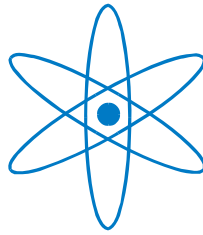


PHYSIK-DEPARTMENT



Zur Lehre von Grenzflächen und
von der Wirkung der Salze

Dissertation

von

Tobias Pirzer



TECHNISCHE UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Physik-Department Lehrstuhl für Biophysik E22
und
Institut für Medizintechnik

Zur Lehre von Grenzflächen und von der Wirkung der Salze

Tobias Pirzer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

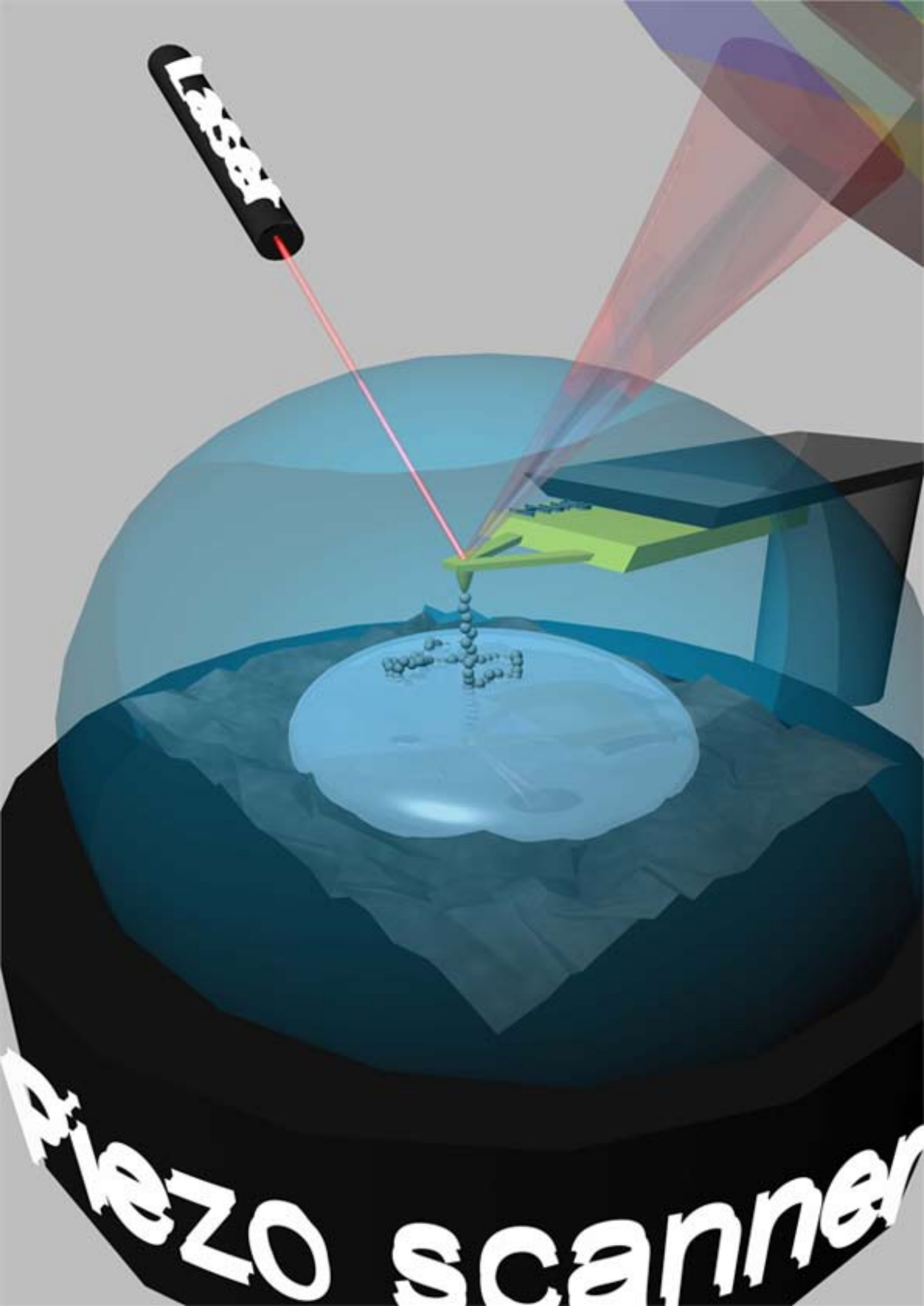
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ralf Metzler

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Thorsten Hugel
2. Univ.-Prof. Dr. Peter Müller-Buschbaum

Die Dissertation wurde am 16.08.2010 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 11.10.2010 angenommen.



*„Geschrieben steht: Im Anfang war
der Sinn. Bedenke wohl die erste
Zeile, dass deine Feder sich nicht
übereile! Ist es der Sinn, der alles
wirkt und schafft? Es sollte stehn:
Am Anfang war die Kraft!“*

Goethe, Faust I

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
2 Theorie	6
2.1 Grundlegende Konzepte für zwischenmolekulare Kräfte	6
2.2 Thermodynamische Grundlagen	10
2.3 Molekulardynamik Simulationen	16
2.4 Gerichtete Kräfte	18
2.5 Ungerichtete Kräfte	20
2.6 Hofmeistereffekt	28
2.7 Strukturkräfte	30
2.8 Die Beschreibung von Federn	33
3 Experimentelle Methoden und Material	38
3.1 Das Atomare Kraftmikroskop AFM	38
3.2 Grenzflächen und deren Eigenschaften	50
3.3 Biopolymere	55
3.4 Chemische Modifikation von Blattfedern	57
4 Adhäsion und Hofmeistereffekte	59
4.1 Ionenspezifische Effekte	59
4.2 Einfluss der Kettenpolarität	65
5 Grenzflächen	69
5.1 Grenzflächenabhängigkeit der Adhäsion	69
5.2 Effekt des Lösungsmittels	72
6 Umgebungssensitive Grenzflächen	74
6.1 Festkörpergebundene Polymerbrushes	74

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	iii
6.2 Freistehende Polymerbrushes: Polymerteppiche	78
7 Diskussion	81
7.1 Hydrophobe Adhäsion von einzelnen Polymeren	81
7.2 Hydrophobes Wasser - Der Einfluss der Hydratationsschicht . .	91
7.3 Umgebungssensitive Grenzflächen	96
8 Ausblick	100
Anhang	102
A Detaillierte Protokolle	102
B Adhäsion auf Filmen und Kristallen	107
C Bau eines AFMs für weitere Experimente	112
Literaturverzeichnis	114
Danksagung	128

Zusammenfassung

*Das ist also des Pudels Kern.
(Goethe in Faust I)*

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts war es Franz Hofmeister, der als erster erkannt hat wie essentiell Wasser und womöglich dessen Struktur für die Adhäsion von Proteinen ist [1]. Bis heute wird der Einfluss von verschiedenen wässrigen Salzlösungen, der *Hofmeistereffekt*, intensiv untersucht und debattiert, wobei seine Veröffentlichungen unter dem Titel „Zur Lehre von der Wirkung der Salze“ [1] als wichtige Grundlage verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht welche Wirkung der Hofmeistereffekt auf die Adhäsion einzelner Polymere in wässriger Umgebung an Grenzflächen zeigt und wie die Hydratstruktur an hydrophoben Grenzflächen darauf Einfluss nimmt.

Zur Bestimmung der Adhäsionskräfte wurden das atomare Kraftmikroskop (AFM) und speziell entwickelte Einzelmolekülsonden verwendet. Die Sonden bestehen aus typischen AFM-Blattfedern, an deren Oberfläche einzelne Biopolymere kovalent gebunden sind. Diese Polymere werden schließlich an die Substratoberfläche gebracht um dort zu adhären. Der Messprozess selber wird als Desorption bezeichnet bei dem ein einzelnes Biopolymer von einer festen Oberfläche oder einer Grenzfläche abgelöst wird. Dabei bilden sich Kraftplateaus in der Kraft-Abstandskurve die auf eine hohe planare Mobilität hinweisen; hohe Mobilität bedeutet in diesem Zusammenhang, dass bei der Bewegung eines Biopolymers parallel zur Oberfläche in sehr guter Näherung keine Reibung auftritt.

Der größte Fehler in der Kraftplateauhöhe entsteht bei der Bestimmung der Federkonstante. Deren Messung konnte im Rahmen dieser Arbeit insbesondere für viskose Lösungen optimiert werden.

Dies war essentiell, da der Hofmeistereffekt für Biopolymere auf hydrophoben Oberflächen erst für relativ hohe Salzkonzentrationen, mit erhöhter Viskosität,

zu erkennen ist. Für chaotrope Salze wurde eine nahezu konstante Adhäsionskraft gemessen, die für kosmotrope Salze bei hohen Konzentrationen linear ansteigt. Dies ist konsistent mit einem Modell für die Desorption das die Oberfläche mit Biopolymer als Monomerreservoir betrachtet aus dem Aminosäuren in Lösung gebracht werden. Weiterhin, in Übereinstimmung mit der Literatur, erhöhen kosmotrope Salze die Transferenergie eines Monomers linear, wohingegen sie durch chaotrope Salze konstant gehalten oder sogar erniedrigt wird. Erstaunlich war, dass „gleiches liebt gleiches“ nicht immer gilt. Die Hydrophobizität der verwendeten Polymere beeinflusst die Adhäsionskraft kaum; dasselbe gilt für die Hydrophobizität von Oberflächen. Als Ursache wird ein Kompensationsmechanismus vorgeschlagen, der dafür sorgt, dass sich die Wechselwirkungen zwischen Salz & Oberfläche, Wasser & Oberfläche und Polymer & Oberfläche nahezu kompensieren. Unterstützt wird diese Vorstellung durch aktuelle Molekulardynamik-Simulationen [2].

Um diesen Mechanismus eingehender zu testen wurden die Desorptionmessungen auf Luft-Wasser-Grenzflächen und Chloroform-Wasser-Grenzflächen ausgedehnt, so dass ein größtmöglicher Bereich der Grenzflächenenergie abgedeckt wurde. Das Ergebnis war, dass sich die Adhäsionskraft wiederum kaum ändert, in guter Näherung sogar konstant blieb. Erst durch die Verwendung von Wasser-Ethanol-Mischungen war es möglich die Adhäsionskraft um bis zu 70% zu verringern.

Die Adhäsionsenergie pro Monomer, errechnet aus der Adhäsionskraft, entspricht im Wesentlichen der Energie die man benötigt um ein Monomer in Lösung zu bringen, und nicht der Grenzflächenenergie. Somit ist die Desorption eines Polymers ein gutes Modellsystem zur Messung der Lösungsenergie von Polymeren und Proteinen.

Kapitel 1

Einleitung

*Eine lange Reise beginnt mit dem ersten Schritt.
(Laotse)*

Grenzflächen sind in der Natur und für die Industrie von zentraler Bedeutung. Zellen und deren Organellen zum Beispiel sind durch Grenzflächen (Membranen) abgeschlossene Kompartimente, die sich auf Grund des hydrophoben Effektes selbstständig bilden [3]; dabei spielt die Wechselwirkung von Proteinen mit den Membranen eine außerordentliche Rolle [4]. Auf der anderen Seite gibt es viele Materialien die spezielle Beschichtungen tragen, wie zum Beispiel medizinische Implantate. Diese Beschichtungen sind dabei so gewählt, dass die Haftung von Proteinen minimiert wird; Infektionen beginnen in der Regel mit der Anhaftung von Proteinen aus dem Blutplasma auf den Implantaten worauf wiederum Bakterien wachsen können und schließlich einen Biofilm bilden [5, 6]. Trotz allem muss die Beschichtung von medizinischen Materialien biokompatibel sein. Ein vielversprechendes Beispiel hierfür sind Spinnenseiden [7].

Die Hafteigenschaften sind im molekularen Maßstab nur ungenügend verstanden, da es bis vor kurzem noch keine zerstörungsfreien, quantitativen Verfahren zum Test von Haftung auf Beschichtungen und Biomaterialien gab. In den letzten Jahren wurde eine Methode entwickelt die auf der AFM-Kraftspektroskopie basiert [8, 9, 10]. Es ist nun möglich die Haftung von einzelnen (Bio-)Polymeren an Grenzflächen zu bestimmen und daraus die freie Energie der Haftung abzuleiten [11, 12]. Der elektrostatische Einfluss ist schon gut verstanden, aber Lösungsmittelleffekte wie der hydrophobe Effekt und der Einfluss von Kosoluten werden immer noch debattiert [11, 13, 10].

Der Ausdruck *Hydrophobizität* wird verwendet um Kräfte zu beschreiben die

zwischen allen unpolaren Objekten in Wasser auftreten [14]; es muss aber dabei zwischen kleinen und großen Objekten unterschieden werden [15], da das bekannte Bild einer steifen eisartigen *Klathratstruktur* aber für größere Festkörperoberflächen oder Grenzflächen aus geometrischer Sicht nicht plausibel ist [15]. In allen bekannten Systemen werden hydrophobe Wechselwirkungen durch Wasser vermittelt und führen letzten Endes zu einer Aggregation der beteiligten unpolaren Objekte [16, 17]. Diese Aggregation ist von der Art des Salzes (bekannt als *Hofmeistereffekt*) [18, 19], der Konzentration an Koluten [20, 21] und des pH-Wertes [22, 23] abhängig.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die experimentelle Untersuchung der Haftungseigenschaften von verschiedenen Biopolymeren wie einem künstlichen Spinnenseidenprotein, Poly-D-Tyrosin und Poly-L-Lysin und umgebungssensitiven Polymerbrushes. Die Haftung wird dabei als Modellsystem für das Lösen von Polymeren und Proteinen verwendet.

Nach einer kleinen Einführung in die theoretischen Grundlagen über Thermodynamik und molekulare Kräfte (Kapitel 2) folgt eine Übersicht der Methodik und den verwendeten Materialien (Kapitel 3). In diesem Kapitel befindet sich auch ein besonderer Schwerpunkt auf der Kalibrierung eines Kraftspektrometers mit Hilfe eines weiterentwickelten Modells.

Im Anschluss (Kapitel 4) wird gezeigt, welchen Einfluss Ionen auf die Haftung eines einzelnen Spinnenseidenproteins an hydrophoben Oberflächen haben. Außerdem wird gezeigt wie stark die Hydrophobizität des Biopolymers auf die Haftung wirkt.

Weiterhin wird die Messung auf unterschiedlich hydrophobe Oberflächen erweitert (Kapitel 5). Vor allem auch, weil an dieser Stelle Experimente gezeigt werden die auf eine getrennte Behandlung von fest-flüssig-, flüssig-flüssig- und gasförmig-flüssig-Grenzflächen verzichtet; denn allein durch die Messung der Haftkraft ist keine Unterscheidung möglich.

Es wäre nun auch interessant die hydrophoben Eigenschaften von Grenzflächen gezielt zu verändern. Hierfür bieten sich umgebungssensitive Oberflächen in Form von Polymerbrushes an. Diese intelligenten Oberflächen werden charakterisiert (Kapitel 6), da man sie von einer *wasserliebenden* hydrophilen Oberfläche reversibel in eine *wasserhassende* hydrophobe Oberfläche umwandeln kann; der Auslöser für den zu Grunde liegenden Mechanismus ist ein einfacher externer Stimulus, die Temperatur.

Gegen Ende wird versucht ein ungefähres Bild von der hydrophoben Haftung zu schaffen, wobei ein Mechanismus vorgeschlagen wird in dem sich die betei-

ligten Wechselwirkungen nahezu kompensieren (Kapitel 7). Daraus entwickelt sich letztendlich eine Vorstellung über den genauen Abstand eines Polymers senkrecht zur hydrophoben Grenzfläche.

Kapitel 2

Theorie

Es gibt nichts Praktischeres als eine gute Theorie!
(Kurt Lewin)

2.1 Grundlegende Konzepte für zwischenmolekulare Kräfte

Das Phänomen der Haftung tritt sowohl im Mikroskopischen als auch im Makroskopischen auf. Es ist deshalb von Vorteil ein grundlegendes Konzept zu besitzen das für jede Größenordnung gilt [24].

Sind zwei Körper A und B in Kontakt muss eine Arbeit ΔW aufgewendet werden, um die beiden voneinander zu trennen. Bestehen die Körper aus unterschiedlichem Material spricht man von *Adhäsionsarbeit* W_{AB} bzw. von *Kohäsionsarbeit* W_{AA} , falls sie aus demselben Material bestehen. Abbildung 2.1 zeigt eine Übersicht von verschiedenen Oberflächenenergien.

2.1.1 Oberflächenenergie

Das Trennen der beiden Körper ist äquivalent mit der Erzeugung von zwei neuen Einheitsflächen im Vakuum wofür eine Energie γ pro Einheitsfläche, die *Oberflächenenergie*, aufgewendet werden muss. Es gilt dabei

$$W_{AA} = 2\gamma_A \text{ bzw. } W_{AB} = \gamma_A + \gamma_B. \quad (2.1)$$

Die absolute Arbeit W_{AA} entspricht dabei der zweifachen Oberflächenenergie γ pro Einheitsfläche (Abbildung 2.1(b)) bzw. W_{AB} der Summe aus den Oberflächenenergien pro Einheitsfläche der Körper A und B (Abbildung 2.1(a)).

Dies kann natürlich auch auf flüssige Oberflächen angewendet werden, ohne dass sich an der Beschreibung etwas ändert (Abbildung 2.1(b)).

2.1.2 Grenzflächenenergie

Befinden sich zwei Körper aus dem Material A in einer Flüssigkeit B so ergibt sich beim Trennen der Körper (Abb. 2.1(d)) folgende Gleichung für die sogenannte *Grenzflächenenergie* γ_{AB} :

$$\gamma_{AB} = \gamma_A + \gamma_B - W_{AB} \quad (2.2)$$

Dieser Prozess lässt sich dabei in zwei hypothetische Schritte aufteilen: zuerst erzeugt man je zwei Einheitsflächen und bringt sie anschliessend in Kontakt. Die sich ergebende Gleichung für die Energie wird auch als Dupré-Gleichung bezeichnet. Für den allgemeineren Fall zweier Körper A und B in einer Flüssigkeit C (Abbildung 2.1(e)) muss man nur die einzelnen Energiebeiträge summieren:

$$W_{ACB} = W_{AB} + W_{CC} - W_{AC} - W_{BC} = \gamma_{AC} + \gamma_{BC} - \gamma_{AB} \quad (2.3)$$

2.1.3 Diskretisierung der Grenzflächenenergie

Die Einheitsfläche wird nun so klein gewählt, daß pro Einheitsfläche nur eine Bindung während eines Kontaktes möglich ist. Es seien nun Partikel A in einem Medium aus Partikeln B gelöst (Abbildung 2.2). Für die Wechselwirkungsenergie oder auch Adhäsionsarbeit ergibt sich

$$\Delta W = W_{AA} + W_{BB} - 2W_{AB}. \quad (2.4)$$

Die Wechselwirkungsenergien können nun in guter Näherung proportional zu einer molekularen Eigenschaft A oder B eines Partikels angenommen werden. Es gilt nun folgende Notation:

$$W_{AA} = -A^2 \quad W_{BB} = -B^2 \quad W_{AB} = -AB \quad (2.5)$$

Die Richtigkeit dieser Annahme kann im Abschnitt 2.4.1 über van der Waals-Kräfte überprüft werden. Wird nun Gleichung 2.4 durch diese Notation angepasst ergibt sich

$$\Delta W = -A^2 - B^2 + 2AB = -(A - B)^2 \quad (2.6)$$

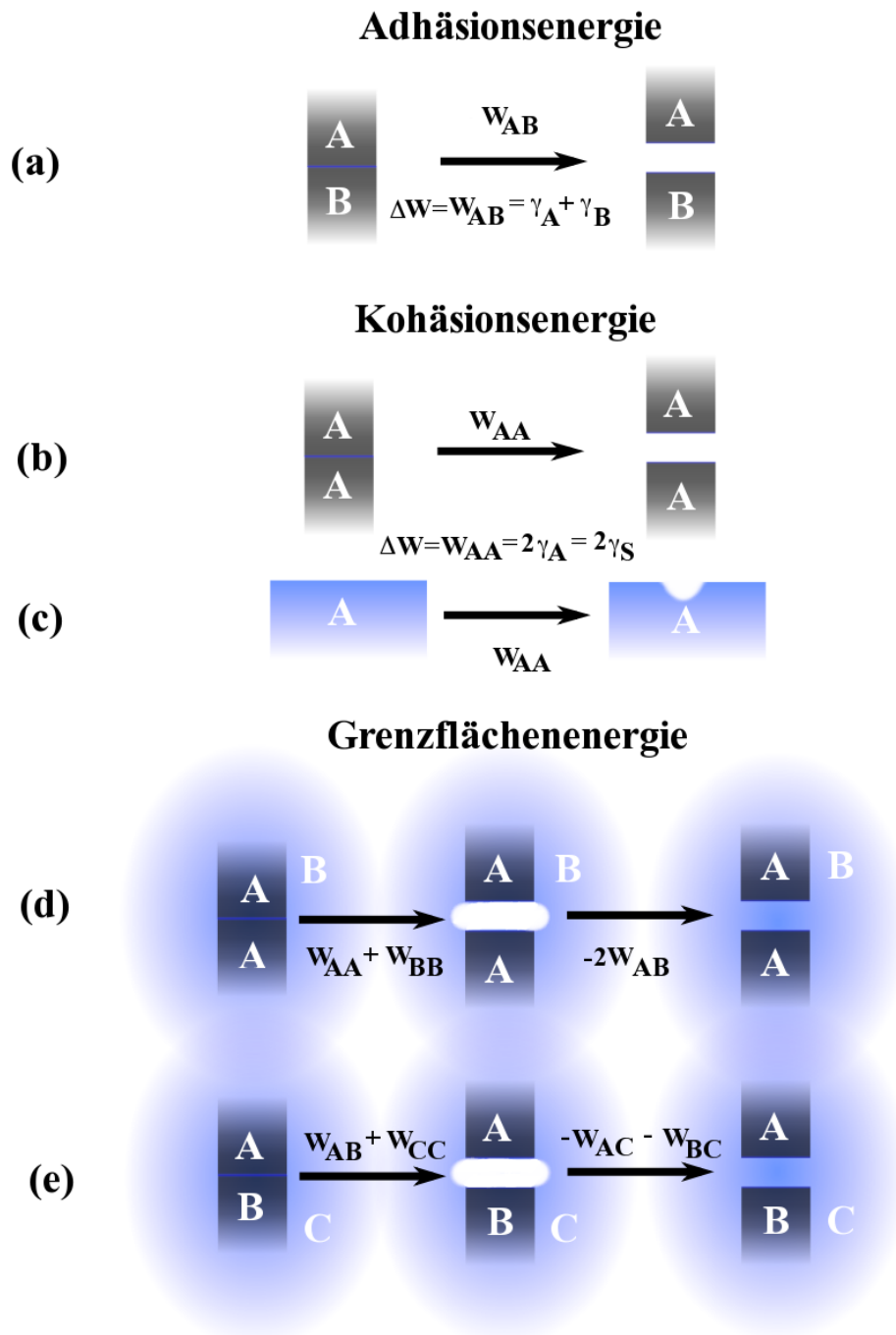


Abbildung 2.1: Übersicht der Oberflächenenergien. (a) Der allgemeine Fall, die Adhäsionsenergie, für zwei unterschiedliche Körper, (b) der Spezialfall der Kohäsionsenergie für zwei gleichartige Körper, (c) die Energie einer neu erzeugten Oberfläche wird, ebenfalls Kohäsionsenergie genannt, (d-e) bei der Erzeugung von Ober- bzw. Grenzflächen in flüssigem Medium wird die nötige Energie im Allgemeinen als Grenzflächenenergie bezeichnet

oder für n Bindungen

$$\Delta W = -n(A - B)^2. \quad (2.7)$$

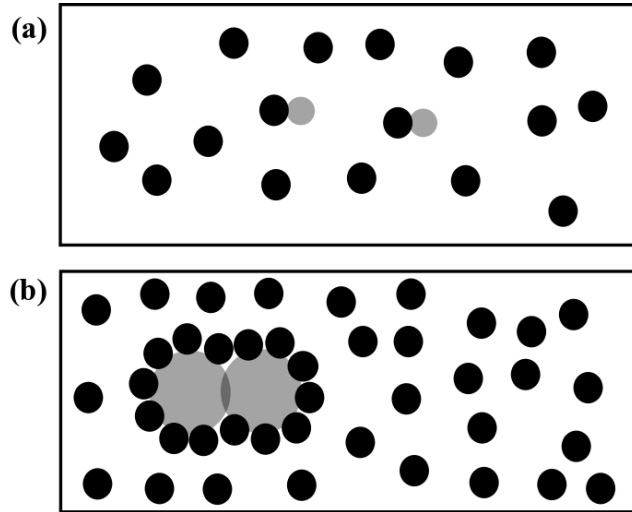


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Wechselwirkung mikroskopischer Partikel. Partikel A (grau) sind in einer Lösung aus Partikeln B (schwarz) gelöst. Die Einheitsfläche ist so klein, dass nur eine diskrete Bindung möglich ist. (a) Partikel A und B haben dieselbe Größe und (b) Partikel A (grau) sind sehr viel größer als Partikel B (schwarz).

