, R. Dahint, M. Grunze, *Langmuir*, **2003**, *19*(5), 1880-1887.
- <sup>14</sup> X.-Y. Zhu, Y. Jun, D. R. Staarup, R. C. Major, S. Danielson, V. Boiadjev, W. L. Gladfelter, B. C. Bunker, A. Guo, *Langmuir*, **2001**, *17*, 7798-7803.
- <sup>15</sup> Z. Yang, J. A. Galloway, H. Yu, *Langmuir*, **1999**, *15*, 8405-8411.
- <sup>16</sup> J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, *Boisensors and Bioelectronics*, **2000**, *15*(8-10), 473-481.
- <sup>17</sup> K. Mougín, M. B. Lawrence, E. J. Fernandez, A. C. Hillier, *Langmuir*, **2004**, *20*, 4302-4305.
- <sup>18</sup> J. Groll, E. V. Amirgoulova, T. Ameringer, C. D. Heyes, C. Röcker, G. U. Niehaus, M. Möller, , *Journal of the American Chemical Society*, **2004**, *126*, 4234-4239.
- <sup>19</sup> L. Ruiz-Taylor, T. L. Martin, F. G. Zaugg, K. Witte, P. Indermuhle, S. Nock, P. Wagner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2001**, *98*(3), 852-857.
- <sup>20</sup> G. L. Kenausis, J. Vörös, D. L. Elbert, N. Huang, R. Hofer, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, J. A. Hubbell, N. D. Spencer, *Journal of Physical Chemistry B*, **2000**, *104*, 3298-3309.

- <sup>21</sup> N. Huang, R. Michel, J. Voros, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D. L. Elbert, J. A. Hubbell, N. D. Spencer, *Langmuir*, **2001**, *17*, 489-498.
- <sup>22</sup> S. Herrwerth, W. Eck, S. Reinhard, M. Grunze, *Journal of the American Chemical Society*, **2003**, *125*, 9359-9366.
- <sup>23</sup> S. Herrwerth, *Dissertation*, **2002**, Universität Heidelberg.
- <sup>24</sup> J. Spatz, *Habilitationsschrift*, **Ulm 2000**.
- <sup>25</sup> A. Küller, *Diplomarbeit*, Universität Heidelberg, **2001**.
- <sup>26</sup> V. Stadler, *Dissertation*, Universität Heidelberg, **2001**.
- <sup>27</sup> W. Geyer, *Dissertation*, Universität Heidelberg, **2001**.
- <sup>28</sup> W. Eck, V. Stadler, W. Geyer, M. Zharnikov, A. Götzhäuser, M. Grunze, *Advanced Materials*, **2000**, *12*, 805.
- <sup>29</sup> A. Küller, *Doktorarbeit*, in Arbeit.
- <sup>30</sup> J. Blümmel, *Diplomarbeit*, Universität Heidelberg, **2001**.
- <sup>31</sup> R. Glass, M. Arnold, J. Blümmel, A. Küller, M. Möller, J. P. Spatz, *Advanced Functional Materials*, **2003**, *13(7)*, 569-575.
- <sup>32</sup> J. Spatz, S. Mössmer, C. Hartmann, M. Möller, T. Herzog, M. Krieger, H.-G. Boyen, P. Zimmermann, B. Kabius, *Langmuir*, **2000**, *16*, 407-415.
- <sup>33</sup> J. Spatz, S. Mössmer, M. Möller, *Chemical European Journal*, **1996**, *2*, 1552.
- <sup>34</sup> J. Spatz, A. Roescher, M. Möller, *Advanced Materials*, **1996**, *8*, 337.
- <sup>35</sup> J. Spatz, S. Sheiko, M. Möller, *Macromolecules*, **1996**, *29*, 3220.
- <sup>36</sup> R. Glass, M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, J. Blümmel, C. Haferkemper, C. Dodd, J. P. Spatz, *New Journal of Physics*, **2004**, *6*, 101-117.
- <sup>37</sup> R. G. Jones, P. C. M. Tate, D. R. Brambley, *Polymer*, **1993**, *34*, 1768.
- <sup>38</sup> K. I. Lee, *Journal of Applied Polymer Science*, **1994**, *51*, 1781.
- <sup>39</sup> E. C. Onyiriuka, *Journal of Adhesion Science and Technology*, **1994**, *66*, 155410.