Wendet man nun die Gleichungen 2.1 und 2.2 auf Gleichung 2.4 an findet man einen Ausdruck der in guter Näherung die Grenzflächenenergie durch die Oberflächenenergien der einzelnen Partikel oder Körper beschreibt:

$$\gamma_{AB} = \gamma_A + \gamma_B - 2\sqrt{\gamma_A\gamma_B} = (\sqrt{\gamma_A} - \sqrt{\gamma_B})^2. \quad (2.8)$$

2.1.4 Benetzung von Oberflächen

Der Fall einer makroskopischen Oberfläche in Kontakt mit einer Flüssigkeit ist eine anschauliche Anwendung für die aufgeführten Konzepte. Ein Festkörper A stehe in Kontakt mit einem Medium C, das gasförmig oder flüssig sein kann (Abbildung 2.3). Setzt man nun eine Flüssigkeit B an die Grenzfläche zwischen A und C (Abbildung 2.3) und die totalen Grenzflächenenergien des Systems sind im Minimum, dann lässt sich für den Kontaktwinkel des sich bildenden Tropfen folgende Gleichung angeben [24]:

$$\cos \theta = (C + B - 2A)/(C - B), \quad (2.9)$$

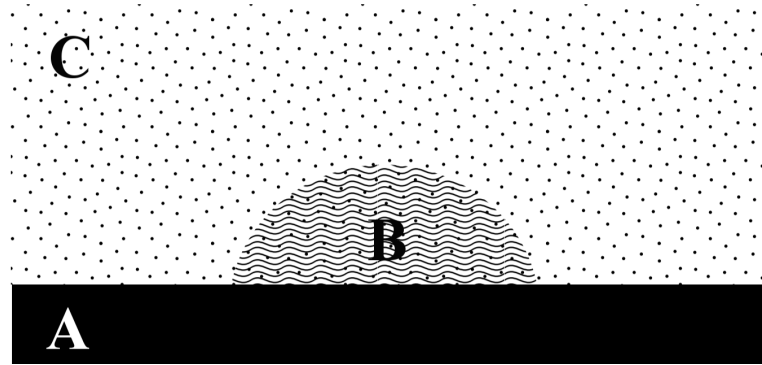


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung für die Benetzung einer Festkörperoberfläche. Eine Flüssigkeit B ist in Kontakt mit einem Festkörper A in einem Medium C; C kann dabei gasförmig oder flüssig sein, mischt sich aber nicht mit B.

wobei Notation 2.5 verwendet wurde. Befindet sich A nun intermediär zwischen B und C kann 2.9 umgeschrieben werden in

$$\gamma_{AB} + \gamma_{BC} \cos \theta = \gamma_{AC} \quad \text{Young Gleichung} \quad (2.10)$$

$$\gamma_{BC}(1 + \cos \theta) = \Delta W_{ABC} \quad \text{Young-Dupré Gleichung.} \quad (2.11)$$

Dabei ist ΔW_{ABC} die Adhäsionsenergie pro Einheitsfläche für die Medien A und B im Medium C.

2.2 Thermodynamische Grundlagen

2.2.1 Die Zustandssumme

Biologische oder chemische Systeme stellen in der Regel keine isolierten Systeme dar, da Energie- und/oder Teilchenaustausch stattfinden kann. Sie lassen sich am besten durch die beiden thermodynamischen Potentiale der *Helmholtz freien Energie* und der *Gibbs freien Energie* beschreiben. Beide Energien lassen sich aus der sogenannte Zustandssumme ableiten.

Die mikroskopische Konfiguration eines Systems wird Mikrozustand genannt. Für klassische Systeme ist ein Mikrozustand durch die Position und die Impulse der einzelnen Teilchen definiert. Die Summe alle Mikrozustände nennt man die Zustandssumme \mathcal{Z} . Da nicht alle Variablen eines Systems konstant gehalten werden können ist es nicht möglich eine konstante Energie E des Systems zu definieren. Für die Zustandssumme ergibt sich nach dem Boltzmanngesetz [25]

$$\mathcal{Z} = \sum_i \exp \left[\frac{E_i}{k_B T} \right]. \quad (2.12)$$

2.2.2 Die freie Energie

Die Helmholtz freie Energie A , auch als freie Energie bezeichnet, ist ein sogenanntes (N, V, T) -System, mit der Teilchenzahl N , dem Volumen V und der Temperatur T als gegebene Parameter. Die Energie der Mikrozustände ist dabei die totale innere Energie des Systems U , d. h. $E = U$. Die Definition der freien Energie [25] lautet

$$A = U - TS, \quad (2.13)$$

womit sich für die Änderung der freien Energie dA bei Änderung von dessen Parametern folgender Ausdruck ergibt:

$$dA = -SdT - pdV + \mu dN. \quad (2.14)$$

Hierbei sind S die Entropie, p der Druck und μ das chemische Potential des Systems. Die Verbindung der freien Energie mit der Zustandssumme lautet

$$A = -k_B T \ln \mathcal{Z}_A. \quad (2.15)$$

2.2.3 Die freie Enthalpie

Die Gibbs freie Energie G , auch als freie Enthalpie oder Gibbs-Energie bezeichnet, ist ein sogenanntes (N, p, T) -System, mit der Teilchenzahl N , dem Druck p und der Temperatur T als gegebene Parameter. Die Energie der Mikrozustände ist dabei die Enthalpie des Systems H , d. h. $E = H$. Die Definition der Gibbs-Energie [25] lautet

$$G = H - TS, \quad (2.16)$$

wobei $H = U - pV$ gilt. Für die Änderung der freien Enthalpie dG bei Änderung der gegebenen Parameter ergibt sich

$$dG = -SdT + Vdp + \mu dN. \quad (2.17)$$

Auch hier gilt für die Verbindung der Gibbs-Energie mit der Zustandssumme

$$G = -k_B T \ln \mathcal{Z}_G. \quad (2.18)$$

2.2.4 Die Desorptionsenergie

Es stellt sich nun die Frage welches thermodynamisches Potential für das untersuchte System, ein an eine Blattfeder kovalent gebundenes Polymer das mit

einer hydrophoben Grenzfläche wechselwirkt, zu verwenden ist. Im Allgemeinen sind die Zustandssummen nicht identisch, weshalb die daraus abgeleiteten Energien unterschieden werden müssen.

Nach Kreuzer et al. [26] ist bei der Streckung eines Polymers zu berücksichtigen welche Federkonstante k die benutzte Blattfeder aufweist, die das Verhalten eines Polymers beeinflusst. So kann z. B. für eine weiche Blattfeder deren Einfluss vernachlässigt und das gebundene Polymer als frei beschrieben werden. Für die Grenzfälle ergeben sich bei einer steifen Blattfeder $k \rightarrow \infty$ die freie Energie und bei einer weichen Blattfeder $k \rightarrow 0$ die Gibbs-Energie. Die in dieser Arbeit verwendeten Blattfedern entsprechen natürlich nicht den idealen Grenzfällen, sie sind aber weich genug, damit die Gibbs-Energie G in guter Näherung als thermodynamisches Potential verwendet werden kann.



Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Desorption von Polymeren auf einem Substrat.

Während des Prozesses einer Desorption kann man nun drei Abschnitte unterscheiden:

- Beim Zeitpunkt $t = 0$, an dem die desorbierte Länge $L_{des} = 0$ beträgt. Hier kann die Polymerkette durch die Gibbs-Energie G_{ade} beschrieben werden, da sie auf der Oberfläche als freies, zweidimensionales statistisches Knäuel vorliegt. Die Polymerkette befindet sich dabei in einem Oberflächenpotential ΔG_{hydro} , der hydrophoben Gibbs-Adsorptionsenergie, bezogen auf die Energie im Volumen (Gleichungen 2.19).
- Beim Zeitpunkt $t > 0$, solange die desorbierte Länge L_{des} kleiner als die maximale Länge L_{max} ist. Die maximale Länge ist dabei die gemessene Plateaulänge im Experiment und nicht die Gesamtlänge des Polymers L_C (auch *Konturlänge*), wobei gilt $L_{max} < L_C$. Die Ursache hierfür ist die thermische Desorption, die neben der mechanischen Desorption mit

dem AFM für das Ablösen des Polymers von der Oberfläche sorgt [27]. Die Beschreibung erfolgt durch die Desorptionsenergie G_{des} (Gleichung 2.21).

- Nach der Desorption ist das Polymer unbeeinflusst durch die Blattfeder und liegt als freies, dreidimensionales statistisches Knäuel vor; es gilt die Gibbs-Energie G_{sol} (Gleichung 2.20).

Die Gibbs-Energien für die ungestörten Zustände - adsorbiert auf der Oberfläche und in Lösung - kann man abschätzen, indem man das *freely jointed chain (FJC)* Modell verwendet und somit die zweidimensionale (Oberfläche) und die dreidimensionale (Lösung) Kettenentropie aus der Zustandssumme berechnen kann [27]. Der größte Anteil an der Gibbs-Energie, die hydrophobe Gibbs-Adsorptionsenergie ΔG_{hydro} , bleibt dabei noch ungeklärt.

$$G_{ade} \approx -N^{(ade)} k_B T \ln 2\pi - \frac{N^{(ade)}}{N} \Delta G_{hydro} \quad (2.19)$$

$$G_{sol} \approx -N^{(sol)} k_B T \ln 4\pi \quad (2.20)$$

Es gilt hierbei für die Anzahl der Monomere $N^{ade} = L_C/L_K^{ade}$ und $N^{sol} = L_C/L_K^{sol}$, wobei L_K die Kuhnlänge (die effektive Monomerlänge) des Polymers auf der Oberfläche (Index *ade*) bzw. in Lösung (Index *sol*) ist.

Die geleistete Desorptionsarbeit entspricht hier der Gibbs-Energie während des Desorptionsprozesses

$$G_{des} = G_{ade} + F_{des} L_{des}, \quad (2.21)$$

wobei G_{ade} die freie Energie des noch auf der Oberfläche adsorbierten Polymers ist (Gleichung 2.19), F_{des} die Desorptionskraft und L_{des} die desorbierte Länge. Dabei ist $G_{ade} = G_{ade}(\Delta G_{hydro}, N^{ade})$ eine Funktion der hydrophoben Adsorptionsenergie ΔG_{hydro} und der Anzahl der Monomere auf der Oberfläche N^{ade} und die Desorptionslänge $L_{des} = L_{des}(N^{ade})$ ist ebenfalls eine Funktion der Anzahl der Monomere auf der Oberfläche N^{ade} . Die gemessene Kraft bleibt während der Desorption konstant, was auf einen *Steady State-Prozess* deutet. Somit ändert sich die Gibbs-Energie linear mit der desorbierten Länge.

Zusammenfassend kann man das Polymer auf der Oberfläche als Monomerreservoir bei konstantem chemischen Potential betrachten. Während der Desorption werden die Monomere als Teil einer Kette in die umgebende Lösung transferiert.

2.2.5 Das chemische Potential

Chemische Reaktionen, der Teilchenaustausch zwischen Phasen oder allgemein Änderungen in den Teilcheneigenschaften oder deren Umgebung werden durch den extensiven Parameter des chemischen Potentials beschrieben. Die Definition [25] lautet

$$\mu = \left(\frac{\partial G}{\partial N} \right)_{T,p}. \quad (2.22)$$

Alle anderen Parameter wie Temperatur und Volumen bzw. Druck bleiben konstant.

Sei nun das chemische Potential μ von den Parametern a und b abhängig, dann ist μ extensiv, wenn $\alpha\beta\mu = \mu(\alpha a, \beta b)$ gilt; das chemische Potential hängt also linear von der Anzahl der Teilchen N ab. In diesem Fall ist auch die Gibbs-Energie G ein extensiver Parameter und somit proportional zu N , solange nur eine Teilchenart vorhanden ist. Verwendet man nun in Gleichung 2.22 die Definition der Gibbs-Energie 2.16, dann ergibt sich für das chemische Potential die Form

$$\mu = \left(\frac{\partial H}{\partial N} \right)_{T,p} - T \left(\frac{\partial S}{\partial N} \right)_{T,p} =: \mu_H - \mu_S. \quad (2.23)$$

Das chemische Potential hat somit einen energetischen Anteil μ_H und einen entropischen Anteil μ_S . Je nach Eigenschaften der Teilchen, wie zum Beispiel seiner Ladung, seiner Größe usw. müssen für das chemische Potential verschiedene Anteile berücksichtigt werden; beim Transfer eines Teilchens werden Grenzflächen erzeugt und vernichtet, das Teilchen geht elektrostatische Bindungen ein, die Entropie ändert sich, usw. Ändert sich nur die Teilchenzahl N und die restlichen unabhängigen Parameter der thermodynamischen Potentiale bleiben konstant, sind im chemischen Potential alle Anteile der Transferenergie zusammengefasst.

Formal gesehen ist der Ausdruck 2.22 ein Potentialunterschied, wird aber aus praktischen Gründen im weiteren Verlauf dieser Arbeit als *chemisches Potential* bezeichnet. Beim Desorptionsprozess werden aus dem Monomerreservoir auf der Oberfläche Monomere in Lösung gebracht. Dabei ändert sich die Energie des Monomers um das chemische Potential zwischen Reservoir und Lösung. Werden zwei unterschiedliche Desorptionsprozesse verglichen, wie zum Beispiel Desorption in reinem Wasser mit Desorption in wässriger Elektrolytlösung, dann ändert sich das chemische Potential zwischen Reservoir und Lösung und wird als *Änderung des chemischen Potentials* $\Delta\mu$ bezeichnet. Es soll also fol-

gende Notation gelten:

$$\begin{aligned}\mu &\equiv \text{chemisches Potential} \\ \Delta\mu &\equiv \text{Änderung des chemisches Potentials}\end{aligned}\quad (2.24)$$

Das chemische Potential für Aminosäuren wird in der Literatur durch die Transferenergie der Seitenkettenanaloge für verschiedene Transfers angegeben; die Transferenergie entspricht hier dem chemischen Potential μ . Das Rückgrat der Aminosäure wird dabei vernachlässigt, da der energetische Anteil für jede Aminosäure derselbe ist. Tabelle 2.1 zeigt Literaturwerte für ausgewählte Transfers der Monomere [28] der in dieser Arbeit verwendeten Polyaminosäuren zwischen zwei Medien.

Die unterschiedlichen Medien sollten bei der Messung der Transferenergie

Transfer			Tyrosin		Lysin	
			kcal/mol	kJ/mol	kcal/mol	kJ/mol
Cyclohexan	→	Wasser	- 0,14	- 0,59	- 5,55	- 23,22
Gasphase	→	Wasser	- 6,11	- 25,56	- 9,52	- 39,83
1-Oktanol	→	Wasser	+ 1,63	+ 6,82	+ 0,08	+ 0,33
Cyclohexan	→	1-Oktanol	- 1,77	- 7,41	- 5,63	- 23,56
Gasphase	→	1-Oktanol	- 7,74	- 32,38	- 9,60	- 40,17
Fläche			239,9		215,2	

Tabelle 2.1: Transferenergie für die Aminosäuren Tyrosin und Lysin; $\text{kJ} = 4,184 \text{ kcal}$. Die Fläche gibt dabei die zugängliche Oberfläche der Seitenkette der Aminosäure X im Tripeptid Gly-X-Gly in \AA^2 an. Quelle: [28]

verschiedene Wechselwirkungen modellieren [28]. In der Gasphase gibt es unter den Aminosäuren keinen Kontakt und somit keine Wechselwirkung. In Cyclohexan gibt es nur van der Waals-Kräfte, wobei in Wasser van der Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken auftreten. Das Oktanol war wasserfrei und modelliert dadurch eine apolare Umgebung mit geringfügigem polarem Wasseranteil.

Tabelle 2.2 zeigt die Adsorptionsenergie von Phenylalanin, Tyrosin und Glycin, bestimmt durch eine Analyse der Adsorptionsisothermen der drei Aminosäuren auf Polymerfilmen, nämlich das hydrophobe Poly(2-vinylpyridin) (PVP), das mild hydrophobe Polystyren (PS) und das positiv geladene Poly(1-benzyl-2-vinylpyridiniumbromid) (BzPVP) [29]. Die angegebenen Energien sind gemessene Adsorptionsenergien und es muss somit bei Behandlung als Desorptionsenergien das negative Vorzeichen durch ein positives ersetzt werden. Die angegebenen Werte für die Aminosäuren wurden aus der Adsorptionsenergie von Homopolymeren der Aminosäuren abgeleitet.

Oberfläche	Phenylalanin		Tyrosin		Glycin	
	kcal/mol	kJ/mol	kcal/mol	kJ/mol	kcal/mol	kJ/mol
PVP	- 0,66	- 2,76	- 0,75	- 3,14	- 0,33	- 1,38
PS	- 0,87	- 3,64	- 0,65	- 2,72	- 0,37	- 1,55
BzPVP	- 0,37	- 1,55	- 1,10	- 4,60	- 0,73	- 3,05

Tabelle 2.2: Adsorptionsenergie ΔG (kcal/mol) für die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Glycin in 10 mM HEPES Puffer pH7 ; $\text{kJ} = 4,184 \text{ kcal}$. Verwendete Polymerfilme als Oberflächen: Poly(2-vinylpyridin) (PVP), Polystyrene (PS) und Poly(1-benzyl-2-vinylpyridiniumbromid) (BzPVP). PVP ist als hydrophob einzustufen, PS als mild hydrophob und BzPVP ist positiv geladen. Quelle: [29]

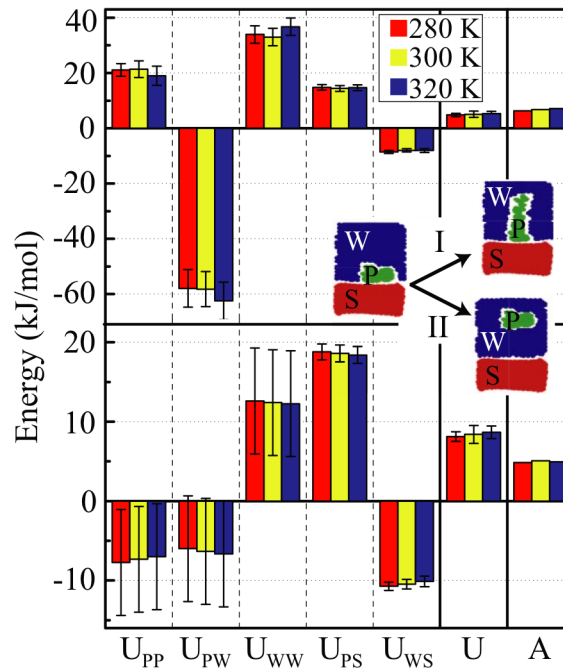
2.3 Molekulardynamik Simulationen

Die bisherigen theoretischen Betrachtungen gaben noch keine Auskunft über die einzelnen Anteile der Desorptionsenergie bzw. Transferenergie. Vor allem das chemische Potential ist noch nicht fassbar. In Molekulardynamik-Simulationen (MD-Simulationen) kann die Desorption eines Biopolymers für alle Atome des Systems inklusive Wasser berechnet werden. Horinek et al.[2] verwendeten für ihre Simulationen als Biopolymer das künstliche Spinnenseidenprotein C_{16} (ähnlich dem Spinnenseidenprotein QAQ_8NR3) und als Festkörperoberfläche hydrophoben, wasserstoffterminierten Diamanten.

In traditionellen Betrachtungen wird die Adhäsionskraft von ungeladenen Körpern in Wasser nur durch Dispersions- oder van der Waals-Wechselwirkungen beschrieben. Es hat sich aber herausgestellt, dass das Lösungsmittel einen ähnlichen, wenn nicht sogar größeren Einfluss auf die Haftung hat. Horinek et al.[2] gelang es zum ersten Mal die einzelnen Anteile der Desorptionsenergie quantitativ zu bestimmen. Es stellte sich dabei heraus, dass alle Wechselwirkungen zwischen dem Peptid (P), der Oberfläche (S) und Wasser (W) berücksichtigt werden müssen. Die totale Desorptionsenergie U lässt sich somit als

$$U = U_{PP} + U_{PW} + U_{WW} + U_{PS} + U_{WS} \quad (2.25)$$

schreiben. Abbildung 2.5 zeigt die einzelnen Energieanteile während der Desorption. Es werden dabei zwei Prozesse voneinander unterschieden. Prozess I ist der Desorptionsprozess wie im Experiment, in dem das Peptid vom adsorbierten Zustand zu einem gestreckten Zustand zwischen Oberfläche und Blattfeder des AFMs gebracht wird. In Prozess II wird das Peptid vom adsorbierten Zustand auf der Oberfläche in den ungestörten, gelösten Zustand gebracht, in dem es als freies Peptid vorliegt. Dies entspricht dem thermodynamischen Adsorptionsgleichgewicht in Lösung. Dabei stimmt die freie Adsorptionsenergie pro Monomer von $A = 5 \text{ kJ/mol}$ sehr gut mit Werten von $2,7 \text{ kJ/mol}$ bis $4,5$



Abbildungung 2.5: Aufspaltung der totalen inneren Energie pro Monomer U in seine Anteile, bestehend aus den Wechselwirkungen Peptid-Peptid, Peptid-Wasser, Wasser-Wasser, Peptid-Oberfläche und Wasser-Oberfläche, für drei Temperaturen. Als Vergleich ist die freie Energie A angegeben. Das obere Diagramm gibt die Energie für den Desorptionsvorgang an bei dem das Peptid in einen gestreckten Zustand überführt wird (Prozess I). Das untere Diagramm gibt die Energie des relaxierten Peptids inklusive Solvation wieder, wie es für eine Gleichgewichtsadsorption der Fall wäre (Prozess II). Quelle: [2]

kJ/mol für Phenylalanin oder Tyrosin auf verschiedenen hydrophoben Polymerfilmen überein, die durch Analyse von Adsorptionsisothermen bestimmt wurden (siehe auch 2.2) [29].

Für beide Prozesse sind die Anteile Wasser-Wasser und Peptid-Oberfläche positiv und größer als die resultierende totale Energie U und die freie Energie A . Sie werden aber durch die Anteile Wasser-Oberfläche und Peptid-Wasser kompensiert. Weiterhin ist der Anteil Peptid-Peptid für beide Prozesse sehr hoch, unterscheidet sich aber im Vorzeichen; auf Grund dessen darf dieser Anteil bei theoretischen Überlegungen nicht vernachlässigt werden. Die Abhängigkeit von der Temperatur ist klein, aber mit der thermodynamischen Relation $S = -\partial A/\partial T$ innerhalb der Unsicherheiten konsistent.

Es ist jedoch zu bemerken, dass beim Vergleich zwischen Simulation und Experiment Vereinfachungen in Kauf genommen werden müssen. (i) Die Ziehgeschwindigkeit während der Desorption ist bei Simulationen auf Grund zeitlicher Einschränkungen mehrere Größenordnungen höher, jedoch ist die Desorptionskraft hier noch unabhängig von der Ziehgeschwindigkeit. (ii) In den Si-

mulationen wurden kürzere Peptidstränge als im Experiment verwendet, was dazu führt, dass die Kraftplateaus nicht exakt flach sind sondern eine teilweise erhöhte Adhäsion zeigen. Der sich beim Mittelungsprozess ergebende Fehler wird aber als kleiner als die sonstigen statistischen Fehler geschätzt. (iii) Weiterhin ist es möglich, dass unterschiedliche Kraftfelder in den Simulationen andere Desorptionskräfte ergeben können; die sich ergebenden Trends sind aber plausibel genug um den Einfluss der Kraftfelder auszuschließen.

Die MD-Simulationen ergeben, dass die einzelnen Anteile sich fast komplett kompensieren und der Wert der totalen Desorptionsenergie U kleiner ist als seine Anteile. Es gibt somit keinen herausragenden Mechanismus der die hydrophobe Anziehung erklären kann. Es ist aber gesichert, dass Struktureffekte des Wassers ebenso wichtig sind wie van der Waals-Wechselwirkungen.

2.4 Gerichtete Kräfte

Zwischenmolekulare Kräfte werden häufig grob in drei Kategorien unterteilt. Zuerst die Kräfte quantenmechanischer Natur wie kovalente Bindungen. Weiterhin Kräfte deren Ursache rein elektrostatisch sind wie die Wechselwirkung zwischen Ladungen, festen Dipolen usw. Die dritte Kategorie stellt die Polarisationskräfte dar die von induzierten Dipolen stammen und somit elektrodynamischer Natur sind; zu ihnen gehören auch die Dispersionskräfte. Diese Einteilung darf aber nicht als statisch gesehen werden, da ein großer Überlappungsbereich existiert.

2.4.1 Bindungstypen

Kovalente Bindungen Die stärkste vorkommende Einzelbindung ist die kovalente Bindung zweier Atome. Ihre Ursache ist quantenmechanischer Natur und beruht im wesentlichen darauf, dass sich zwei Atome ein Valenzelektron teilen. Die auftretenden Bindungsenergien belaufen sich dabei auf ca. 150 bis 500 kJ/mol [30]. In kraftspektroskopischen Untersuchungen konnte man die kovalenten Bindungskräfte direkt messen; dabei stellten sich Goldthiolbindungen als schwächste Bindung mit 1,4 nN heraus und Kohlenstoff-Silizium-Bindungen wiesen ca. 2,0 nN auf [31]. In weiteren Experimenten wurden flussinduzierte Bindungsbrüche von Polymeren erzeugt und die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen zu 2,6 nN bis 13,4 nN bestimmt. Theoretische Berechnungen (vor allem Dichtefunktionaltheorie) ergaben kovalente Bindungskräfte von ca. 2,7 nN für Goldthiolbindungen und 2,8 nN für Kohlenstoff-Silizium;

die stärksten Bindungskräfte wurden für Kohlenstoff-Kohlenstoff mit 6 nN bis 7nN errechnet [32].

Ionenbindung Die Bindungsenergie einer Ionenbindung liegt niedriger und beträgt in wässriger Umgebung 10 bis 30 kJ/mol; sie kann aber in hydrophober Umgebung, d. h. bei wesentlich kleinerer Dielektrizitätskonstante, deutlich größere Werte annehmen [33]. Sie basiert auf der Coulomb-Wechselwirkung zwischen zwei entgegengesetzt geladenen Gruppen.

Wasserstoffbrückenbindung Sie bilden sich zwischen einem positiv polarisiertem Wasserstoffatom das kovalent an Sauerstoff oder Stickstoff gebunden ist und einem elektronegativen Akzeptoratom. Sie sind stets richtungsorientiert und weisen dabei eine Bindungsenergie von ca. 10 bis 30 kJ/mol auf [33].

Van der Waals-Bindungen Die Gruppe der van der Waals-Kräfte werden aus rein elektrostatischen Kräften und elektrodynamischen Wechselwirkungen erzeugt. Die drei wichtigsten Vertreter sind die Keesom-Wechselwirkung, die Debye-Wechselwirkung und die Dispersionswechselwirkung (siehe Tabelle 2.3). Im Folgenden soll die Bezeichnung Partikel stellvertretend für Atom und Molekül stehen.

Debyekräfte stammen von der Wechselwirkung zwischen einem unpolaren Partikel mit (i) einer Ladung, (ii) einem fixierten Dipol oder (iii) einem rotierenden Dipol. Das Entscheidende ist, dass im unpolaren Partikel ein Dipol induziert wird. Eine weitere elektrodynamische Wechselwirkung ist die Keesom-Wechselwirkung welche eine Kraft zwischen zwei frei rotierenden Dipolen erzeugt [34].