- <sup>40</sup> Gerd Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, S. 491, VCH-Weinheim, **1987**.
- <sup>41</sup> P. W. Atkins, *Quanten*, **1993**, S. 243, VCH-Weinheim.
- <sup>42</sup> Jablonski, Powell, *Surface and Interface Analysis*, **1993**, *20*, 771.
- <sup>43</sup> K. Siegbahn, *Photoelectron Spectroscopy: Retrospects and Prospects*, R. Soc., London **1985**
- <sup>44</sup> J. H. Scofield, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, **1976**, *8*, 129.
- <sup>45</sup> S. Tanuma, C. J. Powell, *Surface and Interface Analysis*, **1991**, *17*, 911.
- <sup>46</sup> T. Felgenhauer, *Diplomarbeit*, Universität Heidelberg, **1997**.

- <sup>47</sup> B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson, *Molekularbiologie der Zelle*, **1995**, 3. Auflage, VCH Verlag Weinheim (BRD).
- <sup>48</sup> J. Koolman, K.-H. Röhm, *Taschenatlas der Biochemie*, **1994**, 3. Auflage, VCH Verlag Weinheim (BRD).
- <sup>49</sup> D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, **1992**, VCH Verlag Weinheim (BRD).
- <sup>50</sup> M. A. Welte, *Current Biology*, **2004**, 14, R525-R537.
- <sup>51</sup> E. Nogales, M. Whittaker, R. A. Milligan, K. H. Downing, *Cell*, **1999**, 96, 79-88.
- <sup>52</sup> P. Meurer-Grob, J. Kasparian, R. H. Wade, *Biochemistry*, **2001**, 40, 8000-8008.
- <sup>53</sup> R. H. Wade, P. Meurer-Grob, F. Metoz, I. Arnal, *European Biophysical Journal*, **1998**, 27, 446-454.
- <sup>54</sup> H. Li, D. J. DeRosier, W. V. Nicholson, E. Nogales, K. H. Downing, *Structure*, **2002**, 10, 1317-1328.
- <sup>55</sup> T. Mitchison, M. Kirschner, *Nature*, **1984**, 312, 237-242.
- <sup>56</sup> H. Lodish, A. Berk, L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, **2000**, 4th ed., W. H. Freeman.
- <sup>57</sup> B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Essential Cell Biology*, **2004**, Garland Science.
- <sup>58</sup> E. Nogales, *Cellular and Molecular Life Science*, **1999**, 56, 133-142.
- <sup>59</sup> C. Waterman-Storer, E. D. Salmon, *Current Biology*, **1997**, 7, R369-R372.
- <sup>60</sup> T. J. Mitchison, *The Journal of Cell Biology*, **1989**, 109, 637-652.
- <sup>61</sup> S. Gadde, R. Heald, *Current Biology*, **2004**, 14, R797-R805.
- <sup>62</sup> H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell, *Molekulare Zellbiologie*, **1996**, 2. Auflage, de Gruyter.
- <sup>63</sup> K. Kinoshita, B. Habermann, A. A. Hyman, *Trends in Cell Biology*, **2002**, 12(6), 267-273.
- <sup>64</sup> N. M. Rusan, C. J. Fagerstrom, A.-M. C. Yvon, P. Wadsworth, *Molecular Biology of the Cell*, **2001**, 12, 971-980.
- <sup>65</sup> J. L. Ross, C. D. Santangelo, V. Makrides, D. Kushnir Fygenon, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2004**, 101(35), 12910-12915.
- <sup>66</sup> B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molekularbiologie der Zelle*, **2004**, 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- <sup>67</sup> A. W. Hunter, L. Wordeman, *Journal of Cell Science*, **2000**, 113, 4379-4389.
- <sup>68</sup> J. A. Hadfield, S. Ducki, N. Hirst, A. T. McGown, *Progress in Cell Cycle Research*, **2003**, 5, 309-325.

- <sup>69</sup> J. L. Ross, D. Kuchnir Fygenson, *Biophysical Journal*, **2003**, *84*, 3959-3967.
- <sup>70</sup> J. F. Diaz, J. Valpuesta, P. Chacón, G. Diacun, J. M. Andreu, *The Journal of Biological Chemistry*, **1998**, *273(50)*, 33803-33810.
- <sup>71</sup> W. D. Howard, S. N. Timasheff, *The Journal of Biological Chemistry*, **1988**, *263(3)*, 1342-1346.
- <sup>72</sup> R. B. Dye, S. P. Fink, R. C. Williams, *The Journal of Biological Chemistry*, **1993**, *268(10)*, 6847-6850.
- <sup>73</sup> H. Felgner, R. Frank, M. Schliwa, *Journal of Cell Science*, **1996**, *109*, 509-516.
- <sup>74</sup> M. Schliwa, G. Woehlke, *Nature*, **2003**, *422*, 759-765.
- <sup>75</sup> C. J. Lawrence, R. K. Dawe, K. R. Christie, D. W. Cleveland, S. C. Dawson, S. A. Endow, L. S. B. Goldstein, H. V. Goodson, N. Hirokawa, J. Howard, R. L. Malmberg, J. R. McIntosh, H. Miki, T. J. Mitchison, Y. Okada, A. S. N. Reddy, W. M. Saxton, M. Schliwa, J. M. Scholey, R. D. Vale, C. E. Walczak, L. Wordeman, *The Journal of Cell Biology*, **2004**, *167(1)*, 19-22.
- <sup>76</sup> R. H. Wade, F. Kozielski, *Nature Structural Biology*, **2000**, *7(6)*, 456-460.
- <sup>77</sup> M. Schliwa, *Molecular Motors*, **2003**, Wiley-VCH.
- <sup>78</sup> W. R. Schief, J. Howard, *Current Opinion in Cell Biology*, **2001**, *13*, 19-28.
- <sup>79</sup> S. A. Endow, *Nature Cell Biology*, **1999**, *1*, E163-E167.
- <sup>80</sup> Y. Okada, N. Hirokawa, *Science*, **1999**, *283*, 1152-1157.
- <sup>81</sup> W. O. Hancock, J. Howard, *The Journal of Cell Biology*, **1998**, *140(6)*, 1395-1405.
- <sup>82</sup> W. O. Hancock, J. Howard, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1999**, *96(23)*, 13147-13152.
- <sup>83</sup> L. Romberg, D. W. Pierce, R. D. Vale, *The Journal of Cell Biology*, **1998**, *140(6)*, 1407-1416.
- <sup>84</sup> Y. Okada, N. Hirokawa, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2000**, *97*, 640-654.
- <sup>85</sup> J. Howard, *Nature*, **1997**, *389*, 561-657.
- <sup>86</sup> K. S. Thorn, J. A. Ubersax, R. D. Vale, *The Journal of Cell Biology*, **2000**, *151(5)*, 1093-1100.
- <sup>87</sup> D. L. Coy, M. Wagenbach, J. Howard, *The Journal of Biological Chemistry*, **1999**, *274(6)*, 3667-3671.
- <sup>88</sup> E. P. Sablin, R. J. Fletterick, *The Journal of Biological Chemistry*, **2004**, *279(16)*, 15707-15710.

- <sup>89</sup> J. Howard, *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*, **2001**, Sinauer Associates, Inc..
- <sup>90</sup> E. C. Young, H. K. Mahtani, J. Gelles, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 3467-3479.
- <sup>91</sup> D. G. Cole, W. M. Saxton, K. B. Sheehan, J. M. Scholey, *The Journal of Biological Chemistry*, **1994**, *269*(37), 22913-22916.
- <sup>92</sup> N. Hirokawa, *Science*, **1998**, *279*, 519-526.
- <sup>93</sup> T. M. Kapoor, T. J. Mitchison, *The Journal of Cell Biology*, **2001**, *154*(6), 1125-1133.
- <sup>94</sup> D. J. Sharp, K. L. McDonald, H. M. Brown, H. J. Matthies, C. Walczak, R. D. Vale, T. J. Mitchison, J. M. Scholey, *The Journal of Biochemical Chemistry*, **1999**, *144*(1), 125-138.
- <sup>95</sup> A. S. Kashina, R. J. Baskin, D. G. Cole, K. P. Wedaman, W. M. Saxton, J. M. Scholey, *Nature*, **1996**, *379*, 270-272.
- <sup>96</sup> L. C. Kapitein, E. J. G. Peterman, B. H. Kwok, J. H. Kim, T. M. Kapoor, C. F. Schmidt, *Nature*, **2005**, *435*, 114-118.