Es gibt nur eine einzige Wechselwirkung die zwischen jedem Partikel wirkt: die Dispersionswechselwirkung. Dispersionskräfte sind quantenmechanischer Natur, langreichweitig und können je nach Situation effektiv in einem Bereich von 0,2 bis mehr als 10 nm wirken. Weiterhin können sie anziehend und abstoßend sein, und richten dabei die beteiligten Partikel in eine bestimmte Richtung aus; dieser letzte Effekt ist aber eher klein. Dispersionskräfte sind also zum größten Teil ungerichtet, müssen aber trotzdem von den ungerichteten Kräften des nachfolgenden Abschnitts getrennt werden [34].

Es spielt auch eine wichtige Rolle ob in der Nähe der Reaktionspartner weitere Partikel vorliegen, da diese einen Einfluss auf die Wechselwirkung haben. Für kleine Atome oder Moleküle wie Argon oder Methan können sie vernachlässigt

werden, aber für größere Moleküle wie Hexan oder weitere Kohlenwasserstoffe wird der Einfluss groß genug um sie bei Raumtemperatur flüssig zu halten. Van der Waals-Kräfte sind dabei aber nicht additiv. Die Bindungsenergien bewegen sich im Bereich von ca. 8 kJ/mol für Argonatome und ca. 7 kJ/mol pro CH₂-Gruppe zwischen Kohlenwasserstoffen [24].

Typ der Wechselwirkung	Wechselwirkungsenergie $w(r)$
Debyeenergie	$-\frac{u^2\alpha}{(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2r^6}$
Keesomenergie	$-\frac{u_1^2u_2^2}{3(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2k_BTr^6}$
Dispersionsenergie	$-\frac{3}{4}\frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\epsilon_0\epsilon)^2r^6}$

Tabelle 2.3: Eine Auswahl der freien Energien $w(r)$ der wichtigsten Wechselwirkungen bei den van der Waals-Kräften zwischen Atomen, Ionen und Molekülen, mit dem elektrischen Dipolmoment u , der elektrischen Polarisierbarkeit α , der Dielektrizitätskonstante ϵ_0 , der Dielektrizitätszahl ϵ , dem Abstand zwischen den beteiligten Partikeln r , der Boltzmannkonstante k_B , der Temperatur T , dem Planckschen Wirkungsquantum h und der elektronischen Ionisationsfrequenz ν . Quelle: [24]

2.5 Ungerichtete Kräfte

Die Wechselwirkung zweier Körper in einem Lösungsmittel können bei großen Abständen durch Kontinuumstheorien beschrieben werden. Verkleinert sich deren Abstand auf die Größenordnung von Molekülen kann die Größe, Form und die chemische Beschaffenheit der einzelnen Lösungsmittelmoleküle nicht mehr vernachlässigt werden.

Solvatation/Hydratation Körper oder einfache Partikel in Lösung bilden nach der ursprünglichen Vorstellung von Derjaguin und Kussakov [34] eine oder mehrere Schichten mit Lösungsmittelmolekülen aus, die im Vergleich zum Lösungsmittel im Volumen andere Eigenschaften besitzen. Diese Schichtenbildung nennt man Solvatation (auch Solvation). Nähern sich zwei Körper oder Partikel in Lösung so überlappen sich deren Schichten und die Grenzflächen erfahren eine Kraft; dabei erfolgt eine Neuordnung der Solvatationsmoleküle. Es tritt somit eine Orientierungswechselwirkung auf die zu einer Abnahme der

Teilchenentropie in der Solvatationsschicht führt [34]. Wird als Lösungsmittel Wasser verwendet nennt man Solvatation Hydratation (auch Hydration). Oft wird zwischen Solvatationskräften und Strukturkräften nicht unterschieden. Jedoch soll in dieser Arbeit folgende Einteilung gelten: Man spricht von Solvatation wenn kleine Lösungsmittelmoleküle beteiligt sind (wie z. B. Wasser) und von Strukturkräften, wenn große Moleküle oder Polymere sich an den Oberflächen bzw. Grenzflächen befinden.

Eigenschaften von Wasser im Volumen Das Wassermolekül besitzt auf Grund seines Aufbaus einen permanenten Dipol und kann wegen der hohen Elektronegativität des Sauerstoffs Wasserstoffbrücken mit polaren Molekülen eingehen. Flüssiges Wasser weist daher eine tetrahederartige Struktur auf, besitzt aber weiterhin eine hohe Dynamik, wobei die Struktur im Pikosekundenbereich variiert [35]; dies bedeutet, dass der Austausch von Bindungspartner im Pikosekundenbereich erfolgt.

Wässrige Salzlösungen Das Lösen von Salzen bewirkt nun, dass Wassermoleküle um gelöste Ionen durch deren elektrisches Feld ausgerichtet werden. Dabei überwiegt der günstige enthalpische Beitrag, bestehend aus der positiven Gitterenergie und der negativeren Hydratationsenergie, den für das Lösen ungünstigen entropischen Beitrag. Jedem Salzion kann eine dynamische Hydratationszahl zugeordnet werden, die beschreibt wie stark das jeweilige Ion Wassermoleküle bindet. Mehrfach geladene Ionen binden dabei in der Regel mehr Wassermoleküle (Ca^{2+} : ~ 2 , Mg^{2+} : ~ 6) als einfach geladene Ionen (Na^+ : $\sim 0,3$, Cl^- : ~ 0), jedoch gibt es Ausnahmen wie das kleine Fluorid (F^- : ~ 5) und die großen Phosphationen (H_2PO_4^- : ~ 2 , HPO_4^{2-} : ~ 4 , PO_4^{3-} : ~ 5), die vergleichsweise stark hydratisiert sind [36]. Hier ist anzumerken, dass verschiedene Messmethoden unterschiedliche Hydratationszahlen ergeben, der Trend aber derselbe ist.

Eine weitere systematische Unterscheidung von Ionen in chaotrop und kosmotrop erfolgt durch das Vorzeichen des Jones-Dole Viskositätskoeffizienten B . Dieser Koeffizient ist definiert durch

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + Ac^{\frac{1}{2}} + Bc. \quad (2.26)$$

η ist die Viskosität einer wässrigen Salzlösung, η_0 ist die Viskosität von reinem Wasser bei derselben Temperatur, c die Konzentration der Ionen, A ist ein elektrostatischer Term (vernachlässigbar für moderate Konzentrationen)

und B ist ein Parameter für die Wechselwirkung zwischen Wasser und Ionen; der Jones-Dole Koeffizient B ist dabei linear mit der Entropie der Wassermoleküle verknüpft. Die Gültigkeit der Gleichung erstreckt sich aber nur bis zu einer Konzentration von ca. 0,1 M [37]. Besitzt der Jones-Dole-Koeffizient B ein negatives Vorzeichen so liegt ein chaotropes Ion in Wasser vor und bei einem positiven Vorzeichen ein kosmotropes Ion. Natürlich liegen in einer Salzlösung immer Kationen und Anionen vor und dies kann dazu führen, dass zum Beispiel für NaI ($B(\text{Na}^+) = 0,086$ und $B(\text{I}^-) = -0,068$) die Viskosität steigt während sie für KI ($B(\text{K}^+) = -0,007$) sinkt. Bei höher konzentrierten Salzlösungen wird obige Gleichung ungültig und das Verhalten der Viskosität zeigt ein exponentielles Verhalten [38]. Verwendet man NaI, NaCl und NaH_2PO_4 so nimmt die Viskosität mit steigender Konzentration zu.

Die Viskosität von Lösungen ist ein Maß für die Wechselwirkung der vorhandenen Teilchen in Lösung und auch ein Maß für das spezifische Volumen und der Hydratation der vorhandenen Teilchen [39]. Dies bedeutet aber auch, dass bei steigender Konzentration der Teilchen das freie Volumen für das Lösen weiterer Teilchen abnimmt. Somit ändert sich die Gibbs-Energie allein durch die Änderung des freien Volumens

$$G = -k_B T \ln \frac{V}{V_0} + \text{konst.} \quad (2.27)$$

Hierbei ist V das zugängliche Volumen, abhängig von der Partikelgröße, V_0

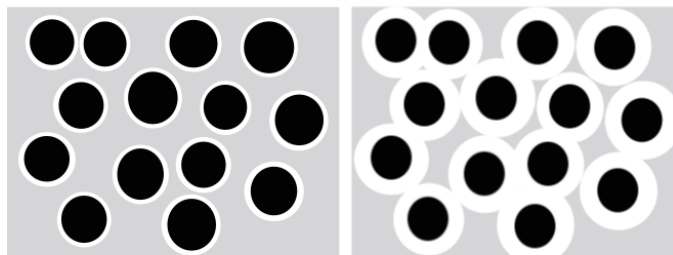


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des freien Volumens (grau) bei einer (a) dünnen Schicht (geringe Hydratisierung) (b) und bei einer dicken Schicht (starke Hydratisierung).

das Gesamtvolumen und G die Gibbs-Energie des Systems [40]. Abbildung 2.6 verdeutlicht diesen freien Volumen-Effekt an Hand von Kugeln mit unterschiedlich dicken Hüllen.

Betrachtet man nun die dielektrischen Eigenschaften von Wasser und wässrigen Salzlösungen so stellt man fest, dass die Art des Salzes kaum einen Einfluss auf die Dielektrizitätszahl ϵ hat; d. h. weder kosmotrope Salze wie Na_2SO_4 [41]

noch chaotrope Salze wie NaI oder NaClO₄ [42] ergeben eine nennenswerte Änderung. Jedoch spielt die Konzentration eine enorme Rolle. So erniedrigt zum Beispiel eine Konzentration von 4 M NaCl die statische Dielektrizitätszahl auf ca. 40 (reines Wasser ca. 84) [43].

Weiterhin beeinflussen Elektrolyte die Grenzflächenspannung von wässrigen Lösungen. Bezogen auf reines Wasser erhöht sich zum Beispiel die Grenzflächenspannung bei Zugabe von NaI um ca. 1,2 mNm⁻¹, bei NaCl um ca. 2 mNm⁻¹ und bei NaClO₃ um ca. 0,8 mNm⁻¹ jeweils pro Mol Salz [44].

Wasser-Ethanol-Mischungen Eine weitere Möglichkeit die Eigenschaften von Wasser zu verändern ist das Mischen mit z. B. Ethanol, da die Löslichkeit von Alkoholen in Wasser auf Grund deren Hydroxylgruppe recht gut ist. Wie zu erwarten verringert sich die Grenzflächenspannung von Wasser ($\gamma_{Wasser} \approx 74\text{mNm}^{-1}$) bei Zugabe von Ethanol ($\gamma_{EtOH} \approx 25\text{mNm}^{-1}$) drastisch. Ab einem Mischungsverhältnis von 20% bis 30% Ethanol in Wasser verlangsamt sich die Änderung der Grenzflächenspannung (Abb. 2.7)[45]. Die dielektrischen Eigen-

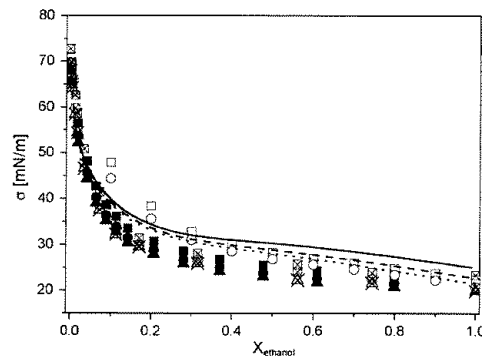


Abbildung 2.7: Experimentelle (Symbole) und errechnete Werte (durchgehende, gestrichelte und gepunktete Linie) für die Grenzflächenspannung σ aufgetragen gegen den Molenbruch $X_{Ethanol}$ von Ethanol in Wasser. Quelle: [45]

schaften von Ethanol-Wasser-Mischungen zeigen ein ähnliches Verhalten wie wässrige Salzlösungen. Bei Zugabe von Ethanol sinkt die komplexe Dielektrizitätszahl der Mischung sukzessive, bis sich z. B. ein statischer Wert von ca. 30 ergibt. Ein auffallender Effekt bei der Mischung von Wasser und Ethanol ist das nichtideale Mischungsverhalten der beiden Komponenten. Setzt man das Verhältnis des Volumen V einer gegebenen Masse und dem idealen Volumen V_{ideal} , das sich ergibt, wenn man für die gleiche Masse ein ideales Mischen annimmt, in Verhältnis, so ergibt sich bei einem Molenbruch von ca. 0,25 ein Minimum (Abb. 2.8). Weiterhin ergibt sich für die effektive Korrelation der permanenten Dipole in der Mischung bei einem Mischungsverhältnis von

20-30% Ethanol in Wasser ein Minimum [46]. In der angegebenen Referenz werden noch weitere Messungen gezeigt, die Extrema im Bereich von ca. 20% Ethanol in Wasser aufweisen. Die Ursache hierfür ist der Zusammenbruch der dreidimensionalen Struktur des Wasser auf Grund der vorhandenen Ethanolmoleküle.

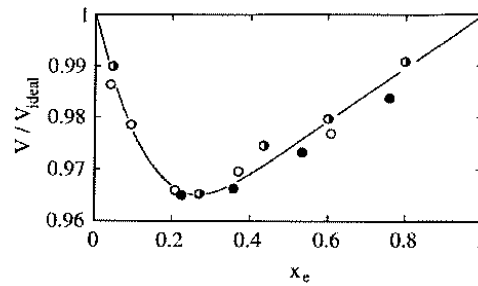


Abbildung 2.8: Volumenverhältnis V/V_{ideal} von Ethanol-Wasser-Mischungen bei 25°C, x_e ist der Volumenbruch von Ethanol in Wasser. Quelle: [46]

Grenzflächenkräfte in wässrigen Medien

Die bisher beschriebenen Effekte treten nicht nur bei Partikeln auf sondern existieren auch für große Körper in wässrigen Medien. Der Einfachheit wegen wird angenommen der große Körper sei eine Kugel, dann bedeutet die Bezeichnung *groß*, dass der Krümmungsradius der Kugeloberfläche im Vergleich zu anderen beteiligten Partikeln als unendlich angenommen werden kann. Handelt es sich bei diesem Körper um keinen Festkörper wie z. B. einer Luftblase, dann ist es besser den allgemeinen Begriff der Grenzfläche zu verwenden.

Wasser ist die wichtigste Flüssigkeit für biochemische Prozesse, weshalb die meisten Oberflächen die sich in Wasser befinden geladen sind oder zumindest polaren Charakter haben [34]. Ladungen sorgen auch dafür, dass Ionen und Wassermoleküle an die Oberfläche gebunden werden. Bei einer sehr hohen Flächenladungsdichte erzeugt das daraus resultierende elektrische Feld die sogenannten Stern-Schicht aus adsorbierten Wassermolekülen und Ionen. Nach der Stern-Schicht folgt eine diffuse Schicht aus Gegenionen und Wassermolekülen die das elektrische Feld exponentiell abschirmen [24]. Ersetzt man geladene Gruppen auf Festkörperoberflächen durch unpolare Gruppen wie Methyl so kann die Flächenladungsdichte sukzessive verkleinert werden; dies führt dann auch zu einer Änderung der Hydratation. Je weniger Ladungen oder polare Gruppen sich an der Oberfläche befinden desto unpolarer, in wässrigen Lösungen hydrophober, wird die Oberfläche.

Verhalten von Wasser an hydrophoben Grenzflächen Der Ausdruck *hydrophob* wird verwendet um Kräfte zwischen unpolaren Objekten in wässrigen Medien zu beschreiben [14], es muss aber dabei zwischen großen und kleinen Körpern unterschieden werden, da eine starre eisartige Klathratstruktur [17] für große Festkörperoberflächen oder Grenzflächen nicht plausibel erscheint [15]. Für solche Objekte wurde eine Verarmungszone mit einer geringeren Wasserdichte als im Volumen [14] und eine hydrophobe Hydratationschicht vorgeschlagen [47]. Aktuelle Simulationen der Luft-Wasser-Grenzfläche und von Wasser an unpolaren Festkörperoberflächen zeigen dies auch; weiterhin ergibt sich, dass die Wassermoleküle der hydrophoben Hydratschicht eine überwiegende Wahrscheinlichkeit (siehe Abb. 2.9) für eine Orientierung besitzen [48], aber keine eisartige Klathratstruktur bilden. Das Dichteprofil von Wasser an einer unpolaren Oberfläche (Abb. 2.9[I(a)]) ist stark abhängig von der Wechselwirkungsenergie zwischen Wasser und der Oberfläche. Verringert man in der Simulation diese Wechselwirkungsenergie wird das Dichteprofil dem der Luft-Wasser-Grenzfläche immer ähnlicher (Abbildung 2.9 [II(a)]) [48]. Aus der Orientierung der Wassermoleküle ergibt sich noch eine weitere interessante Eigenschaft von hydrophoben Grenzflächen: ein elektrostatisches Oberflächenpotential. Vernachlässigt man die Anwesenheit von Hydronium- und Hydroxidionen, die bei der Autoprotolyse des Wassers entstehen, dann zeigt sich unter Abwesenheit von geladenen Partikeln eine Polarisation der Grenzfläche. Abbildung 2.10 zeigt die elektrostatischen Potentiale einer Luft-Wasser-Grenzfläche und einer unpolaren Festkörperoberfläche in Wasser im Vergleich zum Dichteprofil. Das Potential ist dabei für Luft und dem Festkörper auf Null gesetzt. Der Potentialunterschied über eine hydrophobe Grenzfläche beträgt nach den Ergebnissen von MD-Simulationen ca. -0,6 bis -0,4 Volt. Eine Messung von Oberflächenpotentialen erfolgt über die Messung des sogenannten ζ -Potentials durch Strömungspotentialmessungen. Untersuchungen an hydrophoben Diamanten ergaben einen isoelektrischen Punkt bei pH 3,5 und somit eine effektive negative Oberflächenladung. Die Ursache hierfür ist die Adsorption von Hydroxidionen und die Orientierung der Wassermoleküle [49]; es muss jedoch bemerkt werden, dass Diamant leitend ist und somit ein Einfluss von Ladungen im Diamanten vorhanden sein können und somit das Oberflächenpotential verändern. Weitere Messungen an hydrophoben und hydrophilen SAMs haben einen isoelektrischen Punkt von ca. pH 4 ergeben. Das gemessene ζ -Potential ist dabei bei Verwendung verschiedener Salze unterschiedlich und natürlich abhängig von der Konzentration[50]. Dasselbe Verhalten konnte für Polymerfilme aus Teflon AF gezeigt werden [51].

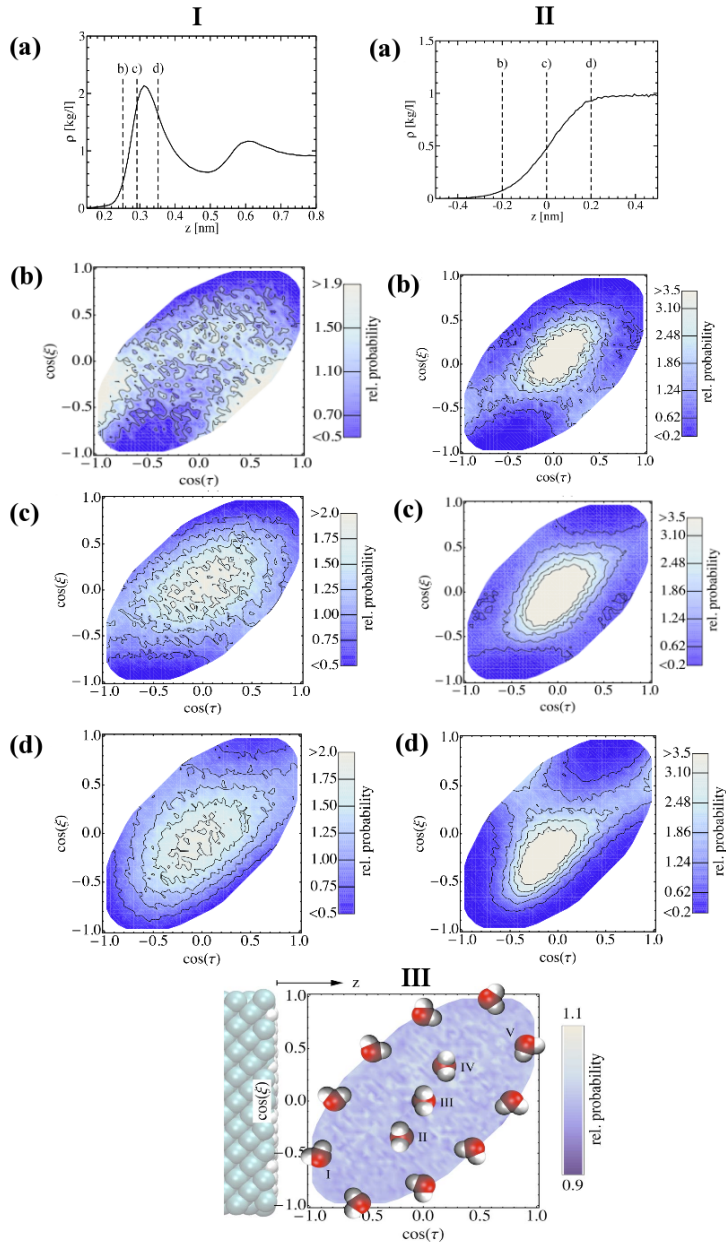


Abbildung 2.9: Dichteprofile und Verteilungen der Orientierung der Wassermoleküle an nicht-polaren Grenzflächen. [I(a)] Verteilung der Massendichte von Wasser an unpolarem Diamant. [II(a)] Verteilung der Massendichte von Wasser an der Luft-Wasser-Grenzfläche. Die gestrichelten Linien zeigen in [I(a) & II(a)] jeweils die Positionen an denen die Orientierungsverteilungen errechnet wurden. [I(b)-I(d)] Orientierungsverteilungen von $\cos(\xi)$ und $\cos(\tau)$ für verschiedene Abstände vom hydrophoben Diamanten. [II(b)-II(d)] Orientierungsverteilungen von $\cos(\xi)$ und $\cos(\tau)$ für verschiedene Abstände von der Luft-Wasser-Grenzfläche. [III] Illustration verschiedener Orientierungen der Wassermoleküle. τ ist der Winkel zwischen den OH-Vektoren eines Wassermoleküls und der Grenzflächennormalen und ξ ist der Winkel zwischen dem Dipol eines Wassermoleküls und der Grenzflächennormalen. Der Hintergrund zeigt die Verteilung der Wassermoleküle im Volumen. Quelle: [48]

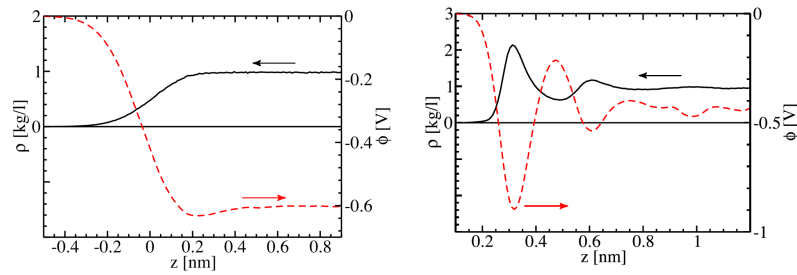


Abbildung 2.10: Die schwarzen durchgezogenen Linien in beiden Bildern stellen die Massenverteilung von Wasser an der Luft-Wasser-Grenzfläche (links) und an unpolarem Diamanten (rechts) dar. Die roten getrichelten Linien zeigen das elektrostatische Potential an der jeweiligen Grenzfläche. Das Potential ist dabei für Luft und den Festkörper auf Null gesetzt. Quelle: [48]

Eine direkte Messmethode ist die Bestimmung des Kontaktpotentialunterschieds zwischen einer AFM-Blattfeder und der zu untersuchenden Oberfläche (siehe 3.1.1 Abbilden und Potentialmessung). Bei Messungen auf polaren Carboxyl-SAMs und unpolaren Methyl-SAMs konnte festgestellt werden, dass hydrophobe Oberflächen positivere Potentiale im Vergleich zu hydrophilen Substraten besitzen; wie zum Beispiel 0,2 V für Carboxyl-SAMs und 0,5 V für Methyl-SAMs [52]. Außerdem ist das elektrische Potential eines hydrophoben SAMs abhängig von der Anzahl der Methyl-Gruppen. Hier muss erwähnt werden, dass die Messung dieses Kontaktpotentialunterschieds keine absoluten Werte liefert, sondern relative Werte bezogen auf das Material der AFM-Blattfeder.

Spezifische Ionenabsorption an hydrophoben Grenzflächen Experimentelle Untersuchungen zeigen einen Einfluss der Ionensorte auf die Eigenschaften von Grenzflächen. (i) Wie oben schon gezeigt ändert sich die Grenzflächenspannung bei Zugabe von verschiedenen Ionen unterschiedlich stark, (ii) das ζ -Potential von hydrophoben Festkörperoberflächen ist stark negativ und variiert mit der Ionensorte und der Konzentration [53]. Die Existenz von negativen Ladungen an den Oberflächen ist aus der Stabilität von dünnen Filmen und Blasenelektrophorese abgeleitet worden [54, 55].

Die Vermutung einer spezifischen Ionenadsorption an hydrophoben Grenzflächen kann durch MD-Simulationen bestätigt werden. Es zeigt sich dabei, dass bei hydrophoben Festkörperoberflächen stark hydratisierte Ionen wie Fluorid abgestoßen werden, wohingegen wenig hydratisierte Ionen wie Chlorid und Iodid leicht bzw. stark angezogen werden (Abb. 2.11) [56]; dasselbe gilt für Luft-Wasser-Grenzflächen [57, 58]. Weiterhin ist folgender Effekt zu bemerken: Setzt man die Konzentration eines Salzes an der Oberfläche c mit

der Volumenkonzentration c_0 in Verhältnis, dann nimmt c/c_0 mit steigender Volumenkonzentration zu; es gilt also $c_1/c_{01} < c_2/c_{02}$ bei $c_{01} < c_{02}$ (siehe Abb. 2.11) [56].

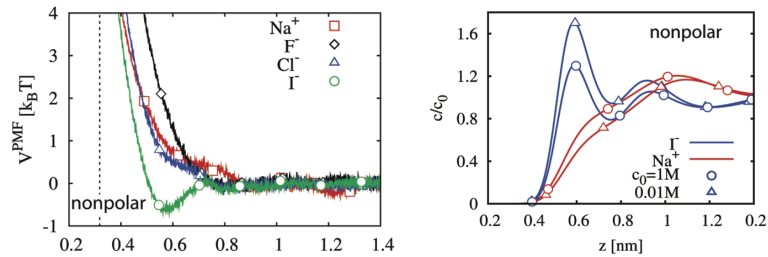


Abbildung 2.11: Resultate aus Simulationen von Ionen an einem hydrophoben SAM. Links, die Potentiale (PMF, aus dem Englischen für potential of mean force) für das Natriumion (rot) und den drei Anionen Fluorid (schwarz) Chlorid (blau) und Iodid (grün). Die gestrichelte Linie gibt die Oberfläche an. Rechts, Konzentrationsprofile des Iodids (blau) und des Natriumions (rot) jeweils 0,01M und 1 M. Quelle: [56].

2.6 Hofmeistereffekt

Im 19. Jahrhundert begann Franz Hofmeister als erster den spezifischen Einfluss von Ionen auf die Löslichkeit von Proteinen und kolloidalen Partikeln zu untersuchen. Eine Sammlung und Übersetzung ins Englische kann in Referenz [1] gefunden werden. Im folgenden werden die Experimente von Hofmeister zusammengefasst.

Bei Experimenten mit Globulinen aus Hühnereiweiß und Blut, Eisenoxidpartikel und Natriumoleat (dem Natriumsalz der Ölsäure) konnten Hofmeister und seine Mitarbeiter nachweisen, dass verschiedene Salze bei unterschiedlichen Konzentrationen die oben genannten Proben ausfällen können; zum Teil blieben die Partikel sogar in Lösung. Abbildung 2.12 zeigt die gefundenen Konzentrationen für das Serum-Globulin aus dem Hühnereiweiß. An Hand dieser und weiterer Daten folgerte Hofmeister auf die Fähigkeit der Salze mit Wasser zu assoziieren und auf die Eigenschaft Proteinen, kolloidalen Partikeln und unpolaren Molekülen Wasser zu entziehen. Außerdem befürwortete Hofmeister zur weiteren Erklärung seiner Daten eine *Hydratschale* [1].

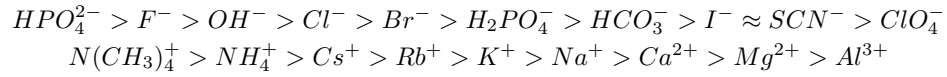
Einteilung der Salze Auf der Grundlage von Hofmeisters Experimenten [1] und weiterer Experimente [59, 60, 61, 20, 62] entstand die sogenannte Hofmeister-Reihe [63]:

kosmotrop

chaotrop

stark hydratisierte Anionen

schwach hydratisierte Anionen



schwach hydratisierte Kationen

stark hydratisierte Kationen

Es ist zu bemerken, dass die obige Reihe natürlich durch weitere Ionen ergänzt werden kann und die exakte Reihenfolge je nach Anwendung leicht variiert; eine Variation bedeutet hier einen Austausch in der Reihe benachbarter Ionen. Anfang und Ende der Reihen werden auch als kosmotrop bzw. chaotrop bezeichnet.

Kosmotrope Salze bezeichnet man auch als strukturschaffend, da sie die Struk-

	Lithium L=7	Natrium Na=23	Potassium K=39.1	Ammonium NH4=18	Magnesium Mg/2=12.2
Sulfates ($\frac{SO_4}{2}=48$)	1.57	1.60	-	2.03	2.65
Phosphates ($\frac{PO_4H}{2}=48$)	-	1.65	1.61	2.51	-
Acetates ($C_2H_3O_2=59$)	-	1.69	1.67	-	-
Citrates ($\frac{C_6H_5O_7}{3}=63$)	-	1.68	1.67	2.71	-
Tartrates ($\frac{C_4H_4O_6}{2}=74$)	-	1.56	1.51	2.72	-
Bicarbonates ($CO_3H=61$)	-	-	2.53	-	-
Chromates ($\frac{CrO_4}{2}=58.15$)	-	2.61	2.67	-	-
Chlorides (Cl=35.45)	-	3.63	3.53	-	-
Nitrates ($NO_3=62$)	-	5.42	-	-	-
Chlorates ($ClO_3=83.45$)	-	5.52	-	-	-

Abbildung 2.12: Die Tabelle zeigt die Konzentrationen der Salze bei denen das Serumglobulin des Hühnereiweiß ausfällt; das Anion steht auf der senkrechten Achse und das Kation steht auf der horizontalen Achse). Die Einheit der Konzentration ist die *Normalität* N. Sie ist die Einheit der Äquivalenzkonzentration $c_{eq} = zc$; hier sind c die Stoffmengenkonzentration in Molar und z ist die stöchiometrische Wertigkeit. Quelle: [1].

turbildung von Proteinen durch hydrophobe Bereiche verstärken und schließlich Aggregate bilden die ausfallen können. Wassermoleküle werden dabei elek-

trostatisch stark an die Ionen gebunden. Chaotrope Salze nennt man strukturbrechend, da sie die Strukturbildung nicht beeinflussen oder es erleichtern Proteine in eine mehr ungefaltete Form zu überführen [59]. Die Orientierung der Wassermoleküle wird dabei wenig beeinflusst. Kleine Ionen wie z. B. Iodid können sich ohne die Wasserstruktur zu stören in Hydrathüllen einlagern [15]. Der hier ausschlaggebende Faktor ist das chemische Potential, das als Funktion der Ionenart geschrieben werden kann [59]. Es beinhaltet dabei die Grenzflächenenergie der wässrigen Lösung, die Entropie des umgebenden Wassers, die Selbstenergie der Ionen und weitere Parameter (siehe Abschnitt 2.2.5 Das chemische Potential).

2.7 Strukturkräfte

Polymere werden oft benutzt um Dispersionslösungen zu stabilisieren und Partikel davor zu bewahren zu aggregieren. Dabei werden die Polymere auf Oberflächen oder Partikeln physikalisch oder chemisch gebunden. Dabei formen sich verschiedene Grenzflächenstrukturen wie Bürsten, Pilze oder Filme [64]. Nähern sich nun solche Grenzflächenstrukturen einander an, so dass sie sich überlappen, steigt die Segmentdichte und der osmotische Druck erhöht sich. Dies führt zu einer abstoßenden Kraft [34]. Geladene Grenzflächenstrukturen können in diesem Fall zusätzlich eine anziehende Komponente bei gegensätzlichen Ladungen oder eine weitere abstoßende Komponente bei gleichen Ladungen erzeugen. Weiterhin spielt das umgebende Lösungsmittel eine wichtige Rolle; bei einem schlechten Lösungsmittel ergibt sich auf Grund der schlechten Löslichkeit der Polymere eine starke anziehende Kraft, die zu einer Aggregation der beschichteten Partikeln führt oder zu einem Kollaps der Grenzflächenstruktur [64]. Eine weitere Reaktion der Polymere auf sich ändernde Lösungsmitelegenschaften (in wässrigen Lösungen Salzgehalt, pH-Wert, usw.) ist das Ausbilden von Sekundärstrukturelemente wie z. B. die helikale Struktur von Polyethylenglykol [65].

Die Beschreibung der obigen Grenzflächenstrukturen ist ein Vielkörperproblem, das auf die Bewegung eines einzelnen Polymers in einer Röhre umgeben von weiteren Polymeren (*tube model*) reduziert werden kann [64]. Die verwendeten Parameter sind dabei Relaxionszeiten der Polymere, Diffusionskonstanten, Längenskalen der Polymere, etc. Eine tiefergehende Beschreibung lässt sich in [66, 64] finden.

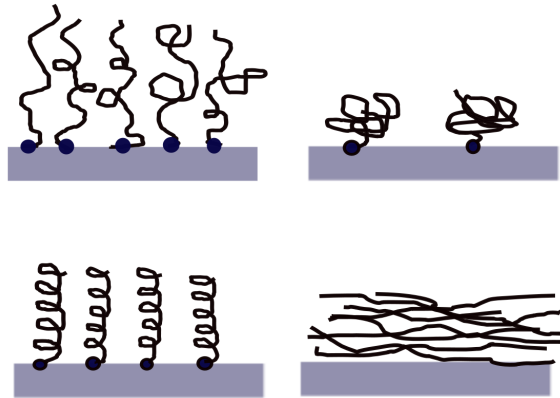


Abbildung 2.13: Schematische Auswahl von Polymeren, die an Oberflächen gebunden sind. (a) Brushstruktur (b) Pilzstruktur (c) Brushstruktur eines helikal gefalteten Polymers (d) Film.

Thermodynamik stimulussensitiver Polymere

Eine spezielle Art von Polymeren sind sogenannte stimulussensitive Polymere. Das Besondere an diesen Polymeren ist ihre Fähigkeit auf sehr kleine Änderung in ihrer Umgebung zu reagieren und dabei ihre Struktur, Lösungseigenschaften, usw. ändern, oder ganz allgemein einen Phasenübergang durchzumachen, der reversibel ist. Die Auslöser für einen Übergang können ganz unterschiedliche Parameter sein wie Temperatur, Änderung im pH-Wert, Ionenstärke, elektrische und magnetische Felder oder auch Licht [67]. Charakteristisch für diesen Phasenübergang bei einer Übergangstemperatur von T_t ist die Änderung der Mikrostruktur von einem hydrophilen zu einen hydrophoben Zustand. Häufig verwendete Polymere sind Poly(N-isopropylacrylamid)[68], Poly(ethylenoxid)₁₀₆-poly(propylenoxid)₇₀-poly(ethylenoxid)₁₀₉ [69] oder elastinartige Polymere (ELPs) die auf einer Wiederholungssequenz des Elastin basieren [70]. Diese Polymere zeigen einen Übergang bei einer bestimmten Temperatur (auch LCST genannt, *Lower Critical Solution Temperature*) bis auf die ELPs welche einen zweiten Übergang zeigen und danach gefaltet vorliegen. Es handelt sich dabei im Polymer um ein Wechselspiel aus geladenen oder zumindest hydrophilen Gruppen und hydrophoben Gruppen. Je nach Anteil liegt die Übergangstemperatur bei höheren oder niedrigeren Temperaturen [70]. Der Mechanismus dahinter behandelt die Hydratation dieser Gruppen, einmal elektrostatische Hydratation durch Ladungen und schließlich hydrophobe Hydratation der unpolaren Gruppen. Bei Erhöhung der Temperatur wird dem System Energie zugeführt, die dafür sorgt, dass weniger Wasser an

den erwähnten Gruppen gebunden ist. Die frei gewordenen Gruppen können nun mit benachbarten Gruppen wechselwirken und das vorhandene System wie z. B. ein Hydrogel kollabiert in wässriger Lösung. Die Übergangstemperatur ist spezifisch für das verwendete Polymer und kann phänomenologisch aus der freien Gibbs-Energie abgeleitet werden. Die Änderung der Gibbs-Energie ΔG ist definiert als $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, wobei ΔH die Änderung der Enthalpie (siehe 2.2.3 Die freie Enthalpie), T die Temperatur und ΔS die Änderung der Entropie sind. Bei einem Phasenübergang ist $\Delta G = 0$ und dies führt zu

$$\Delta H_t = T_t \Delta S_t \Rightarrow T_t = \frac{\Delta H_t}{\Delta S_t}. \quad (2.28)$$

Der Index t soll angeben, dass es sich in Gleichung 2.28 um die Enthalpie, die Temperatur und die Entropie während des Übergangs handelt. Die Übergangstemperatur ist somit ein charakteristisches Maß für die Hydrophobizität des Polymers bzw. sogar der verwendeten Monomere [70].

Betrachtet man ein Hydrogel oder eine Polymerbürste aus stimulussensitiven Polymeren findet man in vielen Fällen einen hydrophoben Kollaps mit einer Verkleinerung des Volumens. Bei diesem Prozess wird Arbeit verrichtet die sich schreiben lässt als die Änderung der freien Energie

$$dA = -pdV - SdT + fdq. \quad (2.29)$$

Dabei ist p der Umgebungsdruck, V das Umgebungsvolumen, S die Entropie, T die Temperatur, f eine generalisierte Kraft und q eine generalisierte Koordinate. Die generalisierte Kraft f kann dabei zum Beispiel dem Druck innerhalb eines Hydrogels entsprechen oder auch der Kraft wenn man die Stauchung eines Polymerteppichs betrachtet. Dem entsprechend gilt für die generalisierte Koordinate q dann das Volumen des Hydrogels bzw. die Verkürzung eines Polymerteppichs während der Stauchung. Ganz allgemein betrachtet wirkt beim hydrophoben Kollaps eine Kraft entlang der generalisierten Koordinate. Die freie Energie ist definiert als $A = U - TS$, wobei für die partielle Ableitung nach der generalisierten Koordinaten bei konstanten Parametern V und T gilt:

$$\left(\frac{\partial A}{\partial q}\right)_{V,T} = \left(\frac{\partial U}{\partial q}\right)_{V,T} - T \left(\frac{\partial S}{\partial q}\right)_{V,T}. \quad (2.30)$$

Nach 2.29 gilt aber $\left(\frac{\partial A}{\partial q}\right)_{V,T} = f$, womit sich ergibt:

$$f = \left(\frac{\partial U}{\partial q}\right)_{V,T} - T \left(\frac{\partial S}{\partial q}\right)_{V,T}. \quad (2.31)$$

Die beim Kollaps auftretende Kraft besitzt somit zwei Komponenten; die energetische Komponente f_U aus der inneren Energie und die entropische Komponente f_S . Es gilt somit

$$f = f_U + f_S. \quad (2.32)$$

An dieser Stelle kann die Maxwell-Relation $\left(\frac{\partial S}{\partial q}\right)_{V,T} = \left(\frac{\partial f}{\partial T}\right)_{V,q}$ verwendet werden. Dies führt schließlich zu

$$f = \left(\frac{\partial U}{\partial q}\right)_{V,T} - T \left(\frac{\partial f}{\partial T}\right)_{V,q} \quad (2.33)$$

und

$$\frac{f_U}{f} = -T \left(\frac{\partial \ln(f/T)}{\partial T}\right)_{V,q}. \quad (2.34)$$

Damit lässt sich der energetische Term experimentell aus einem $\ln(f/T)$ vs. T -Plot bestimmen.

2.8 Die Beschreibung von Federn

Die Qualität von experimentellen Messaufbauten ist immer nur so gut wie deren Kalibrierung. Davor muss jedoch erst eine Beschreibung des zu Grunde liegenden physikalischen Systems gefunden werden. Bei der Balkenfeder eines atomaren Kraftmikroskops handelt es sich um eine Masse die eine ein-dimensionale Oszillation durchführt und einer Rückstellkraft unterworfen ist, welche linear von der Auslenkung abhängt. In diesem Kapitel wird an Hand des einfachen harmonischen Oszillators beschrieben wie sich dieses System in flüssiger Umgebung verhält. Außerdem wird eine Methoden demonstriert, um die Federkonstante des Systems einer Balkenfeder zu bestimmen.

2.8.1 Der einfache harmonische Oszillator

Der gedämpfte harmonische Oszillator Harmonische Oszillatoren sind definiert durch die Bewegungsgleichung

$$\ddot{x} + \frac{2}{\tau} \dot{x} + \omega_R^2 x = 0, \quad (2.35)$$

für eine zeitlich veränderliche Variable $x(t)$, wobei ω_R die Resonanzfrequenz des Oszillators, τ die charakteristische Zeit der Dämpfung und $Q = \omega_R \tau / 2$ die Güte der Schwingung, auch Q-Faktor genannt, darstellt. Für den Fall unendlicher Güte liegt ein ungedämpfter Oszillator vor und der zweite Term in 2.35 ist gleich Null. Tabelle 2.4 zeigt eine kurze Übersicht wie gedämpfte Oszilla-

toren eingeteilt werden [71].

$2Q = \pm\infty$	ungedämpft
$1 < 2Q < +\infty$	unterkritisch gedämpft
$2Q = 1$	kritisch gedämpft
$0 < 2Q < 1$	überkritisch gedämpft

Tabelle 2.4: Einteilung der Dämpfung an Hand des Qualitätsfaktors Q . Quelle: [71]

Es sei nun angenommen, dass $x(t)$ eine Lösung der Gleichung 2.35 darstellt; sie besitzt dabei die Form $x(t) = H(t)\exp[-\omega_R t]$, wobei sich $H(t)$ für unterschiedliche Dämpfungen ändert. Führt man nun eine Fouriertransformation der Lösung durch erhält man das Frequenzspektrum des Oszillators, also des zu beschreibenden Systems. Im Allgemeinen hat die Transformierte die Lorentz-Form:

$$FT\{x(t)\} = S(\hat{\omega}) = A \frac{1}{1 + (\hat{\omega}\tau)^2} + iB(\hat{\omega}), \quad (2.36)$$

Der Imaginärteil $B(\hat{\omega})$, die Dispersion, spielt für die weitere Diskussion keine Rolle. Für die kritisch und überkritisch gedämpfte Oszillation ist $\hat{\omega} = \omega$ und für den unterkritisch gedämpften Fall ist $\hat{\omega} = \omega_R - \omega$. Der Realteil beschreibt dabei das Frequenzverhalten der Schwingung (auch Verstärkungsfunktion genannt) [71].

Der angeregte Oszillator Der bisher betrachtete Fall enthält noch keine Anregung. Bei erzwungenen Schwingungen $x(t)$ harmonischer Oszillatoren nimmt die Differentialgleichung 2.35 ihre inhomogene Form an:

$$\ddot{x} + \frac{2}{\tau}\dot{x} + \omega_R^2 x = F(t). \quad (2.37)$$

Der Anregungsterm $F(t)$ kann je nach Art der Anregung (reell, komplex, periodisch, breitbandig, etc.) verschiedene Formen annehmen [71]. Die jeweils dazugehörigen Lösungen $x(t)$ unterscheiden sich daher voneinander, jedoch sind die jeweiligen Verstärkungsfunktionen identisch. Für die Bestimmung der Federkonstante einer Balkenfeder ist nur das Frequenzspektrum der Schwingung, also die Verstärkungsfunktion, nötig, weshalb in den nachstehenden Betrachtungen die verschiedenen Anregungen nicht weiter berücksichtigt werden. Für die Verstärkungsfunktion ergibt sich

$$S(\omega) = S_0 \left[(\omega_R^2 - \omega^2)^2 + \left(\frac{2\omega}{\tau} \right)^2 \right]^{-1/2} + iB(\omega). \quad (2.38)$$

2.8.2 Die Federkonstante

Aus der theoretischen Beschreibung des einfachen harmonischen Oszillators lässt sich nun die Federkonstante bestimmen. Die am häufigsten verwendeten Methoden sind die Cleveland-Methode [72, 73], die Sader-Methode [74, 73] und die Methode des Thermischen Rauschens [75, 76, 73]. In diesem Abschnitt wird nur auf die theoretische Beschreibung der letzten Methode eingegangen.

Fit-Funktionen Die Gleichungen 2.36 und 2.38 stellen die allgemeine Beschreibung eines einfachen harmonischen Oszillators dar. Für die experimentelle Anwendung ist es von Vorteil die Verstärkungsfunktionen in ihrer quadratischen Form zu verwenden, da die Frequenzspektren üblicherweise in quadratischer Form verwendet werden. Zusätzlich muss noch ein Term A_w hinzugefügt werden, der das weiße Rauschen eines elektronischen Gerätes beinhaltet. Es ergeben sich somit für das sogenannte SHO Modell (angeregter Oszillator):

$$S_{SHO}(\omega) = A_w^2 + \frac{A^2 \omega_R^4}{Q^2} \left[(\omega^2 - \omega_R^2)^2 + \frac{\omega^2 \omega_R^2}{Q^2} \right]^{-1} \quad (2.39)$$

und für die standard Lorentz Funktion (nicht angeregter Oszillator)

$$S_{sLor}(\omega) = A_w^2 + \frac{C_1}{(\omega - \omega_R)^2 + C_2}. \quad (2.40)$$

Gleichung 2.39 kann nun umgeschrieben werden zu

$$S(\omega) = A_w^2 + \frac{A^2 \omega_R^4}{Q^2} \left[(\omega + \omega_R)^2 (\omega - \omega_R)^2 + \frac{\omega^2 \omega_R^2}{Q^2} \right]^{-1}. \quad (2.41)$$

Bei der Herleitung von Gleichung 2.39 wurde die Näherung $\omega \approx \omega_R$ verwendet. Dies bedeutet, dass Gleichung 2.41 rigoros ebenfalls genähert werden kann:

$$S_{Pt}(\omega) = A_w^2 + \frac{A^2 \omega_R^2}{4Q^2} \left[(\omega - \omega_R)^2 + \frac{\omega_R^2}{4Q^2} \right]^{-1}. \quad (2.42)$$

Vergleicht man nun Gleichung 2.42 mit Gleichung 2.40 so stellt man fest, dass 2.42 mathematisch gesehen eine Lorentz Funktion [77] mit den Parametern $C_1 = A^2 \omega_R^2 / 4Q^2$ und $C_2 = \omega_R^2 / 4Q^2$ darstellt, jedoch fundamental im Bereich der Näherung kein Unterschied zu Gleichung 2.39 besteht. Gleichungen 2.39, 2.40 und 2.42 können nun verwendet werden um den Verlauf der spektralen Dichte bei der ersten Mode zu modellieren. Im folgenden Kapitel zeigt Abbildung 3.5 wie gut die drei Gleichungen ein Frequenzspektrum beschreiben.

Methode des Thermischen Rauschens Das Äquipartitionstheorem aus der klassischen Mechanik besagt, dass ein System in einem thermischen Bad für jeden quadratischen Freiheitsgrad eine Energie von $1/2 k_B T$ besitzt [75]. Für eine Balkenfeder bedeutet dies

$$\frac{1}{2} k \langle \Delta z^2(t) \rangle = \frac{1}{2} k_B T, \quad (2.43)$$

wobei $\langle \Delta z^2(t) \rangle$ die mittlere quadratische Auslenkung der Feder, k die Federkonstante, k_B die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur sind. Gleichung 2.43 gilt nur für eine Balkenfeder, von der eines der Enden frei oszillieren kann, jedoch nicht für eine Balkenfeder, die an beiden Enden eine Amplitude von Null aufweist [75, 78]. Letzteres ist jedoch im weiteren Verlauf des Kalibrierungsprozesses der Fall (siehe Abschnitt 3.1.3 Kalibrierung), was durch einen Korrekturfaktor χ Berücksichtigung findet:

$$k = \chi \frac{k_B T}{\langle \Delta z^2(t) \rangle}. \quad (2.44)$$

Die mittlere quadratische Auslenkung der Feder $\langle \Delta z^2(t) \rangle$ in der ersten Mode lässt sich nun ermitteln indem man in der spektralen Dichte unterhalb dieser integriert. Dabei nutzt man das Parseval'sche Theorem [79], welches besagt, dass die mittlere quadratische Auslenkung der spektralen Dichte im Frequenzraum der mittleren quadratischen Auslenkung im Ortsraum entspricht: $\langle \Delta z^2(\omega) \rangle = \langle \Delta z^2(t) \rangle$. Die Integration kann numerisch erfolgen, oder durch eine analytische Integration der Gleichungen 2.39, 2.40 und 2.42. Die analytischen Ausdrücke hierfür lauten

$$\langle \Delta z^2(\omega) \rangle = \int_0^\infty S_{SHO}(\omega) d\omega = \frac{\pi A^2 \omega_R}{2Q} \quad (2.45)$$

$$\langle \Delta z^2(\omega) \rangle = \int_0^\infty S_{sLor}(\omega) d\omega = \frac{C_1}{\sqrt{C_2}} \left[\frac{\pi}{2} + \tan^{-1} \left(\frac{\omega_R}{\sqrt{C_2}} \right) \right] \quad (2.46)$$

$$\langle \Delta z^2(\omega) \rangle = \int_0^\infty S_{Pt}(\omega) d\omega = \frac{A^2 \omega_R}{2Q} \left[\frac{\pi}{2} + \tan^{-1}(2Q) \right]. \quad (2.47)$$

Kapitel 3

Experimentelle Methoden und Material

*Alles Denken ist Zurechtmachen.
(Christian Morgenstern)*

Der Hydrophobe Effekt ist ein schon lange bekanntes Phänomen. Bisherige Experimente konzentrierten sich zum größten Teil auf sog. Volumenmessungen (engl. bulk) [80] oder auf makroskopische Effekte wie z. B. die Haftkraft von hydrophoben makroskopischen Oberflächen [14]. Um die Hydrophobizität exakt zu verstehen muss sie auch auf molekularer Ebene untersucht werden. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei die Konstruktion des zu verwendenden Messaufbaus. Aus diesem Grund wurde eine molekulare Sonde für das atomare Kraftmikroskop entwickelt mit der Adhäsionskräfte im niedrigen Piconewton-Bereich gemessen werden können.

3.1 Das Atomare Kraftmikroskop AFM

3.1.1 Abbilden und Potentialmessung

Das AFM wurde 1986 von Binnig, Quate und Gerber bei IBM entwickelt und war eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops [81]. Mit dem AFM wurde es zum ersten Mal möglich nichtleitende Proben auf atomarer Ebene abzubilden. Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Anwendungen um Oberflächen mit dem AFM zu charakterisieren, wie z. B. die Abbildung der Topographie bis hin zur Messung von elektrischen und magnetischen Eigenschaften; ausserdem ist es möglich das AFM zur Nanolithographie zu benutzen. Im weiteren

wird aber nur auf Anwendungen eingegangen die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Aufbau Ein AFM besteht im Wesentlichen aus einer Blattfeder als Sensor deren Verbiegung mit einer Laserdiode durch das Lichtzeigerprinzip ausgelesen wird (Abb. 3.1). Die Bewegung der Blattfeder wird dabei auf eine segmentierte Photodiode übertragen und erzeugt dabei einen Photostrom auf den einzelnen Segmenten. Durch Auslesen dieses Signals kann man auf die Schwingungen der Blattfeder schließen. Die Position des Sensors kann dabei durch ein Piezoelement (z-Piezo) im Subnanometerbereich kontrolliert werden. Die zu untersuchende Probenoberfläche ist auf einem Piezotisch befestigt (x- und y-Piezo) der sich ebenfalls im Subnanometerbereich lateral bewegen lässt. Am freien Ende der Blattfeder befindet sich auf der Unterseite, also der Probe zugewandt, eine kleine Spitze die an ihrem äußersten Ende einen Krümmungsradius von ca. 5 bis 30 nm hat (je nach Anwendung sind auch kleinere oder größere Radien möglich).