- <sup>97</sup> K. E. Sawin, K. LeGuellec, M. Philippe, T. J. Mitchison, *Nature*, **1992**, *359*, 540-543.
- <sup>98</sup> C. E. Walczak, T. J. Mitchison, *Cell*, **1996**, *85*, 943-946.
- <sup>99</sup> D. Miyamoto, Z. E. Perlman, K. S. Burbank, A. C. Groen, T. J. Mitchison, *The Journal of Cell Biology*, **2004**, *167*(5), 813-818.
- <sup>100</sup> B. H. Kwok, J. G. Yang, T. R. Kapoor, *Current Biology*, **2004**, *14*, 1783-1788.
- <sup>101</sup> T. U. Mayer, T. M. Kapoor, S. J. Haggarty, R. W. King, A. L. Schreiber, T. J. Mitchison, *Science*, **1999**, *286*, 971-974.
- <sup>102</sup> A. Lockhart, R. A. Cross, *Biochemistry*, **1996**, *35*, 2365-2373.
- <sup>103</sup> I. M.-T. C. Crevel, A. Lockhart, R. A. Cross, *Journal of Molecular Biology*, **1997**, *273*, 160-170.
- <sup>104</sup> Y. Yan, V. Sardana, B. Xu, C. Homnick, W. Halczenko, C. A. Buser, M. Schaber, G. D. Hartman, H. E. Huber, L. C. Kuo, *Journal of Molecular Biology*, **2004**, *335*, 547-554.
- <sup>105</sup> S. DeBonis, J.-P. Simorre, I. Crevel, L. Lebeau, D. A. Skoufias, A. Blangy, C. Ebel, P. Gans, R. Cross, D. D. Hackney, R. H. Wade, F. Kozielski, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 338-349.
- <sup>106</sup> L. Luo, J. D. Carson, D. Dhanak, J. R. Jackson, P. S. Huang, Y. Lee, R. Sakowicz, R. A. Copeland, *Biochemistry*, **2004**, *43*, 15258-15266.
- <sup>107</sup> F. Köhn, *Diplomarbeit*, Universität Heidelberg, **1998**.
- <sup>108</sup> J.J. Yeh, I. Lindau, *Atomic Data and Nuclear Data Tables*, **1985**, *32*, 1.
- <sup>109</sup> D. A. Shirley, *Physical Review B*, **1972**, *5*, 4709.
- <sup>110</sup> S. Tougaard, *Surface Science*, **1989**, *216*, 343.



- <sup>111</sup> *dtv-Atlas zur Physik*, Deutscher Taschenbuch Verlag, München, **1987**.
- <sup>112</sup> W. Göpel, C. Ziegler, *Struktur der Materie: Grundlagen, Mikroskopie und Spektroskopie*, Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig, **1994**.
- <sup>113</sup> C. Seelhuber, *Dissertation*, in Arbeit.
- <sup>114</sup> M. Wilchek, E. A. Bayer, *Methods in Enzymology*, **1990**, 184.
- <sup>115</sup> L. Häußling, B. Michel, H. Ringsdorf, H. Rohrer, *Angewandte Chemie*, **1991**, 103, 568-572.
- <sup>116</sup> Uta Wattendorf, *Diplomarbeit*, Universität, **2002**.
- <sup>117</sup> Holleman Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, **1985**, 91.-100. Auflage, 1022.
- <sup>118</sup> M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kantlehner, H. Kessler, J. P. Spatz, *ChemPysChem*, **2004**, 5(3), 383-388.
- <sup>119</sup> E. A. Cavalcanti-Adam, *Dissertation*, Universität Heidelberg, **2005**.
- <sup>120</sup> M. F. Stock, J. Chu, D. D. Hackney, *The Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278(52), 52315-52322.
- <sup>121</sup> K. J. Böhm, R. Stracke, E. Unger, *Cell Biology International*, **2000**, 24(6), 335-341.
- <sup>122</sup> K. Shiroguchi, M. Ohsugi, M. Edamatsu, T. Yamamoto, Y. Y. Toyoshima, *The Journal of Biological Chemistry*, **2003**, 278(25), 22460-22465.
- <sup>123</sup> T. M. Kapoor, T. U. Mayer, M. L. Coughlin, T. J. Mitchison, *The Journal of Cell Biology*, **2000**, 150(5), 975-988.