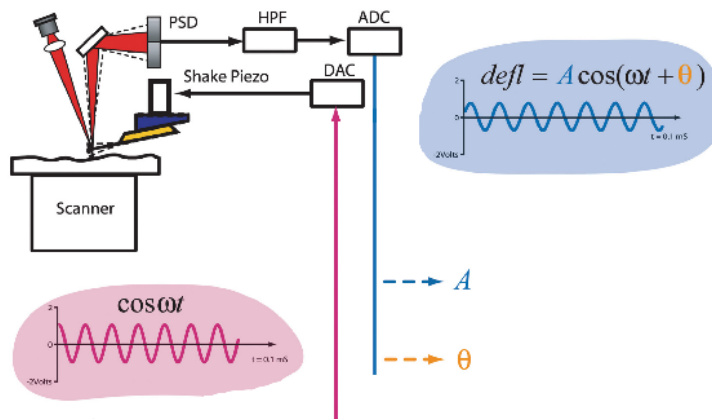


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung eines atomaren Kraftmikroskops (AFM). Der Scanner besteht aus zwei Piezos, um das Substrat lateral zu verschieben, der Shake Piezo oszilliert mit einer Frequenz ω und wird kosinusförmig angeregt; DAC bedeutet Digital-Analog-Wandler. An der Photodiode PSD wird die Bewegung der Blattfeder ($defl$) ausgelesen und durch einen Hochpassfilter (HPF) und einem Analog-Digital-Wandler (ADC) in die Elektronik übertragen. Die Bewegung der Blattfeder entspricht einer Kosinusschwingung mit der Frequenz ω mit einer Phasenverschiebung θ ; A ist die Amplitude der Bewegung der Blattfeder.

Funktionsweise Will man nun eine Probenoberfläche abbilden so hat man im wesentlichen zwei Modi zur Verfügung, den Kontaktmodus und den AC-Modus (auch bekannt als *Tapping Modus*). Im Kontaktmodus bringt man die Spitze der Blattfeder in Kontakt mit der Oberfläche und rastert diese Linie

für Linie ab. Dabei wird die Verbiegung der Blattfeder (der *Setpoint*) konstant gehalten, indem bei einer Änderung der Topographie der z-Piezo diese Änderung ausgleicht. Dieser Modus ist vor allem für harte Proben geeignet und bietet im Vergleich zum zweiten Modus eine bessere laterale Auflösung. Bei Verwendung des AC-Modus braucht man noch einen vierten Piezo, der sog. *Shake Piezo*, der die Blattfeder im Bereich der Resonanzfrequenz zum Schwingen anregt. Die Schwingung der Blattfeder weist dabei eine Amplitude A und eine Phasenverschiebung θ zur Anregung auf. Diese beiden Parameter werden ausgelesen und können ebenfalls zur Charakterisierung der Oberfläche herangezogen werden. Bei der Abbildung einer Oberfläche im AC-Modus hält man die Entfernung der Blattfeder zur Oberfläche (*Setpoint*) konstant und wählt die Amplitude (der *Drive*) etwas größer als den Setpoint, sodass die Spitze die Oberfläche kurzzeitig berührt. Ändert sich nun beim Abrastern die Topographie ändert sich die Frequenz der Schwingung. Diese wird nun über eine Rückkopplung wieder auf die Ausgangsfrequenz zurückgestellt, indem der z-Piezo seine Position ändert. Das Höhensignal des z-Piezoes wird dabei benutzt um die Topographie der Oberfläche darzustellen und das Phasensignal, also die Veränderung der Blattfederschwingung zum Anregungssignal, um Aussagen über die Elastizität, Materialeigenschaften, im Allgemeinen über die Energiedissipation zu treffen [82, 83].

KPFM Eine im Vergleich zum Abbilden neue Anwendung ist die Messung von Oberflächenpotentialen mit dem AFM. In diesem Fall wird eine leitende Blattfeder aus Metall oder dotiertem Halbleiter verwendet. Die Schwingungsanregung erfolgt dabei durch das Anlegen einer Wechselspannung an der Blattfeder, die zur Folge hat, dass sich das Potential V in Gl. 3.1 zwischen Oberfläche und Spitze der Blattfeder periodisch ändert. Dabei ist $V_{Oberfl.}$ das zu bestimmende Oberflächenpotential und V_{DC} ein Gleichspannunganteil an der Blattfeder.

$$V = V_{Oberfl.} + V_{DC} + V_{AC} \sin(\omega t) \quad (3.1)$$

Die resultierende Kraft zwischen Blattfeder und Oberfläche ist linear abhängig von der Änderung der Kapazität des Systems (Spitze der Blattfeder und Oberfläche können in guter Näherung als Kondensator angenähert werden) und quadratisch vom Potentialunterschied V . Es ergibt sich somit

$$\begin{aligned} F &= \frac{1}{2} \frac{\partial C}{\partial z} V^2 \\ &= \frac{1}{2} \frac{\partial C}{\partial z} \left\{ \left[(V_{DC} + V_{Oberfl.})^2 + \frac{1}{2} V_{AC}^2 \right] \right\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
& + 2 \left[(V_{DC} + V_{Oberfl.}) V_{AC} \sin(\omega t) \right] \\
& - \left[\frac{1}{2} V_{AC}^2 \cos(2\omega t) \right] \}. \tag{3.2}
\end{aligned}$$

Die Gleichspannung V_{DC} ist dabei ein Regelparameter der die Amplitude der Schwingung nach Gl. 3.2 ungefähr gleich Null setzt, falls $-V_{DC} = V_{Oberfl.}$; der von V_{AC} quadratisch abhängende Term kann vernachlässigt werden. $-V_{DC}$ ist somit das gemessene Oberflächenpotential.

An dieser Stelle ist noch zu bemerken, dass bei Potentialmessungen das Substrat auf Masse gesetzt werden sollte, damit keine Ladungsträger auf dem Substrat die Messung beeinflussen. Im Allgemeinen besteht das elektrische Potential Φ aus zwei Komponenten, dem Voltapotentail Ψ , das von den erwähnten Ladungsträgern stammt, und dem eigentlichen Oberflächenpotential χ [52]:

$$\Phi = \Psi + \chi. \tag{3.3}$$

Außerdem ist das gemessene Oberflächenpotential nicht das wirkliche elektrische Potential Φ , sondern das Arbeitspotential (der elektrische Potentialunterschied) zwischen Spitze der Blattfeder und der Oberfläche. Es sollten also immer differentielle Messungen gemacht werden, sodass der Einfluss des Spitzenmaterials herausgerechnet werden kann.

3.1.2 Kraftspektroskopie

Eine weitere Anwendung des AFMs ist die Kraftspektroskopie. Hierbei werden die Blattfedern nicht zum Schwingen angeregt sondern nur als Sonde benutzt mit der man die Wechselwirkungskraft der Spitze mit verschiedenen Proben untersuchen kann. Mit dieser Methode ist es sehr einfach auf Proteine in ihrer natürlichen, wässrigen Umgebung Zugkräfte auszuüben [84] und sie dabei zu entfalten oder die Kraft bei der Rückfaltung zu messen [85]. Weiterhin kann man die Spitze der Blattfeder chemisch modifizieren um die Wechselwirkungskraft mit verschiedenen Oberflächen kontrolliert zu bestimmen [86]. Dabei werden self-assembled Monolayer aus Alkanthiolen oder Silanen benutzt. Bei der Modifikation mit einzelnen Polymeren ist es sogar möglich eine Sonde zu bauen die immer dasselbe Polymer präsentiert mit dem man viele tausend Kraft-Abstands-Kurven aufnehmen kann. Benutzt man nun diese Sonde für Haftungsmessungen des verwendeten Polymers auf hydrophoben Festkörperoberflächen, so bekommt man häufig typische Kraft-Abstandskurven mit Kraftplateaus bei der Desorption (siehe Abb. 3.2). Da es sich immer um das gleiche

Polymer handelt ist die Verteilung der gemessenen Kräfte auch sehr schmal, da sie nur durch die Schwankungen des Desorptionsprozesses bestimmt ist.

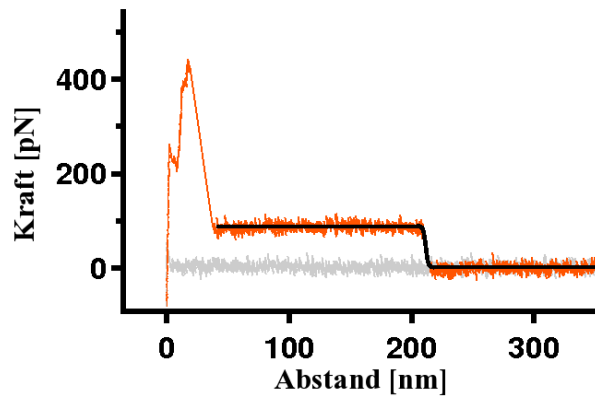


Abbildung 3.2: Kraft-Abstands-Kurve des künstlichen Spinnenseidenproteins (QAQ)₈NR3 auf hydrophobem SAM. Die Kraftkurve ist aufgeteilt in Hinfahrkurve (grau) und Rausfahrkurve (orange). Die schwarze Stufenfunktion ist ein S-Kurven-Fit, der verwendet wird um die Höhe und die Länge des Plateaus bei der Auswertung zu bestimmen.

Der dabei ablaufende Messprozess ist sehr einfach. Eine zu untersuchende Probe wird in eine Flüssigkeitszelle mit einem Volumen von ungefähr drei bis vier Millilitern geklebt (mittels eines lösungsmittelfreien Haftaufklebers, Plano GmbH, oder Vakuurfett) und mit Flüssigkeit umgeben. Daraufhin wird der Chiphalter mit den funktionalisierten Blattfedern in die Zelle gegeben und 20 bis 30 Minuten gewartet; dies ist notwendig, da die Blattfedern beim Eintauchen in die Flüssigkeit stark gebogen werden und erst wieder in die Ausgangslage relaxieren müssen.

Anschließend folgt die Kalibrierung des Systems Blattfeder mit Lichtzeiger. Dabei bestimmt man zuerst die Sensitivität (*InvOLS*; engl.: Inverse Optical Lever Sensitivity) der Blattfeder, ein Umrechnungsfaktor, der es erlaubt die gemessene Spannung an der Photodiode in die Verbiegung der Blattfeder umzurechnen. Daraufhin erfolgt die Messung der Federkonstante der benutzten Blattfeder. Eine genauere Beschreibung der Kalibrierung und möglicher Fehler erfolgen im anschließenden Abschnitt.

Während einer Kraft-Abstands-Kurve wird die Blattfeder an die Probe angenähert bis die Spitze mit ihr in Kontakt kommt und maximal eine vorher bestimmte Verbiegung erfährt. Daraufhin wird die Blattfeder wieder von der Probe entfernt. In Abbildung 3.2 ist eine typische Kraft-Abstandskurve auf einer hydrophoben Probe gezeigt. Bei der Auswertung der Daten wurde an das Plateau eine S-Kurve gefittet und aus den Fitparametern die Höhe des Plateaus, also die Kraft, und die Länge des Plateaus bestimmt.

Die Messungen dieser Arbeit wurden durchgeführt mit dem MFP3D-SA von Asylum Research, Santa Barbara, USA. Es ist ein Multifunktionsgerät, das neben kraftspektroskopischen Experimenten auch für das Abbilden von Oberflächen an Luft und in flüssiger Umgebung geeignet ist. Dabei können auf Grund spezieller Flüssigkeitszellen verschiedene Parameter wie z. B. die Temperatur zwischen den Messungen geändert werden. Bei Verwendung geeigneter Blattfedern sind auch Potentialmessungen und weitere Anwendungen möglich. Die Ansteuerung des MFP3D-SA erfolgt durch IgorPro, Wavemetrics, und besitzt einen zum größten Teil offenen Quellcode. Dies ermöglicht es eigene Prozeduren zu schreiben und das Gerät an die eigenen Bedürfnisse genauer anzupassen.

Zusätzlich wurde im Laufe dieser Arbeit ein AFM nur für kraftspektroskopische Untersuchungen gebaut, das für weitere Modifikationen einen größeren Spielraum lässt als es kommerzielle Geräte im Allgemeinen bieten. Details zum selbstgebaute AFM sind im Anhang C aufgeführt.

3.1.3 Kalibrierung

Der nachfolgende Abschnitt orientiert sich an der Veröffentlichung von Pirzer et al. [87]. Die antreibende Kraft einer mikroskopischen Blattfeder ohne äußere Anregung kommt von der thermischen Energie des umgebenden Mediums. Die dadurch zustande kommende thermische Bewegung der Blattfeder kann benutzt werden um das thermische Rauschspektrum mit dem charakteristischen Frequenzspektrum zu erhalten. Daraus kann nun die Federkonstante einer Blattfeder bestimmt werden, wobei jedoch verschiedene Parameter einfließen die vom jeweils verwendeten Model abhängig sind.

Bei der Cleveland-Methode [72] misst man die Resonanzfrequenz in Abhängigkeit einer Masse (z. B. eine Mikrokugel) die an die Blattfeder angeklebt wird. Die Methode nach Sader [74] benötigt die Resonanzfrequenz und den Q-Faktor der jeweiligen Resonanz. Die im Rahmen diese Arbeit am besten geeignete Methode ist jedoch die Methode des Thermischen Rauschens [75, 76]. In allen drei Fällen ist eine Bestimmung der benötigten Parameter aus dem thermischen Rauschspektrum mit dem Model des einfachen harmonischen Oszillators (SHO) möglich; verwendet man nun flüssige Medien die eine höhere Viskosität haben als Wasser so stellen sich bei allen drei Methoden ähnliche Probleme ein.

Es ist bekannt, dass die Handhabung der Blattfeder in flüssigen Medien das thermische Rauschen dramatisch verändert. In diesem Fall sind die effektive

Masse und der Dämpfungskoeffizient einer Blattfeder frequenzabhängig [88]. Im Folgenden wird an Hand der gebräuchlichsten Fitfunktionen demonstriert, welchen Effekt hoch viskose Lösungen wie 4 M Phosphatpuffer und 70% Glycerollösung auf die resultierenden Werte der Federkonstanten haben. Ausserdem wird gezeigt welche Methode Ergebnisse mit dem geringsten Fehler aufweist.

Verwendete Blattfedern Für die Experimente wurden drei verschiedene Blattfedern mit den Bezeichnungen B-Lever, C-Lever und D-Lever des Chips MLCT-AUHW von Veeco Instr., Santa Barbara verwendet. Diese Blattfedern werden wegen ihrer niedrigen Federkonstanten (d. h. hohe Kraftauflösung) und guten Stabilität standardmäßig für Einzelmolekülexperimente verwendet. Weiterhin wurden Biolever BL-RC150 von Olympus, Japan, verwendet. Auch sie werden bei kraftspektroskopischen Experimenten auf Grund ihrer sehr niedrigen Federkonstanten von 6 pN/nm und ihrer im Vergleich zu den MLCT-AUHW Blattfedern höheren Resonanzfrequenz benutzt.

Viskose Flüssigkeiten Die Messungen wurden in drei Lösungen mit unterschiedlichen Viskositäten durchgeführt. Die Viskositäten der einzelnen Flüssigkeiten wurden mit einem kommerziellen Rheometer (Physika MCR301, Anton Paar, Graz, Österreich) bestimmt und betragen $\eta=0,9$ mPa s für Wasser, $\eta=7$ mPa s für NaH_2PO_4 und $\eta=32$ mPa s für 75% Glycerol in Wasser.

Untersuchte AFMs Weiterhin wurden die Experimente mit drei verschiedenen AFMs durchgeführt. Diese waren das Dimension3100 mit Nanoscope V Controller und dessen Softwareversion v7.20 rl (Veeco Instruments, Santa Barbara, USA), das MFP3D-SA mit Software (Asylum Research, Santa Barbara, USA) und das NANOWIZARD mit SPM Kontrollsoftware 3.1.15 (JPK, Berlin, Deutschland). Jedes der drei Geräte benutzt eine Kamera um die Position der Laserdiode zu kontrollieren. Aus praktischen Gründen wurde für die Messung an den einzelnen Geräten immer ein neuer Chip benutzt, die aber vom selben Wafer stammten. Die Standorte der Geräte waren Mannheim (Dimension3100), Garching (MFP3D-SA) und München (NANOWIZARD). Im folgenden wird nur auf das MFP3D-SA eingegangen, da es im Rahmen dieser Arbeit zum Messen verwendet wurde. Die Ergebnisse für die beiden anderen AFMs können in [87] nachgelesen werden.

Thermisches Rauschspektrum Das MFP3D-SA ermöglicht durch die integrierte Optik ein Sehen des reflektierten Lichts der Laserdiode. Für die

Feineinstellung wurde das Signal der Laserdiode auf dem Photodetektor maximiert. Nach der Annäherung an die Oberfläche wurde die Blattfeder fünfmal auf die Oberfläche gedrückt um die InvOLS in jedem der Fälle zu bestimmen [78]. Nach der Mittelung der fünf InvOLS-Werte konnte das thermische Rauschspektrum durch die Software aufgenommen werden. Das MFP3D-SA hat einen einpoligen 100 Hertz Hochpassfilter als Standard implementiert, kann aber ohne Probleme ausgeschaltet werden. Dieser Filter verursacht bei der Bestimmung der Federkonstante einen Fehler von ca. 3%.

In Abbildung 3.3 sieht man die Rauschspektren eines C-Levers an Luft (schwarz), in Wasser (grün), in 4 M Phosphatlösung (blau) und in 75% Glycerol in Wasser (rot). Die Probleme treten auf, wenn die Resonanzfrequenz 1 kHz oder Werte darunter erreicht (das für kleine Q-Faktoren zutrifft). Dies wird erreicht wenn weiche Blattfedern oder hochviskose Lösungen verwendet werden. Die Resonanzen verschieben sich dabei von 7 kHz an Luft, über 1,1 kHz in Wasser und 0,5 kHz in 4 M Phosphat bis zu 0,2 kHz in 75% Glycerol.

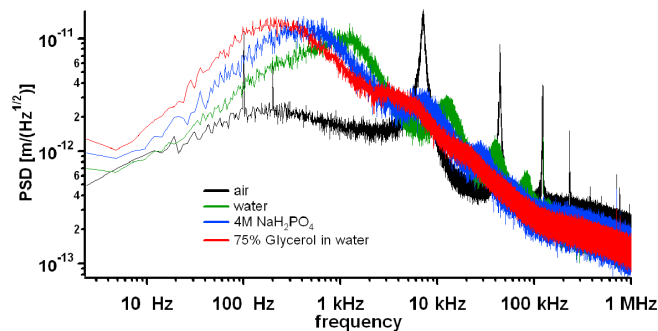


Abbildung 3.3: Rauschspektren für C-Lever in Wasser des MFP3D-SA. Spektren wurden aufgenommen an Luft (schwarz), in Wasser (grün), in 4 M Phosphatlösung (blau) und in 75% Glycerol in Wasser (rot).

Bestimmung der Federkonstante Das MFP3D-SA verwendet die Fitfunktion des SHO-Modells (2.39) als Standard. Die Federkonstante wird durch eine analytische Integration des Fits (2.45) bestimmt. Die Grenzen werden per Hand in der Software auf 2 Hz gesetzt, die der niedrigsten Frequenz des Rauschspektrums entspricht, und als obere Grenze die Frequenz die dem Minimum zwischen dem ersten und zweiten Resonanzpeak entspricht. Für die Auswertung wurden die Daten exportiert und mit selbst geschriebenen Prozeduren in IgorPro (Wavemetrics) ausgewertet. Außerdem wurde für einen Vergleich die im MFP3D-SA implementierte Auswertesoftware verwendet.

In der Software ist auch eine Korrektur durch den sogenannten χ -Faktor vor-

gesehen, der beim MFP3D-SA einen Wert von 0,84 besitzt; optional kann der χ -Faktor vom Experimentator geändert werden. Andere Geräte unterscheiden zwischen der dynamischen und der statischen Federkonstanten, wobei dies zu einem Faktor von 0,971 führt, der zusätzlich zum Faktor χ verwendet wird. Außerdem werden bei manchen Geräten andere Werte für χ verwendet [87]. Für die anschließende Diskussion ist die Korrektur nicht relevant, deswegen wird die Standardeinstellung des MFP3D-SA verwendet.

Die hier bestimmten Federkonstanten wurden durch die Methode des Thermischen Rauschens bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse für die verwendeten viskosen Lösungen variieren dabei sehr stark. Schon für eine Pufferlösung mit 4 M Phosphatsalz unterscheiden sich die Werte um mehr als 20%. Im folgenden werden die Fitfunktionen genauer betrachtet und die Probleme beschrieben die bei der Kalibrierung von Blattfedern entstehen können; speziell für weiche Blattfedern und Flüssigkeiten mit hoher Viskosität. Am Ende wird eine Prozedur vorgeschlagen die die Probleme minimieren kann.

Abbildung 3.4 zeigt wiederum das Rauschspektrum des C-Levers in Wasser. Ausgehend vom neuen Model (2.42) wurden 14 Fitkurven eingefügt, wobei die untere bzw. obere Grenze für den Fit sukzessive verändert wurde. Alle Fits beschreiben das Spektrum ziemlich gut, aber ergeben abweichende Federkonstanten sobald eine numerische Integration unterhalb der Fitkurve angewendet wird. In Tabelle 3.1 sind die Werte aufgetragen, die aus dem neuen Model durch numerische und analytische Integration bestimmt wurden. Die angegebenen Fehler sind die Standardabweichungen bezogen auf die Federkonstante mit der unteren Grenze von 2 Hz bzw. mit der oberen Grenze von 6824 Hz. Es ist eindeutig, dass die numerische Integration nur durchgeführt werden sollte solange die untere Grenze kleiner als ein Drittel der Resonanzfrequenz ist. Die obere Grenze trägt nicht so sehr zum Fehler bei. Das Lorentzmodel und das SHO-Model zeigen eine ähnliche Abhängigkeit für die numerische Integration. Die analytische Integration zeigt hingegen die kleinsten relativen Fehler und ist somit durch eine Verschiebung der Fitgrenzen am geringsten zu beeinflussen.

Abbildung 3.5 zeigt die Rauschspektren des C-Levers in Wasser für das MFP3D-SA mit den resultierenden Fitkurven aus den drei verwendeten Modellen (SHO, Lorentz und dem neuen Model). Alle drei Kurven sind eine gute Beschreibung des Frequenzspektrums, jedoch gibt das neue Model - wie man in Abbildung 3.5 sehen kann - die Resonanzfrequenz richtig aus (aus dem Fit des SHO-Model folgt 1,6 kHz und der Fit des neuen Modells ergibt 1,1 kHz). Tabelle 3.2 fasst die Federkonstanten der drei Balkenfedern B-Lever, C-Lever und D-Lever zusammen; die Federkonstanten wurden dabei durch vier Me-

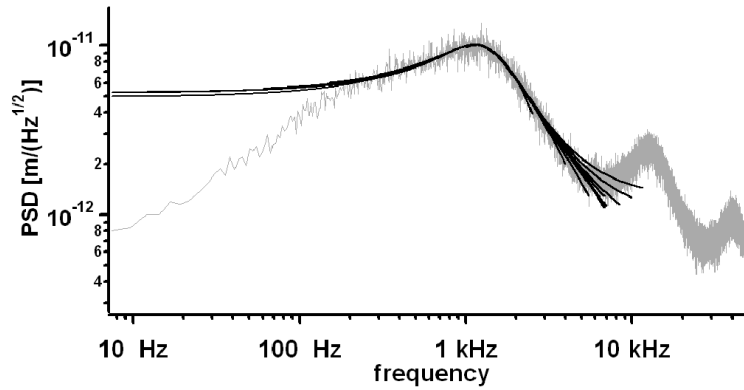


Abbildung 3.4: Das gezeigte Spektrum (grau) zeigt die Resonanzen eines C-Levers in Wasser. Die schwarzen Fits sind 14 Fitkurven nach dem neuen Model, wobei die Grenzen beim Fitprozess sukzessive verändert wurden.

untere Grenze [Hz]	Federkonstante [pN/nm]			
	num. Int.	rel. Fehler [%]	analyt. Int. (Gl. 2.42)	rel. Fehler [%]
2	23	...	22	...
60	23	0	22	0
150	24	4	22	0
300	24	4	21	5
501	26	13	22	0
751	29	26	22	0
1001	35	52	23	5

obere Grenze [Hz]	num. Int.	rel. Fehler [%]	analyt. Int. (Gl. 2.42)	rel. Fehler [%]
2501	27	17	17	30
4001	25	9	21	5
5500	24	5	22	0
6824	23	...	22	...
7000	23	0	22	0
8500	23	0	22	0
10000	22	5	23	5
11500	21	10	23	5

Tabelle 3.1: Das Spektrum in Abbildung 3.4 wurde dreizehnmal mit dem neuen Model gefittet und dabei sukzessive die obere und untere Grenze variiert. Die sich ergebenden Federkonstanten aus dem neuen Model durch numerische und analytische Integration sind inklusive sind hier aufgetragen. Bei der Variation der Grenzen dienten für die Fehlerbestimmung jeweils die untere Grenze von 2 Hz und die obere Grenze von 6824 Hz als Bezugspunkt.

thoden bestimmt, nämlich durch eine analytische Integration des SHO-Fits, durch eine numerische Integration des Fits aus dem neuen Model, durch eine analytische Integration des Fit aus dem neuen Model und durch eine nume-

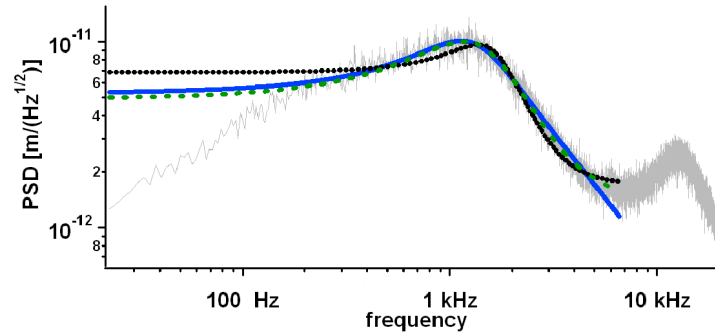


Abbildung 3.5: Das Spektrum (grau) zeigt die Resonanzen eines C-Levers in Wasser. Die erste Resonanz wurde durch drei verschiedene Modelle gefittet, nämlich dem SHO (schwarz gepunktet), dem Standard-Lorentz (grün gestrichelt) und dem neuen Model (blau durchgezogen).

rische Integration des Frequenzspektrums (PSD). Für hochviskose Lösungen sind dabei eindeutig starke Abweichungen zu erkennen.

(a) Wasser: Das MFP3D-SA liefert hier perfekt übereinstimmende Ergebnisse für alle numerische Integrationsmethoden und das neue Model. Nur der Fit des SHO-Modells ergibt einen Wert der um 20% nach oben abweicht.

(b) 4 M Phosphatpuffer: Hier ist schon einen Fehler von mehr als 30% zu sehen, was nicht toleriert werden kann, da die Federkonstante *konstant* bleiben sollte. Die numerische Integration und die analytische Integration mit dem neuen Model reduzieren die Fehler auf ca. 10% für B- und C-Lever. Es ist klar zu erkennen (Abbildung 3.3), dass die Fläche unterhalb des Spektrums für höhere Viskositäten geringer wird (und deshalb die Federkonstante als zu groß bestimmt wird); dies sollte jedoch theoretisch nicht geschehen.

(c) 75% Glycerol in Wasser: In diesem Fall steigt die Abweichung des MFP3D-SA auf 50% und deswegen sollte eine Bestimmung der Federkonstante in so hochviskosen Medien vermieden werden.

Auf Grund der zum Teil enormen Abweichungen von den erwarteten Werten sollte die nachfolgende Prozedur bei der Bestimmung von Federkonstanten eingehalten werden.

Bestimmung von Federkonstanten nach [87] Im ersten Schritt ist die InvOLS zu bestimmen, so dass das gemessene Spannungssignal korrekt in das Amplitudensignal der Blattfeder umgerechnet werden kann. Um dies zu erreichen sollte die InvOLS mindestens fünf mal gemessen und anschließend gemittelt werden, um eventuelle Fluktuationen des einfallenden Lasers und des reflektierten Strahls zu kompensieren. Im zweiten Schritt soll das thermische Rauschen in Flüssigkeiten aufgenommen werden die eine ähnliche Viskosität

Flüssigkeit	Federkonstante [pN/nm]			
	B-Lever			
	analyt. Int.	num. Int.	analyt. Int.	num. Int.
	SHO	neues Model	neues Model	PSD
H ₂ O	42	35	32	34
4M Phosphat	44	38	38	39
75%Glycerol	56	47	47	48
	C-Lever			
	analyt. Int.	num. Int.	analyt. Int.	num. Int.
	SHO	neues Model	neues Model	PSD
H ₂ O	26	22	22	22
4M Phosphat	35	24	24	23
75%Glycerol	49	30	30	30
	D-Lever			
	analyt. Int.	num. Int.	analyt. Int.	num. Int.
	SHO	neues Model	neues Model	PSD
H ₂ O	65	59	60	60
4M Phosphat	70	60	60	60
75%Glycerol	80	72	72	73

Tabelle 3.2: Übersicht der Federkonstanten von drei Blattfedern (B-Lever, C-Lever & D-Lever) in drei verschiedenen Flüssigkeiten (Wasser, 4M Phosphatpuffer & 75% Glycerol in Wasser). Zur Bestimmung der Federkonstante wurden der Fit des SHO-Modells analytisch integriert, das neue Model numerisch und analytisch integriert, und das Spektrum ohne Fit numerisch integriert.

wie Wasser aufweisen; oder falls das Experiment es erlaubt an Luft. Bei Aufnahme in Wasser ist es wichtig, dass die Entfernung der Blattfeder von der Probe im Lauf der Experimente konstant gehalten wird. Es sollte auch darauf geachtet werden, was die niedrigste Frequenz des verwendeten System ist. Für alle hier vorgestellten Modelle und diskutierten Gleichungen muss die Einheit des Rauschspektrums m^2/Hz betragen.

Es sollte das neue Model zur Beschreibung des Spektrums durch eine Fit verwendet und die untere Grenze für den Fit soweit wie möglich minimiert werden. Die sich ergebenden Fitparameter sollten benutzt werden um das thermische Rauschspektrum analytisch zu integrieren. Ausserdem ist es wichtig das Verhalten des verwendeten Instruments im niedrigen Frequenzbereich (kleiner als 1 kHz) zu kennen, da hier das elektronische Rauschen (auch als $1/f$ -Rauschen bekannt) auftritt. Jedoch sollte hierbei nicht einfach ein Hochpassfilter verwendet werden um das Rauschen zu vermeiden, da dies den Fit verzerren kann und somit zu falschen Parametern führt. Falls trotzdem ein hohes elektronisches Rauschen auftritt, sollte die untere Grenze für den Fit nach Tabelle 3.1 angepasst werden.

Falls nun doch Messungen in hochviskosen Medien notwendig sind und die

Bestimmung der Federkonstante in Lösungen mit niedriger Viskosität nicht möglich ist, sind der Fit des neuen Modells und eine analytische Integration eindeutig die beste Wahl. Es muss jedoch beachtet werden, dass trotzdem ein Fehler von 50% entstehen kann.

Der letzte Schritt sollte eine Korrektur der bestimmten Federkonstante sein. Hierzu gibt es verschiedene in der Literatur empfohlene Werte für χ (für eine kleine Auswahl siehe [87]).

Die eindeutig wichtigste Empfehlung ist jedoch die Methode nicht zu ändern mit der man die Federkonstante von Blattfedern bestimmt. Somit hat man wenigstens die Gewährleistung, dass die Werte mit demselben Gerät in derselben Arbeitsgruppe vergleichbar bleiben. Ein guter Test um die Konstanz des Gerätes und der Methode zu testen, ist die Messung der Kraft die man benötigt um doppelsträngige DNA von der B-Konformation in die S-Konformation zu überführen. Die Messung sollte in 10 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA bei Raumtemperatur erfolgen und sollte einen Wert von 65 pN ergeben [89].

Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Verwendung der Sader oder Cleveland-Methode. Aber die Resonanzfrequenz und der Q-Faktor müssten trotzdem noch bestimmt werden. Auch in diesem Fall sollte der Fit des neuen Modells verwendet werden.

3.2 Grenzflächen und deren Eigenschaften

3.2.1 Herstellung der Diamantoberflächen

Die in dieser Arbeit benutzten Diamantoberflächen wurden von der Gruppe um Jose Garrido vom Walter Schottky Institut zur Verfügung gestellt. Sie bestehen aus poliertem polykristallinem Diamant und besitzen auf einer Fläche von $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ eine mittlere Rauigkeit von weniger als 0,3 nm [90]. Hydrophober Diamant wurde dabei erzeugt durch eine Beschichtung mit Wasserstoff. Die statischen Kontaktwinkelmessungen ergaben kurz nach der Präparation einen Wert von ca. 90° .

3.2.2 Herstellung der Self-Assembled Monolayer

Zusätzlich zu den Diamanten wurden noch Self-Assembled Monolayer (SAM) verwendet, da sie eine variable Einstellung der Oberflächenhydrophobizität ermöglichen. Die hydrophoben SAMs aus 1-Dodekanthiol wiesen dabei einen durchschnittlichen Kontaktwinkel von 105° bis 107° auf. Die Einstellung der

Oberflächenhydrophobizität erfolgte durch eine Mischung von 1-Dodekanthiol und 11-Merkapto-1-Undekanol; je nach Mischungsverhältnis wurde ein Kontaktwinkel von ca. 35° bis ca. 100° eingestellt. Die Rauigkeiten der SAMs beliefen sich im Bereich von weniger als zwei Nanometer; die Qualität der SAMs war dabei sehr gut. Ein wichtiges Qualitätsmerkmal bei hydrophoben SAMs ist dabei die Hysterese bei der Messung von vorschreitenden und rückschreitenden Kontaktwinkel bei der dynamischen Messmethode. Bei der exakten Durchführung des Protokolls wird eine Hysterese von 5% erreicht. Ausserdem weisen alle SAMs eine sehr gute Homogenität auf und besitzen keine messbaren Fehler [90].

3.2.3 Bestimmung von Oberflächenenergien

Eine wichtige Eigenschaft eines Festkörpers ist seine Oberflächenenergie (verallgemeinert auf jedes Medium: Grenzflächenenergie) und trägt wesentlich zur Wechselwirkung und somit auch zur Haftung mit anderen Medien bei. Zur Bestimmung der Grenzflächenenergie (Einheit: mJ/m^2) bzw. Grenzflächenspannung (Einheit: mN/m) bestimmt man den Benetzungsgrad einer Festkörperoberfläche durch eine oder mehrere Flüssigkeiten. Bei dieser makroskopischen Messmethode setzt man einen Tropfen einer definierten Flüssigkeit wie zum Beispiel Wasser auf die Oberfläche und misst den sogenannten Kontaktwinkel des Tropfens mit der Oberfläche in einem inerten Medium wie zum Beispiel Luft (siehe Abbildung 3.6).

Zur Messung wurde ein im Rahmen dieser Arbeit selbst gebautes Goniometer benutzt, das es erlaubt neben dem oben erwähnten statischen Kontaktwinkel auch dynamische Kontaktwinkel zu messen. Bei der Auswertung der Bilder (siehe Abbildung 3.6) wurde die auf Java basierende Freeware ImageJ und das DropAnalysis Plug-In benutzt [91]. Dieses Plug-In ermöglicht es den Rand des Tropfens (der Bereich des stärksten Kontrastunterschiedes) zu markieren und durch ein Polynom zu beschreiben. An Hand dieses Polynoms wird eine Tangente an den Berührungspunkt aller drei beteiligter Medien (Oberfläche, Tropfenflüssigkeit und umgebendes Medium wie hier Luft) gefittet und der Winkel mit der Oberfläche bestimmt.

In Abbildung 3.6 ist die per Hand gesetzte Markierung und die daraus errechnete Tangente durch die Farbe Blau verdeutlicht, wohingegen die rote Markierung aus der blauen Markierung und dem Kontrastunterschied des Bildes errechnet wurde; aus der roten Markierung folgt dann schließlich die rote Tangente, deren Wert letztendlich zur Charakterisierung herangezogen wurde.

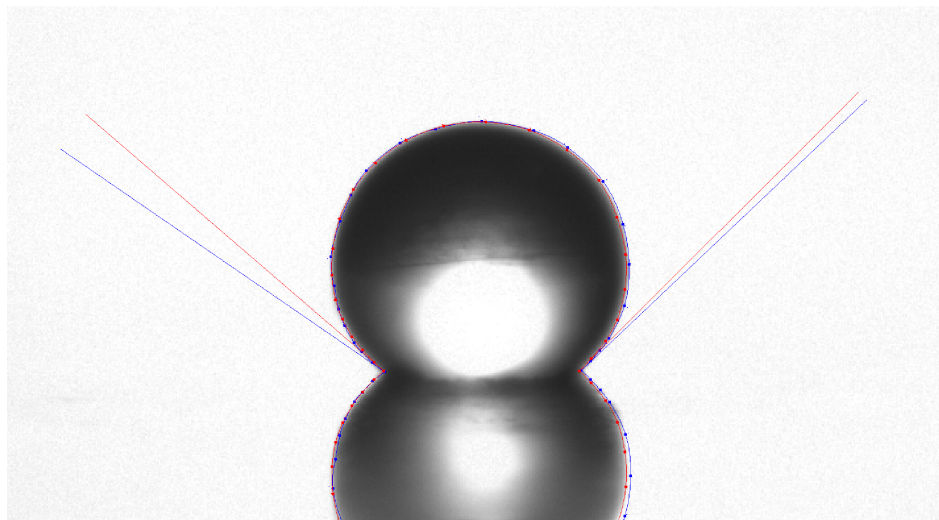


Abbildung 3.6: Wassertropfen auf PTFE. Mit dem Java-basierten Programm ImageJ und des Plugins DropAnalysis wurde der Rand des Tropfens markiert und eine Tangente (blau) an den Berührungspunkt Wasser-Luft-PTFE angefasst. Auf der Basis der Markierung errechnete das Programm eine genauere Markierung und den dazugehörigen Fit (rot).

Aus dem Kontaktwinkel des Tropfens mit der Oberfläche lässt sich dann die Grenzflächenenergie bestimmen (siehe Abschnitt 2.1.4 Benetzung von Oberflächen).

3.2.4 Polymerbrushes

Mit dem Begriff des Polymerbrush ist eigentlich eine Polymerbürste gemeint, aber auf Grund des verbreiteten englischen Begriffs wird in dieser Arbeit der Begriff *Polymerbrush* verwendet. Die Herstellung von Polymerbrushes kann mit einer Vielzahl von verschiedenen Molekülen wie Vinylmonomere, Styrenderivate und Methacrylate durchgeführt werden [92]. Zuerst wird eine Siliziumprobe mit einem fokussierten Elektronenstrahl eines Elektronenmikroskops bestrahlt um darauf reaktive Gruppen zu erzeugen (EBCD, engl.: *electron beam induced carbon deposition*). Dabei werden Kohlenwasserstoffe die schon in der Vakuumkammer vorhanden waren auf dem Silizium deponiert und quervernetzt, wodurch thermische und chemische Stabilität gewährleistet wird. Diese Kohlenwasserstoffe enthalten verschieden funktionelle Gruppen wie C-H, C=O und O-H [93]. Die Unterlage kann dabei neben Silizium auch eine Kohlenstoffunterlage wie z. B. Diamant sein [92, 94].

Im Anschluss wird eine sogenannte selbstinitiierte Photopolymerisation (SIPGP, engl.: *self-initiated photopolymerization and photografting*) aus den Monomeren auf der Unterlage durchgeführt. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht bilden

sich an den Monomeren Radikale die durch Reaktion mit anderen Monomeren für die Polymerisation sorgen. Je nach Dauer der UV-Bestrahlung kann die Höhe eines Brushes eingestellt werden.

Es sind nicht nur einfache Brushes möglich sondern auch Strukturen wie z. B. Brushgradienten, die einen Höhenunterschied entlang des Brushes besitzen. Diese Gradienten werden erzeugt, indem die Dosis des Elektronenstrahls variiert wird, da die Höhe einer Brushes auch von der Elektronenstrahldosis abhängig ist [92].

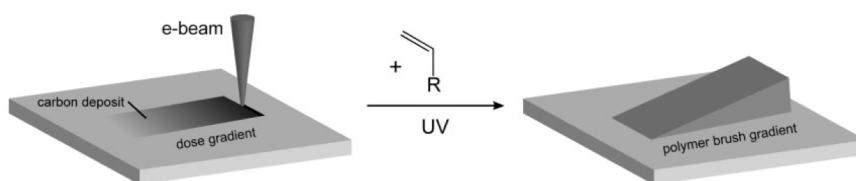


Abbildung 3.7: Herstellung von Polymerbrushgradienten auf Silizium. Die Brushes bilden sich durch UV-induziertes SIPGP aus den vorhandenen Monomeren Quelle: [92].

Ein wesentlicher Vorteil von einem Polymerbrush gegenüber z. B. einem Polymerfilm ist, dass ein Brush schneller reagiert und eine höhere Empfindlichkeit gegenüber externen Stimuli aufweist; außerdem bietet die Polymerschicht eines Brushes eine bessere Zugänglichkeit, sogar für größere Moleküle, und die starke Streckung der Polymere sorgt dafür, dass sie entlang der Oberflächennormalen weniger miteinander verwickelt sind [95, 96].

3.2.5 Polymerteppiche

Zu Anfang wird ein SAM aus Biphenylthiolen auf Gold durch einen Elektronenstrahl quervernetzt; die Dicke des SAMs beträgt in etwa einen Nanometer. Es wurde vor kurzem gezeigt, dass diese makroskopischen, aber nanometerdünnen Nanoschichten mechanisch und thermisch sehr stabil sind [97]. Im Anschluss wird diese Schicht vom Goldsubstrat getrennt und auf einer Siliziumoberfläche deponiert. In diesem Zustand dient es als zweidimensionale Schablone für einen Polymerbrush, der durch eine oberflächeninduzierte Polymerisation (SIP, engl.: *surface-induced polymerization*) gebildet wird; die Polymerisation wird dabei durch UV-Licht vorangetrieben. Die entstehende Schicht ist ein sog. *Polymerteppich*, der ähnlich wie ein richtiger Teppich aus einem weichen Material (Polymerbrush) besteht und an eine dünne aber stabile Unterlage gebunden ist. Die Herstellung von Polymerbrushes durch SIP wurde

in den letzten Jahrzehnten intensiv genutzt und weiterentwickelt [98, 95]. Ein ausführliches Protokoll ist in Anhang A zu finden. Abbildung 3.8 zeigt eine schematische Übersicht der Herstellung eines Polymerteppichs.

Ex situ Studien für Styrenmonomere zeigen, dass die Dicke des Teppichs line-

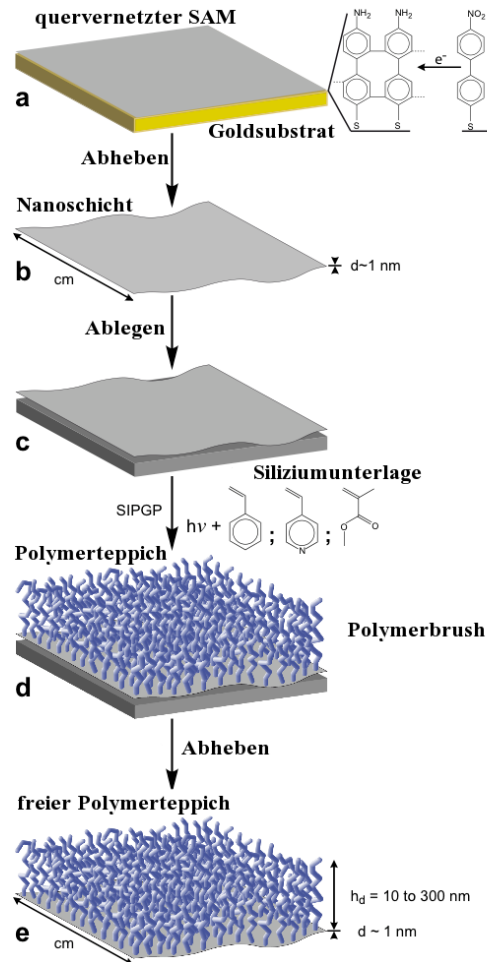


Abbildung 3.8: Schematische Übersicht der Herstellung von Polymerteppichen. Beschreibung siehe Text. Quelle: [99].

ar mit der Bestrahlung durch UV-Licht wächst (35 nm/h innerhalb der ersten vier Stunden); nach mehr als vier Stunden Bestrahlung nimmt die Rauigkeit des Teppichs enorm zu und somit ist die Dicke nicht mehr exakt zu bestimmen [99]. Bei der Herstellung der Polymerteppiche können verschiedene Monomere wie Styren (S bzw. PS für Polystyren), Methylmethacrylat (MMA bzw. PMMA) und 4-vinylpyridin (4VP bzw. P4VP) verwendet werden, wobei das Wachstum des Teppichs für die verschiedenen Monomere unterschiedliche Werte annimmt.

Befinden sich die Polymerteppiche in guten oder schlechten Lösungsmitteln hat dies einen Einfluss auf die Rauigkeit durch Stauchung des Teppichs. Diese signifikante Änderung kann benutzt werden um direkt die Lösungsqualität zu bestimmen.

Auf Grund ihrer Robustheit können Polymerteppiche auch ohne feste Unterlage hergestellt und untersucht werden [99]. Sie sind dabei so robust, dass sie ohne weiteres gegen die Behandlung von verschiedenen Lösungsmitteln, physikalischer Belastung (TEM-Messungen in Ultrahochvakuum, mechanischer und thermischer Belastung) immun sind und mehrerer Monate gelagert werden können.

3.3 Biopolymere

3.3.1 Spinnenseidenprotein (QAQ)₈NR3

Das künstliche Spinnenseidenprotein (QAQ)₈NR3 ist in wässrigen Lösungen nur mit Hilfe von stark chaotropen Stoffen wie Thiocyanate oder Harnstoff löslich. Dies bedeutet, dass das Protein auf Grund seiner Aminosäurezusammensetzung und deren Hydrophobizität entlang der Proteinkette (Abb. 3.9) einen milden hydrophoben Charakter besitzt.

Aminosäuresequenz (QAQ)₈:

MASMTGGQQMGRGSM (GPGQQ GPGQQ GPGQQ GPGQQ GPGQQ GPGQQ GPGQQ GPGQQ)₈

Aminosäurenabfolge in der nichtrepetitiven Sequenz NR3:

GAASAAVSVGGYGPQSSVPVASAVASRLSSPAASSRVSSAVSSLVSSG
PTKHAALSNTISSVVSCVSASNPGLSGCDVLVQALLEVVVSALVSILGS
SSIGQINYGASAQYTQMVGQSVAQALA

Durch die bakterielle Expression besitzt das Protein immer eine Konturlänge von 237 nm, wobei die Länge einer Aminosäure als 0,365 nm angenommen wurde. Da es in der nichtrepetitiven Sequenz ein Cystein besitzt liegt das Protein aber in wässriger Lösung auf Grund einer Schwefelbrücke als Dimer vor und besitzt somit bei voller Streckung eine Länge von 443 nm mit einer Überlappung von 43 Aminosäuren, was einer Länge von ca. 31 nm entspricht. Die beiden Tyrosine in der QAQ-Sequenz besitzen einen pK_S-Wert von 11 [101], was dazu führt, dass das Protein ohne NR3 im basischen pH-Bereich insgesamt

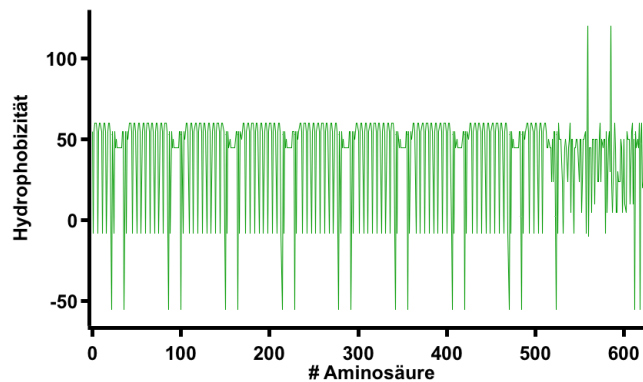


Abbildung 3.9: Hydrophobizität des $(QAQ)_8NR3$ entlang der Kettenlänge. Die verwendete Hydrophobizitätsskala basiert auf [100].

16 negative Ladungen trägt und ansonsten neutral geladen ist. Die vier Ladungen der NR3-Region können für die weiteren Betrachtungen dieser Arbeit vernachlässigt werden. Eine weitere wichtige Eigenschaft des Proteins besteht darin, dass es keine Sekundärstrukturelemente besitzt und somit ungefaltet vorliegt.

3.3.2 Poly-D-Tyrosin

Das verwendete Poly-D-Tyrosin hat ein Molekulargewicht von 40 - 100 kDa (Sigma-Aldrich, Deutschland), wobei die hohe Massendispersität zu beachten ist. Die Ursache hierfür kommt aus der Produktion, da Poly-D-Tyrosin chemisch aus den Monomeren synthetisiert wurde. Dies führt zwar zu Längenänderungen von Experiment zu Experiment, dies spielt aber keine Rolle bei der Bestimmung der Adhäsionskraft. Durch ihren aromatischen Phenolring (Abbildung 3.10) in der Seitenkette des Monomers ist das Polymer sehr hydrophob [101], wird jedoch durch das Aminosäurerückgrat und der Hydroxylgruppe in der Seitenkette etwas vermindert. Jedoch unterstützt die Hydroxylgruppe das Lösen des Poly-D-Tyrosins ungemein, da sich der Phenolring durch seinen pK_S -Wert von 11 [101] laden lässt und somit in wässrigen Lösungen bei pH-Werten größer als 11 gut löslich ist (wie zum Beispiel in 1 M NaOH). Anschließend lässt sich das gelöste Poly-D-Tyrosin gut in wässrige Lösungen überführen die keine basischen pH-Werte besitzen. Poly-D-Tyrosin liegt in wässrigen Lösungen bei sehr niedrigen Konzentrationen ohne Sekundärstruktur vor, wobei es bei hoher Konzentration eine antiparallele β -Faltblatt-Struktur besitzt. In organischen Lösungsmitteln liegt Poly-D-Tyrosin vorwiegend als α -Helix vor [102].

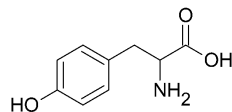


Abbildung 3.10: Monomer des Poly-D-Tyrosins.

3.3.3 Poly-L-Lysin

Das verwendete Poly-L-Lysin hat ein Molekulargewicht von 30 bis 70 kDa (Sigma Aldrich, Deutschland) und ist auf Grund seiner Amino-Gruppen in der Seitenkette sehr gut wasserlöslich. Der dazugehörige pK_S -Wert beträgt 11 [101], was dazu führt, dass die Amino-Gruppe im physiologischen und sauren Bereich ständig protoniert und Poly-L-Lysin ungefaltet vorliegt. Erst bei Deprotonierung im basischen pH-Bereich faltet Poly-L-Lysin in eine α -Helix [103].

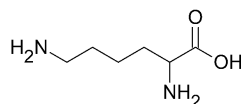


Abbildung 3.11: Monomer des Poly-L-Lysins

3.4 Chemische Modifikation von Blattfedern

Bei der Arbeit mit einzelnen Polymere stellen sich zu allererst die Fragen: Woher weiß man, dass man nur mit einem Polymer misst? Woher weiß man, dass es das gewollte Polymer ist? Die Antworten auf diese Fragen sind die kontrollierte Herstellung einer Einzelmolekülsonde und die Verwendung eines *Fingerabdrucks*. Die Spitzen der Blattfedern werden deshalb speziell mit einem gewollten Polymer funktionalisiert. Zuerst müssen das Material der Blattfeder (Siliziumnitrit) mit Sauerstoffplasma aktiviert werden, damit ein Aminosilan-SAM aufgebracht werden kann. Diese aminofunktionalisierten Blattfedern werden anschließend mit zwei verschiedenen Sorten Polyethylenglykol (PEG) beschichtet. Beide PEGs sind an einem Ende der Kette auf Grund eines Aktivesters (NHS) aminoreaktiv und können dadurch an die Blattfeder kovalent anbinden. Am anderen Ende der Kette besitzen sie unterschiedliche Endgruppen, Methyl bzw. NHS. An den zweiten Aktivester kann schließlich ein Polymer mit einer vorhandenen Aminogruppe binden. Ein wesentlicher Punkt dieser Prozedur ist, dass der pH-Wert des Lösungsmittels für das PEG neutral gehalten wird, da bei basischeren Werten eine Hydrolyse des Esters stattfindet[104].

Der Anteil der PEG-Sorte mit Methyl-Endgruppe sollte dabei sehr hoch sein,

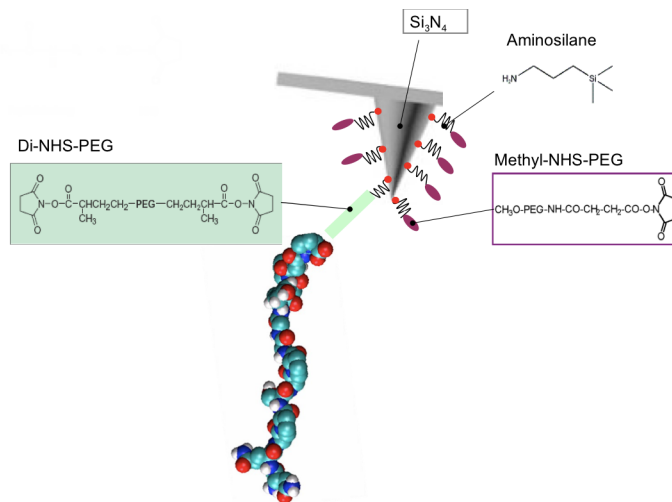


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung einer mit einem Polymer modifizierten Blattfeder. Die Spitze aus Siliziumnitrit wird mit einem Aminosilan beschichtet und an deren Aminogruppe zwei Sorten PEG (Methyl-PEG-NHS und Di-NHS-PEG) gebunden. Das Polymer wird anschließend an die freie NHS-Gruppe des Di-NHS-PEGs gebunden.

damit wenig NHS-Gruppen als aktive Kopplungsgruppe frei sind. Auf Grund dieser Konkurrenzreaktion der PEGs kann die Dichte des Polymers an der Blattfeder kontrolliert werden. Ausserdem dient das Methyl-PEG zur Passivierung der Spitze, um eine geringe Wechselwirkung der Blattfeder mit den zu untersuchenden Proben zu gewährleisten[10]. Die kovalente Kopplung der Passivierungsschicht und des Sondenpolymers führen auch dazu, dass sich die Messzeit mit ein und derselben Blattfeder sich enorm verlängert; eine gut funktionierende Sonde ist über viele Stunden oder auch einige Tage verwendbar. Daraus folgt eine bessere Statistik und eine bessere Vergleichbarkeit der Messparameter, da immer mit demselben Polymer gemessen wird. Abbildung 3.12 zeigt eine schematische Darstellung einer funktionalisierten Blattfeder. Die genauen Details zur Funktionalisierung kann im Anhang A nachgelesen werden.

Kapitel 4

Hydrophobe Adhäsion und Hofmeistereffekte

Das Volumen des Festkörpers schuf Gott, die Oberfläche wurde vom Teufel gemacht.
(Wolfgang Pauli)

Die Motivation für die Untersuchung des hydrophoben Effekts besteht aus zwei Aspekten:

- Die Adhäsionskraft von stark geladenen Polymeren auf geladenen Oberflächen ist zum großen Teil abhängig von der elektrostatischen Anziehung. Werden die vorhandenen Ladungen abgeschirmt, die Coulombanziehung ist also gleich Null, gibt es trotzdem noch eine nicht zu vernachlässigende Adhäsion. Woher kommt dieser Anteil?
- Bei der Erzeugung von Spinnenseide im Spinnkanal einer Spinne erfolgt ein Austausch von Ionen und eine Änderung des pH-Wertes. Dies führt zur Selbstassemblierung der beteiligten hydrophoben Proteine zu einem Spinnenfaden. Auf Grund des möglichen Nutzens der Spinnenseide als vielseitiges Material ist es wünschenswert den grundlegenden Mechanismus zu verstehen.

4.1 Ionenspezifische Effekte

Hofmeister hat bereits im 19. Jahrhundert festgestellt wie wichtig Salze für die Stabilität von Proteinlösungen sind. Um die Ursache für das Ausfallen zu verstehen müssen zuerst die einzelnen Parameter wie die Art des Salzes,

die Konzentration der einzelnen Salze, der pH-Wert der Salzlösung und die Rangordnung der Salze bei gemischten Elektrolytlösungen untersucht werden.

Ionenabhängigkeit

Als Oberfläche wurde ein hydrophober SAM aus 1-Dodecanthiol auf Gold verwendet. Die verwendete Einzelmolekülsonde bestand aus dem künstlichen, ungefalteten Spinnenseidenprotein $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$. Die Hydrophobizität der Oberfläche wurde vor und nach den Haftmessungen durch die Messung des statischen Kontaktwinkels von reinem Wasser auf diesem SAM bestimmt; der Winkel betrug 105° . Tabelle 4.1 zeigt die gemessenen Adhäsionskräfte des Proteins auf dem SAM für verschiedene Salze aus der Hofmeister-Reihe. Da den Anionen ein größerer Einfluss auf die Wechselwirkung zugesagt wird (siehe Abschnitt 2.6 Hoffmeistereffekt), wurden nur Natriumsalze verwendet und dadurch ein möglicher Einfluss des Kations verhindert. Die benutzten Salze beinhalten in etwa zu gleichen Teilen kosmotrope wie auch chaotrope Ionen. Die Konzentration wurde dabei bei 1 M konstant gehalten um deren Einfluss auszuschließen. Coulomb-Kräfte können ebenfalls vernachlässigt werden, da die Konzentration ausreicht, um alle vorhandenen Ladungen abzuschirmen [86]. Weiterhin wurden Salze verwendet deren Anion immer aus Chlorid bestand, um den Einfluss des Kations auf die Adhäsionskraft zu untersuchen. Die Anordnung der Salze richtet sich nach der Hofmeister-Reihe (siehe Abschnitt 2.6 Hoffmeistereffekt).

Alle Datenpunkte wurden mit einer einzigen Blattfeder gemessen, wobei sich ein Datenpunkt aus dem Mittelwert aus mindestens 100 Kraftwerten zusammensetzt. Werden zwei Datenpunkte mit unterschiedlichen Parametern verglichen, stellt dies einen Vergleich zweier unabhängiger Experimente dar. Da aber immer dieselbe Blattfeder verwendet wurde besteht nur einer Unsicherheit von 2%. Werden zwei Datenpunkte verglichen die mit zwei unterschiedlichen Blattfedern gemessen wurden so muss ein Fehler von 13% angenommen werden [27]. In Tabelle 4.1 ist deshalb der Fehler des Datenpunktes für NaH_2PO_4 größer als die anderen angegebenen Fehler.

Es ist zu sehen, dass die gemessenen Desorptionskräfte mit steigender Kosmotropizität der Anionen größer werden (Tabelle 4.1 a). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Werten sind dabei sehr klein und bewegen sich im Rahmen des Messfehlers. Eine Analyse der Kraftwerte für NaF und NaClO_4 mit einem t-Test ergab für die Nullhypothese 'die Mittelwerte für NaF und NaClO_4 sind gleich' eine Wahrscheinlich von weniger als 0,0001. Obwohl der ionenspezifi-

Salz	Kraft [pN]	
		(a)
NaF	87±2	↑ kosmotrope Anionen
NaH ₂ PO ₄	79±8	
NaCH ₃ COO	84±2	
NaHCO ₃	84±2	
NaCl	83±2	
NaBr	80±2	
NaI	79±2	
NaSCN	80±2	
NaClO ₄	80±2	
		(b)
CaCl ₂	86±2	↓ chaotrope Kationen
NaCl	83±2	
KCl	84±2	
		kosmotrope Kationen

Tabelle 4.1: Adhäsionskräfte von (QAQ)₈NR3 auf einem hydrophoben SAM bei verschiedenen Salzen. (a) Die Anionen sind von unten nach oben nach der Hofmeister-Reihe geordnet, wobei die Kosmotropizität in Pfeilrichtung ansteigt. (b) Die Kationen sind von oben nach unten nach der Hofmeister-Reihe geordnet. Die Pfeilrichtung zeigt die Kosmotropizität.

sche Einfluss bei einmolaren Salzlösungen sehr klein ist, kann dieser Effekt beobachtet werden. Für den Fall der Kationen (Tabelle 4.1b) kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, da der t-Test für die Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese 'die Mittelwerte für CaCl₂ und KCl sind gleich' 0,49 beträgt.

Konzentrationsabhängigkeit

Die Daten von Hofmeister zeigen, dass die verschiedenen Salze bei unterschiedlichen Konzentrationen die verwendeten Proteine oder Partikel ausfällen. Aus diesem Grund wurden drei für die Hofmeister-Reihe repräsentative Salze ausgewählt, um die Abhängigkeit der Haftkraft von (QAQ)₈NR3 auf hydrophobem SAM (Kontakwinkel 105°) von der Konzentration der Salze zu bestimmen. Abbildung 4.1 zeigt die Desorptionskräfte für Natriumiodid, Natriumchlorid und Natriumdihydrogenphosphat für Konzentrationen im Bereich von 0,05 M und 4 M; die Abhängigkeit ist dabei linear: $F_{des} = F_0 + mC$, mit der Salzkonzentration C . Die Parameter der linearen Fits sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Die angegebenen Fehler sind die Unsicherheiten beim durchgeführten Fitprozeß.

Der Offset F_0 ist die extrapolierte hydrophobe Kraft für reines Wasser und sollte für alle Salze identisch sein. Die Messreihen mit Natriumiodid und Natriumchlorid wurden mit ein und derselben Blattfeder durchgeführt; somit kann

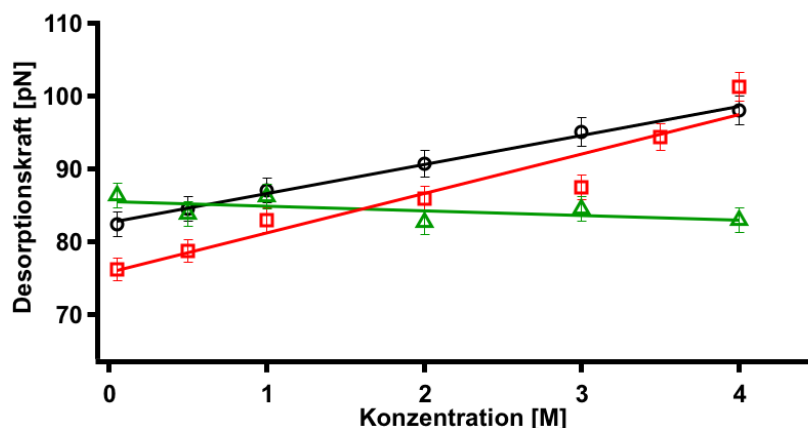


Abbildung 4.1: Desorptionskraft von $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ in den drei wässrigen Salzlösungen NaI (Δ , grün), NaCl (\circ , schwarz) und NaH_2PO_4 (\square , rot) bei jeweiligen Konzentrationen von 0,005 M und 4 M; die Datenpunkte wurden jeweils linear gefittet. Die angegebenen Fehler betragen 2% (siehe Text). Die verwendete Oberfläche war ein hydrophober SAM.

bei deren Vergleich eine Unsicherheit von 2% angenommen werden. Die Messreihe mit Natriumdihydrogenphosphat wurde mit einer zweiten Blattfeder bestimmt, was dazu führt, dass bei einem Vergleich mit den beiden anderen eine Unsicherheit von 13% angenommen werden muss; innerhalb der Messreihe ist der Fehler 2%. Die Unterschiede in den Offset-Werten spiegeln die Unsicherheiten bei der Bestimmung der Federkonstanten für verschiedene Blattfedern wieder; und somit auch die Unsicherheit der absoluten Kräfte.

Parameter	Offset F_0 [pN]	Steigung m [pN M ⁻¹]
NaI	$85,6 \pm 0,9$	$-0,6 \pm 0,4$
NaCl	$82,7 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,1$
NaH_2PO_4	$75,9 \pm 1,8$	$5,4 \pm 0,7$

Tabelle 4.2: Übersicht der Parameter des linearen Fits für die Desorptionskräfte von $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ auf einem hydrophoben SAM in den drei wässrigen Salzlösungen NaI, NaCl und NaH_2PO_4 bei jeweiliger Konzentration von 0,005 M bis 4 M. Die angegebenen Fehler sind die Unsicherheit des Fitprozesses.

Die lineare Abhängigkeit von der Konzentration ist eindeutig zu sehen und ist qualitativ konsistent mit der konzentrationsabhängigen Hofmeister-Reihe. Bei höheren Salzkonzentrationen ist die Abhängigkeit der Desorptionskraft von der Art des Salzes deutlich besser zu erkennen als bei physiologischen Konzentrationen bis zu einem Mol pro Liter.

Verallgemeinerung auf hydrophobe Oberflächen unterschiedlichen Materials Die bisher gezeigten Messungen wurden nur auf hydrophoben SAMs durchgeführt. Ob das lineare Verhalten der Desorptionskraft sich auf

Parameter	Offset F_0 [pN]	Steigung m [pN M ⁻¹]
Diamant, NaCl	75,3±1,2	5,4±1,2
Diamant, NaI	79,2±4,0	-1,6±1,5
SAM, NaCl	82,7±0,3	4,0±0,1
SAM, NaI	85,6±0,9	-0,6±0,4

Tabelle 4.3: Übersicht der Parameter des lineare Fits für die Desorptionskräfte von (QAQ)₈NR3 auf den hydrophoben Oberflächen SAM und Diamanten in wässriger NaCl- und NaI-Lösung im Konzentrationsbereich bis 4 M. Die angegebenen Fehler sind die Unsicherheit des Fitprozesses.

andere hydrophobe Oberflächen verallgemeinern lässt, wurde an Hand eines wasserstoffterminierten Diamanten getestet. Abbildung 4.2 zeigt einen Vergleich der Messdaten für (QAQ)₈NR3 auf hydrophoben SAM und Diamanten. Die Datenreihen für beide Oberflächen zeigen eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration; die Steigungen der beiden Fits sind innerhalb der Ungeauigkeit des Fits identisch (siehe Tabelle 4.3). Die Werte der einzelnen Reihen wurden mit jeweils derselben Blattfeder gemessen was wieder einen Fehler von 2% zur Folge hat. Die absoluten Werte unterscheiden sich auf Grund der Unsicherheit bei der Bestimmung der Federkonstanten verschiedener Blattfedern.

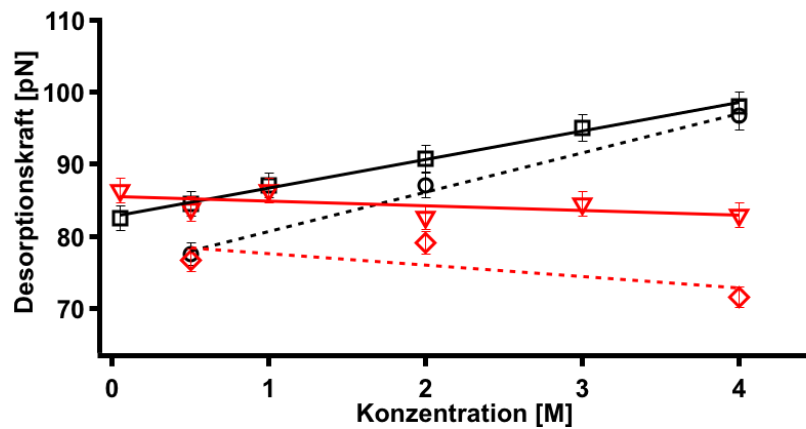


Abbildung 4.2: Desorptionskraft von (QAQ)₈NR in wässriger NaCl- (schwarz) und NaI-Lösung (rot) in einem Konzentrationsbereich bis 4 M auf zwei unterschiedlichen Oberflächen, nämlich hydrophoben Diamanten (○ and ◇) und hydrophoben SAM (□ und ▽). Der angegebene Fehler ist 2%.

Einfluss des pH-Wertes Bei der Untersuchung eines möglichen pH-Wert-Einflusses muss bedacht werden, dass bei einer Änderung des pH-Wertes sich die Valenz der Pufferionen ändert oder bei Verwendung von nicht puffernden Elektrolytlösungen kein definierter pH-Wert vorliegt. Eine unterschiedliche Valenz würde eine stärkere Hydrathülle des Ions und einen anderen

Platz in der Hofmeister-Reihe zur Folge haben. Nichtsdestotrotz wurde für das $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ und einem hydrophoben SAM aus 1-Dodecanthiol auf Gold die pH-Abhängigkeit untersucht. Die verwendeten Puffer waren NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 und Na_3PO_4 mit einer jeweiligen Konzentration von 0,5 Mol pro Liter. Abbildung 4.3 zeigt die erhaltenen Desorptionskräfte. Die Werte wurden mit denselben Blattfedern gemessen weshalb ein Fehler von 2% verwendet wird. Es ist deutlich zu sehen, dass die Kräfte sich nicht ändern. Ausserdem

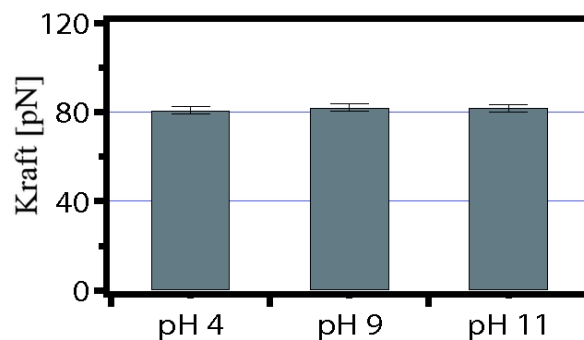


Abbildung 4.3: Desorptionskraft von $(\text{QAQ})_8\text{NR}$ auf hydrophoben SAM in Abhängigkeit vom pH-Wert. Für die Einstellung des pH-Wertes wurden die Puffersalze NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 und Na_3PO_4 in Wasser verwendet. Die Konzentration betrug jeweils 0,5 M. Die angegebenen Fehler sind 2%.

wurden noch NaCl -Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten verwendet, um einen etwas größeren pH-Bereich mit mehr Datenpunkten abzudecken. Zum Einstellen des pH-Wertes wurde konzentrierte Salzsäure bzw. Natronlauge verwendet; die pH-Werte wurden vor und nach dem Experiment mit einem pH-Meter gemessen und blieben in diesem Zeitrahmen konstant. Abbildung 4.4(a) zeigt die Desorptionkräfte für das $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ und einem hydrophoben SAM aus 1-Dodecanthiol auf Gold über einen pH-Bereich von ca. 2 bis 11. Wird der hydrophobe SAM durch eine hydrophobe Diamantoberfläche ausgetauscht zeigt sich dasselbe Verhalten und die Desorptionskraft bleibt konstant. Bei diesen Messungen wurden verschiedene Blattfeder verwendet und die Standardabweichung abhängig von der Anzahl der Messpunkte durch die Student t-Funktion korrigiert.

Gemischte Elektrolytlösungen

Bisherige Messungen konzentrierten sich auf Salzlösungen mit nur einem einzigen Salz. Je nach Eigenschaft des Salzes, wie seiner Position in der Hofmeister-Reihe ergab sich ein anderes Verhalten in der Desorptionskraft in unterschiedlichen Konzentrationen. Es stellt sich nun die Frage welches Salz bei einer

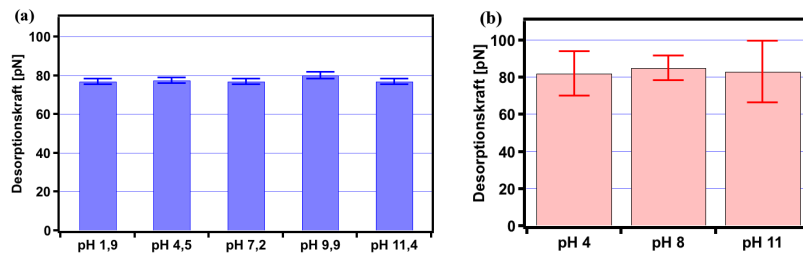


Abbildung 4.4: Links: Desorptionskraft von (QAQ)_sNR auf hydrophoben SAM in Abhängigkeit vom pH-Wert. Für die Einstellung des pH-Werts in der 1 M NaCl-Lösung wurde Salzsäure verwendet. Der angegebene Fehler ist 2%. Rechts: Desorptionskraft von (QAQ)_sNR auf hydrophoben Diamanten in Abhängigkeit vom pH-Wert. Für die Einstellung des pH-Werts wurden die Puffersalze NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ und Na₃PO₄ in Wasser verwendet. Die Konzentration betrug jeweils 0,5 M. Die blauen Balken sind die mit verschiedenen Blattfedern gemessenen Kräfte und die roten Balken deren Mittelwerte. Der angegebene Fehler ist 13%.

Mischung aus kosmotropem und chaotropem Salz einen größeren Einfluss auf die Desorptionskraft besitzt.

Tabelle 4.4 zeigt die Desorptionskräfte für Poly-D-Tyrosin auf einem hydro-

Lösungsmittel	H ₂ O	3 M NaCl	3 M NaCl & 1,5 M NaI	3 M NaCl & 3 M NaI
Kraft [pN]	71,0±1,4	83±1,7	81±1,6	87,4±1,7

Tabelle 4.4: Übersicht der Desorptionskräfte von Poly-D-Tyrosin auf einem hydrophoben SAM in verschiedenen wässrigen Salzlösungen, nämlich 3 M NaCl, 3 M NaCl mit 1,5 M NaI, 3 M NaCl mit 3 M NaI und reinem Wasser. Der angegebene Fehler ist 2%.

phoben SAM aus 1-Dodekanthiol auf Gold in reinem Wasser, 3 M NaCl und zwei Mischungen aus 3 M NaCl mit 1,5 M NaI und 3 M NaCl mit 3 M NaI. Die Datenreihe wurde mit einer einzigen Blattfeder gemessen, wodurch sich ein Fehler von 2% ergibt. Abbildung 4.5 zeigt den Verlauf der Kräfte abhängig von der Konzentration der Natriumionen. Es ist sehr gut zu sehen, dass das NaCl die Desorptionskraft erhöht, jedoch bei Zugabe von NaI (rötlich hinterlegter Bereich) die Desorptionskraft kein linear ansteigendes Verhalten mehr zeigt; die Änderung ist größer als die Messunsicherheit und dies lässt auf einen Einfluss der Iodidzugabe und der Konzentrationserhöhung von Natrium vermuten.

4.2 Einfluss der Kettenpolarität

Das bisher benutzte System bestand im wesentlichen aus einem hydrophoben Biopolymer, das von einer hydrophoben Oberfläche desorbiert wurde; und zwar in wässriger Lösung. Die hydrophobe Adhäsion sollte daher nicht nur von

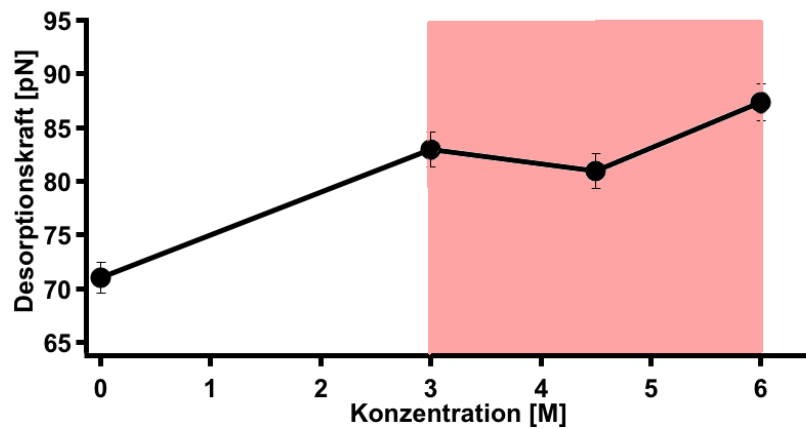


Abbildung 4.5: Die Desorptionskraft von Poly-D-Tyrosin auf einem hydrophoben SAM in gemischten Salzlösungen; in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration (schwarz). Im weiß hinterlegten Bereich wurde nur die Konzentration von NaCl erhöht und im rot hinterlegten Bereich nur die Konzentration von NaI. Die Linien sollen den Trend der Datenpunkte zeigen. Der angegebene Fehler ist 2%.

einer Änderung des Lösungsmittels (siehe oben), sondern auch durch die Verwendung verschiedener polarer bzw. unpolarer Polymere beeinflusst werden. Abbildung 4.6 fasst gemessene Desorptionskräfte von drei verschiedenen Biopolymeren, nämlich dem Spinnenseidenprotein $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ und den Polyamino-säuren Poly-D-Tyrosin und Poly-L-Lysin zusammen; die Desorptionskräfte sind Mittelwerte aus mehreren Experimenten. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden für den jeweiligen Mittelwert nur Messungen auf hydrophobem SAM aus 1-Dodekanthiol auf Gold in 1 M NaCl verwendet. Die Standardabweichungen der Mittelwerte wurden wieder durch die Student t-Funktion in Abhängigkeit der Anzahl der Datenpunkte korrigiert. Ungeachtet des ange-

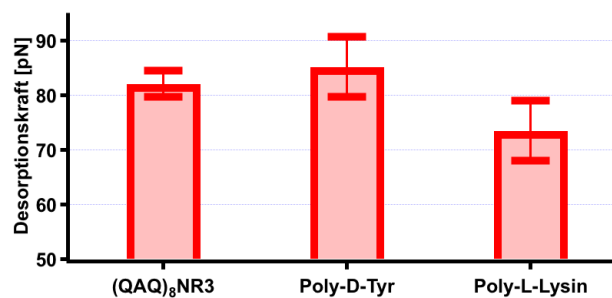


Abbildung 4.6: Gemittelte Desorptionskräfte von drei verschiedenen Biopolymeren, $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$, Poly-D-Tyrosin und Poly-L-Lysin, im Vergleich auf hydrophoben SAMs. Der angegebene Fehler ist 13%.

gebenen Fehlers sieht es so aus als würde das Poly-D-Tyrosin etwas stärker

haften als das Spinnenseidenprotein. Beide Polymere sind hydrophob und in 1 M NaCl so gut wie unlöslich. Erstaunlicherweise zeigt das sehr polare Polymer Poly-L-Lysin eine Desorptionskraft die sich nicht sehr stark von den beiden hydrophoben Polymeren unterscheidet; der Unterschied beträgt ungefähr nur 10 pN, also in etwa die Messunsicherheit.

Um den Unterschied in der Polarität bzw. Hydrophobizität zu verdeutlichen ist in Abbildung 4.7 die Hydrophobizität des Poly-D-Tyrosins (blau), des Poly-L-Lysins (rot) und des $(\text{QAQ})_8\text{NR}_3$ (grün) entlang der Polymerkette aufgetragen. Die schwarze Kurve ist die geglättete Hydrophobizität des $(\text{QAQ})_8\text{NR}_3$; der Prozess des Glättens erfolgte dabei über fünf Aminosäuren. Die Hydrophobizität richtet sich dabei nach der Hydrophobizitätsskala von D. Urry[100]. Die Hydrophobizität des Spinnenseidenproteins liegt dabei ungefähr zwischen dem sehr hydrophilen Poly-L-Lysin und dem sehr hydrophoben Poly-D-Tyrosin, und kann als mild hydrophob eingestuft werden.

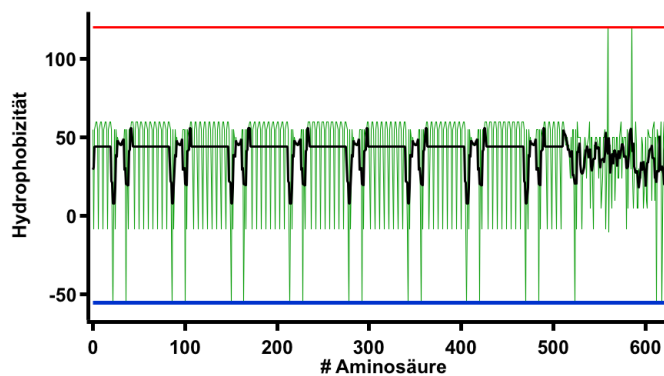


Abbildung 4.7: Hydrophobizität der Biopolymere $(\text{QAQ})_8\text{NR}_3$ (grün), Poly-D-Tyrosin (blau) und Poly-L-Lysin (rot) entlang deren Kettenlänge. Beim $(\text{QAQ})_8\text{NR}_3$ wurde die Hydrophobizität über fünf Aminosäuren geglättet (schwarz). Die verwendete Hydrophobizitätsskala basiert auf [100].

Verallgemeinerung auf die Konzentrationsabhängigkeit Der Einfluss der Kettenpolarität bei einer Konzentration von 1 M NaCl scheint sehr klein zu sein bzw. ist innerhalb der Messungenauigkeit nicht vorhanden. Die hydrophobe Haftung wird aber durch erhöhte Zugabe von Salz durch den Hofmeister-Effekt verstärkt. Abbildung 4.8 zeigt die Desorptionskräfte von Poly-D-Tyrosin und von $(\text{QAQ})_8\text{NR}_3$ auf hydrophobem SAM aus 1-Dodekantiol auf Gold in Abhängigkeit von der Konzentration des NaCl. Jede Datenreihe wurde mit nur einer Blattfeder gemessen und somit ist der Fehler innerhalb der Datenreihe 2%. Bei einem Vergleich der Datenreihen, also der absoluten Kräfte, muss jedoch wieder ein Fehler von 13% angenommen werden.

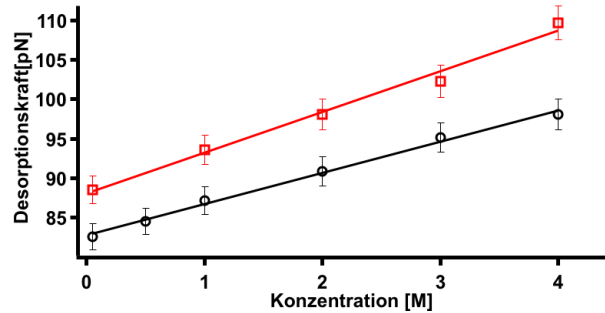


Abbildung 4.8: Desorptionskräfte von (QAQ)₈NR3 (○, schwarz) und Poly-D-Tyrosin (□, rot) auf hydrophobem SAM in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration. Die angegebenen Fehler sind 2%.

Parameter	Offset F_0 [pN]	Steigung m [pN M ⁻¹]
(QAQ) ₈ NR3	82,7±0,3	4,0±0,1
Poly-D-Tyrosin	88,1±0,8	5,1±0,3

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Parameter des linearen Fits in Abbildung 4.8. Die angegebenen Fehler sind die Unsicherheiten des Fitprozesses.

Der Unterschied der Offsets der Datenreihen ist bedingt durch die Messunsicherheit von 13%. Es ist aber trotzdem nicht wahrscheinlich, dass Poly-D-Tyrosin stärker haftet. Die Steigung der Desorptionskräfte für Poly-Tyrosin ist dabei etwas höher als für (QAQ)₈NR3; für die Fitparameter siehe Tabelle 4.5.

Kapitel 5

Grenzflächen

*Die Tiefe muss man verstehen. Wo? An der Oberfläche.
(Hugo von Hofmannsthal)*

5.1 Grenzflächenabhängigkeit der Adhäsion

Variation der Oberflächenhydrophobizität

Die Messung von Kontaktwinkeln (siehe Abschnitt 3.2.3) ist eine etablierte Methode, um die Grenzflächenenergien von Festkörpern zu messen. Daher wurde untersucht welcher Zusammenhang zwischen der Messung des makroskopischen Kontaktwinkels und der Adhäsionskraft der verwendeten Biopolymere besteht. Als Sondenmoleküle wurden diesmal $(\text{QAQ})_8\text{NR}_3$, Poly-D-Tyrosin und Poly-L-Lysin verwendet. Die verwendeten SAMs waren sogenannte Misch-SAMs die aus einer Mischung von 1-Dedekanthiol (Endgruppe CH_3) und 11-Meraptoundekanol (Endgruppe OH) auf Gold bestanden. Durch verschiedene Mischungsverhältnisse bei der Herstellung der SAMs konnte das Verhältnis der beiden Endgruppen auf der Oberfläche kontrolliert werden; je höher der Anteil an Hydroxylgruppen desto hydrophiler wird der SAM.

Abbildung 5.1 zeigt die Desorptionskräfte von $(\text{QAQ})_8\text{NR}_3$ in Abhängigkeit von den Misch-SAMs. Die roten Datenpunkte sind die ursprünglichen Werte aus allen Experimenten auf SAMs in 1M NaCl mit $(\text{QAQ})_8\text{NR}_3$ als Sondenpolymer. Die schwarzen Datenpunkte sind Mittelwerte aus ausgewählten Bereichen der Kontaktwinkel. Die Standardabweichungen der Mittelwerte wurden mit der Student t-Funktion in Abhängigkeit von der Anzahl der Messpunkte korrigiert. Die Kontaktwinkel wurden vor und nach jeder Kraftmessung bestimmt, um sicher zu gehen, dass die Winkel konstant blieben. An Hand der Daten sieht es so aus, als ließe sich die Abhängigkeit der Desorptionkraft durch

eine Stufenfunktion beschreiben, deren Wendpunkt bei ca. 65° liegt. Es lässt sich aber keine lineare Abhängigkeit ausschließen.

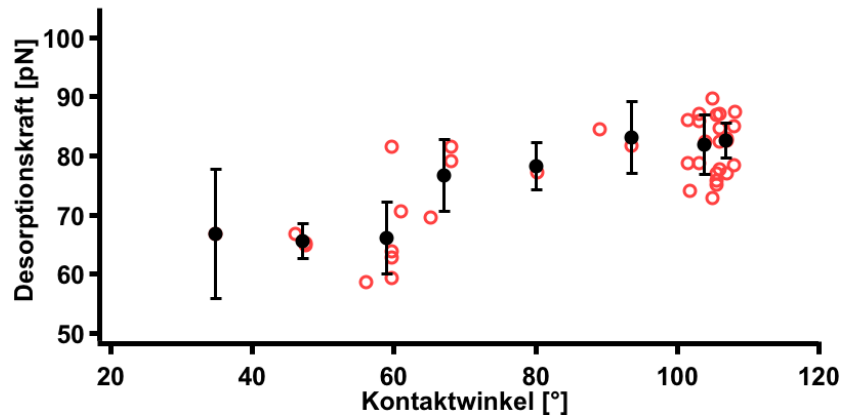


Abbildung 5.1: Desorptionskräfte von $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ in 1 M NaCl in Abhängigkeit vom Kontaktwinkel der verwendeten Oberfläche. Der Kontaktwinkel wurde durch Verwendung von Misch-SAMs variiert. Die erste Datenreihe (o, rot) besteht aus Datenpunkten bestimmt mit vielen verschiedenen Blattfedern. In der zweiten Datenreihe (•, schwarz) wurden die Kräfte aus der ersten Datenreihe für gleiche Kontaktwinkel innerhalb deren Unsicherheit gemittelt und der Fehler aus der jeweiligen Standardabweichung inklusive Korrektur durch die Student t-Funktion korrigiert.

Verallgemeinerung auf verschiedene Aminosäuren Die Datenreihen für das Poly-D-Tyrosin und dem Poly-L-Lysin auf den Misch-SAMs zeigen keine stufenförmige Abhängigkeit mehr, sondern sind lediglich linear abhängig vom Kontaktwinkel. Die Datenpunkte wurden jeweils mit einer einzigen Blattfeder bestimmt und somit beträgt der Fehler jeweils 2%. Beim Vergleich der beiden Datenreihen muss ein Fehler von 13% herangezogen werden.

Grenzflächen verschiedener Aggregatzustände

Abbildung 5.3 zeigt die Desorptionskräfte von Poly-D-Tyrosin von verschiedenen hydrophoben Grenzflächen in reinem Wasser wie PTFE, SAM (1-Dodekantil auf Gold), Chloroform und Luft. Die Grenzflächenenergien γ_{SL} betragen 28 mJm^{-2} für Chloroform und 73 mJm^{-2} für Luft [24]. Für den SAM wurde der Kontaktwinkel zu $\theta = 107^\circ \pm 1^\circ$ bestimmt, der mit der Young-Dupré Gleichung 2.11 zu einer Grenzflächenenergie von $\gamma_{SL} = 46 \text{ mJm}^{-2}$ führt. Der Kontaktwinkel von PTFE war $\theta = 140^\circ \pm 1^\circ$, wodurch es schon als superhydrophob bezeichnet werden kann. Die zugehörige Grenzflächenenergie beträgt $\gamma_{SL} = 75 \text{ mJm}^{-2}$, die aber im Vergleich zum Literaturwert von $\gamma_{SL} = 50 \text{ mJm}^{-2}$ zu hoch ist. Die Ursache hierfür ist höchstwahrscheinlich der Kontaktwinkel der durch eine Luftschicht oder durch eine Schicht aus Luftblasen auf der

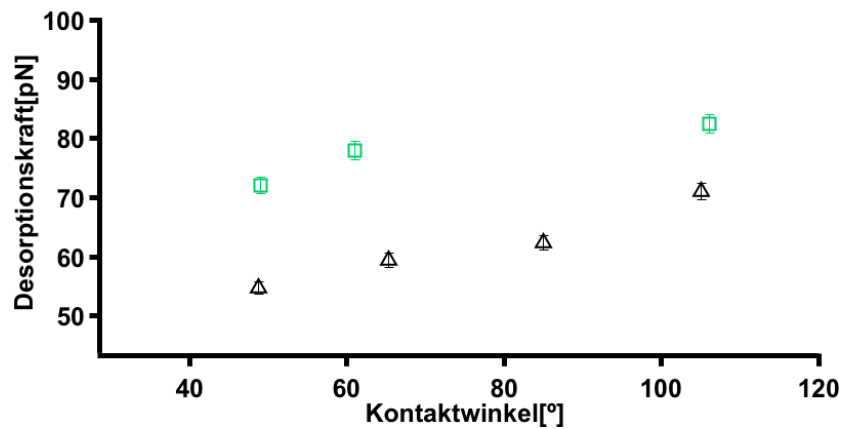


Abbildung 5.2: Desorptionskräfte von Poly-D-Tyrosin (\square , grün) und Poly-L-Lysin (\triangle , schwarz) in 1 M NaCl-Lösung in Abhängigkeit vom Kontaktwinkel der verwendeten Oberfläche. Der angegebene Fehler ist jeweils 2%.

sehr rauhen PTFE-Oberfläche beeinflusst wurde. Die Luftschicht verändert die Reflektivität des PTFE und kann mit dem bloßen Auge beobachtet werden; einzelne Luftblasen sind auch durch die eingebaute Kamera des AFMs zu erkennen. Die Histogramme für die Desorptionskräfte auf PTFE zeigen zwei ausgezeichnete Maxima bei einer Kraft von 86 pN, die in guter Übereinstimmung mit der gemessenen Kraft an der Luft-Wasser-Grenzfläche ist (siehe Abb. 5.3). Der zweite Wert betrug 70 pN und wurde für die Abbildung 5.3 und für die weitere Diskussion benutzt.

Um an Grenzflächen wie Chloroform oder Luft messen zu können, wurden

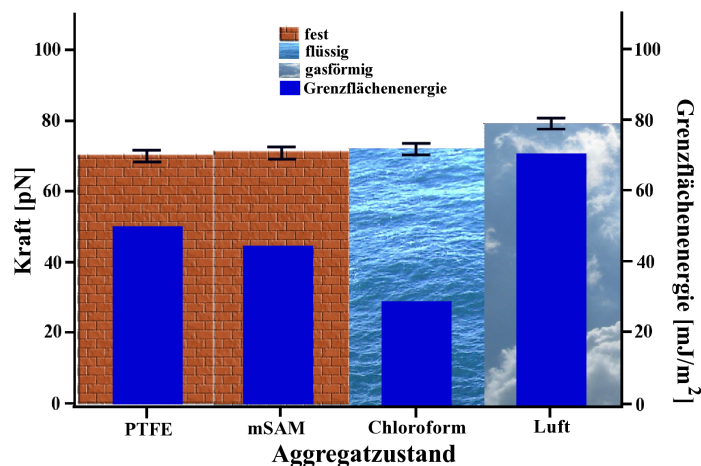


Abbildung 5.3: Desorptionskräfte von Poly-D-Tyrosin für die Grenzflächen PTFE, hydrophober SAM, Chloroform und Luft, jeweils in reinem Wasser (bebilderte Balken). Die blauen Balken zeigen die Grenzflächenenergie für die jeweilige Grenzfläche. Der angegebene Fehler ist 2%.

Blasen aus Chloroform bzw. Luft auf einem hydrophoben SAM oder auf PTFE mit einer Pipette abgesetzt. Nach einer ausreichenden Wartezeit waren die Grenzflächen equilibriert und keine störenden Schwingungen mehr vorhanden. Die Messungen wurden mit derselben Blattfeder durchgeführt, womit der Fehler 2% beträgt. Abbildung 5.3 zeigt sehr klar, dass die Desorptionskraft (bebilderte Balken) in keinsten Weise dem Verhalten der Grenzflächenenergie (dunkelblaue Balken) folgt. Obwohl sich die Grenzflächenenergie bezogen auf Chloroform um mehr als 100% ändert, bleibt die Desorptionskraft fast konstant. Auch der Aggregatzustand der benutzten Medien hat nur einen kleinen Einfluss.

5.2 Effekt des Lösungsmittels

Eine weitverbreitete Methode zur Reduzierung der Grenzflächenenergie und zur Abschwächung der Hydratation von Partikeln ist die Verwendung von Ethanol-Wasser-Mischungen. Abbildung 5.4 zeigt die Desorptionskraft von Poly-D-Tyrosin auf einem hydrophoben SAM aus 1-Dodekantiol auf Gold, aber diesmal in Abhängigkeit vom Molenbruch des Ethanols in Wasser (rote Kurve). Bei einem Molenbruch von 20% Ethanol in Wasser hat sich die Desorp-

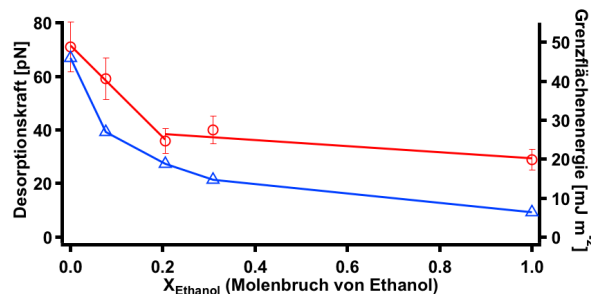


Abbildung 5.4: Desorptionskraft von Poly-D-Tyrosin auf hydrophobem SAM in Abhängigkeit vom Molenbruch von Ethanol in Wasser (rot). Die blaue Kurve zeigt die Grenzflächenspannung des verwendeten SAM für den jeweiligen Molenbruch von Ethanol in Wasser. Der angegebene Fehler ist 13%.

tionskraft, bezogen auf den Ausgangswert in reinem Wasser, bereits um 50% verringert; das Verhalten der Kurve ist hier linear. Wird nun weiter Ethanol hinzugefügt ändert sich die Desorptionskraft nur noch schwach bis schließlich ein minimaler Wert von ca. 29 pN erreicht wird. An dieser Stelle hat sich die Kraft im Vergleich zum SAM in reinem Wasser um 60% verändert. Der Verlauf der Datenreihe ist im Bereich ab ca. 30% Ethanol wieder linear, was auf zwei Regime hindeutet; es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass das

Verhalten ein exponentielles oder polynomies Verhalten zeigt. Der angegebene Fehler beträgt 13%.

In Abbildung 5.4 ist zusätzlich die Grenzflächenenergie des SAMs in der jeweiligen Ethanol-Wasser-Mischung aufgetragen (blaue Kurve). Die Bestimmung erfolgte dabei über die Messung der Kontaktwinkel der benutzten Ethanol-Wasser-Mischungen. Der Verlauf der Grenzflächenenergie ist dabei dem Verlauf der Desorptionskraft ähnlich. Dieser Trend unterscheidet sich aber vom Verhalten der Desorptionskraft an so unterschiedlichen Grenzflächen wie Chloroform-Wasser und Luft-Wasser. Dieser Unterschied wird deutlich wenn man sich die Zusammenfassung in Tabelle 5.1 genauer betrachtet.

Lösungsmittel	Substrat	$X_{Ethanol}$	γ_{SL} [mJm ⁻²]	F_{des} [pN]
H ₂ O	Luft	0	73 [24]	79 ± 10
H ₂ O	PTFE	0	50 [24]	70 ± 9
H ₂ O	SAM	0	46	71 ± 9
H ₂ O	Chloroform	0	28 [24]	72 ± 9
H ₂ O & EtOH	Luft	0,1	43 [105]	60 ± 8
H ₂ O & EtOH	SAM	0,1	27	59 ± 8
H ₂ O & EtOH	SAM	0,2	19	36 ± 5
H ₂ O & EtOH	SAM	0,3	15	40 ± 5
EtOH	SAM	1	6	29 ± 4
Luft	SAM	0	25 [24]	26 ± 3

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Desorptionskräfte von Poly-D-Tyrosin in verschiedenen Lösungsmitteln und an unterschiedlichen Grenzflächen. Der angegebene Fehler ist 13%.

Kapitel 6

Umgebungssensitive Grenzflächen

*Der Vorteil von Klugheit besteht darin, dass man sich dumm stellen kann. Das Gegenteil ist schon schwieriger.
(Kurt Tucholsky)*

Die bisher verwendeten Grenzflächen dienten dazu die Adhäsion eines einzelnen Polymers auf Festkörperoberflächen und an hydrophoben Grenzflächen zu untersuchen. Ein sehr interessanter, aber auch wichtiger Aspekt, ist der Einfluss von vielen Polymeren auf die Adhäsion bzw. Kohäsion. Aus diesem Grund wurden noch einige umgebungssensitive Polymerbrushes auf ihre hydrophoben Eigenschaften untersucht.

6.1 Festkörpergebundene Polymerbrushes

Topographie der Polymerbrushes Umgebungssensitive Polymere zeigen oberhalb ihres LCST einen hydrophoben Kollaps (siehe Abschnitt 2.7 Strukturkräfte); dabei ändert sich das Volumen und sie werden hydrophob. Es stellt sich nun die Frage ob dieses Verhalten erhalten bleibt, wenn Polymere wie Poly(dimethyl-aminoethylmetacrylat) (PMAEMA) als Polymerbrush vorliegen. Abbildung 6.1(a) zeigt einen Gradientenbrush aus PMAEMA auf Silizium abgebildet in reinem Wasser im AC-Modus. An ihrer dicksten Stelle besitzt der Brush eine Höhe von ca. 100 nm. Im AC-Mode berührt die Spitze der Blattfeder die abzubildende Oberfläche und somit wirkt eine Kraft auf den Brush, die für eine Stauchung sorgt. Um diese zu verhindern muss mit sehr niedrigem Drive und Setpoint abgebildet werden. Der verwendete Brush zeigte

bei Erhöhung der Temperatur auf mehr als 50°C keine Änderung in der Höhe; die Form des Gradienten blieb ebenfalls unverändert.

Wird nun der Drive erhöht, steigt auch die Kraft stark an, welche auf den

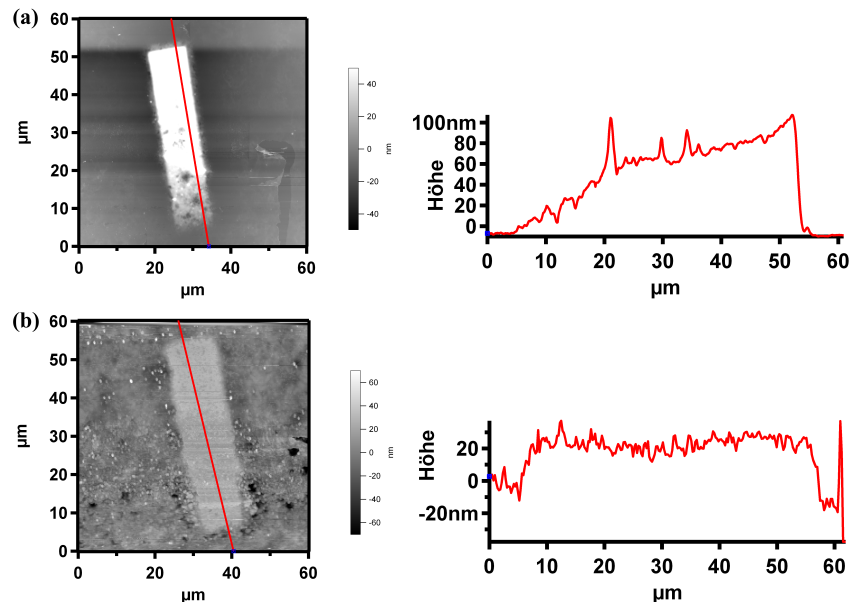


Abbildung 6.1: (a) Höhenbild und Ausschnitt (rote Linie) eines PMAEMA-Brushes auf Silizium. (b) Höhenbild derselben Probe wie bei a), jedoch nach mehreren Abbildungen und höherem Drive.

Brush wirkt. An dieser Stelle setzt eine Deformation ein und die Höhe reduziert sich auf 20 nm bis 30 nm. Bildet man nun bei diesem erhöhten Drive erneut bei verschiedenen Temperaturen ab, bleibt die Höhe wieder konstant, aber weiterhin bei einem Wert von 20 nm bis 30 nm (Abb. 6.1(b)).

Die Siliziumprobe mit Brush wurde in einer temperierbaren Flüssigkeitszelle fixiert und die Temperatur sukzessive nach jeder erfolgten Abbildung erhöht. Die Anpassung der Temperatur erfolgte durch die Software des MFP3D-SA und erfolgte innerhalb weniger Minuten, es wurde jedoch nach jeder Änderung eine Zeitspanne von 30 Minuten gewartet, damit sich das Messsystem equilibrieren konnte. Es wurde auch bei jeder neuen Temperatur die Resonanzfrequenz der benutzten Blattfeder (AC240TS von Olympus) bestimmt.

Das elektrische Potential von temperatursensitiven Polymerbrushes Theoretische Untersuchungen durch MD-Simulationen zeigen, dass hydrophobe Grenzflächen einen elektrischen Potentialunterschied zwischen Grenzschicht und Wasser im Volumen besitzen (siehe Abschnitt 2.5 Hydratation). AFM-basierte Potentialmessungen (KPFM; engl. Kelvin Probe Force Micros-

copy) an hydrophoben SAMs haben ebenfalls ein elektrisches Potential ergeben; jedoch muss man bei Verwendung des AFMs für KPFM darauf achten, dass das gemessene Potential dem Arbeitspotential zwischen der untersuchten Probe und der Spitze der Blattfeder darstellt. Aus diesem Grund sollten relative Messungen durchgeführt werden, damit der Einfluss des Spitzenmaterials keine Rolle mehr spielt.

Temperatursensitive Polymerbrushes sind für diese relativen Messungen sehr gut geeignet. Die Probenoberfläche bleibt konstant, es wird somit kein Material oder Lösungsmittel ausgetauscht, weiterhin misst man an ein und derselben Stelle der Probenoberfläche und Verunreinigungen werden vermieden. Gleichzeitig kann man aber die Hydrophobizität und somit die Löslichkeit drastisch ändern. Abbildung 6.2 zeigt links das Höhenbild eines Polymerbrushes in Form einer Blüte und auf der rechten Seite ist die Probe als Potentialbild zu sehen; das Potentialbild gibt die Struktur des Polymerbrushes gut wieder, wobei die Ränder etwas unscharf sind.

Die verwendeten Polymerbrushes bestehen aus PMAEMA; der LCST-Wert,

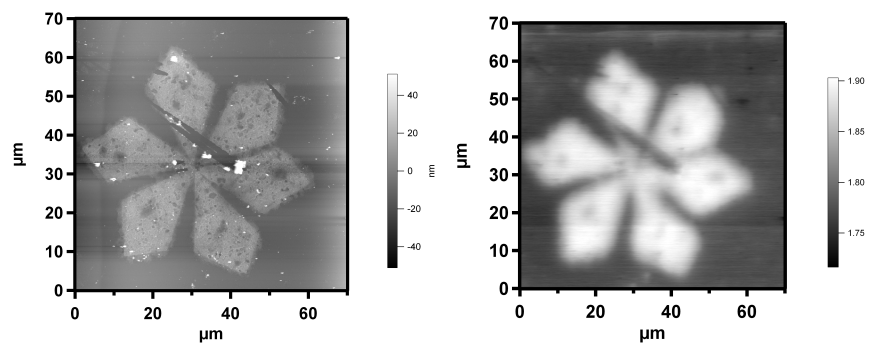


Abbildung 6.2: Höhenbild (links) und Potentialbild (rechts) eines PMAEMA-Brushes auf Silizium.

bestimmt für PMAEMA in Lösung liegt bei ca. 50°C . Der Untergrund war wieder Silizium, jedoch wurde eine andere Probe benutzt als im Abschnitt vorher. Die Potentialmessung konnte nicht in Wasser durchgeführt werden, da die elektrische Anregung der Schwingung in Flüssigkeit nicht möglich war. Die verwendete Blattfeder AC200TS-SP von Olympus (Japan) hatte eine Federhärte von 9 N/m und eine Resonanzfrequenz an Luft von 150 kHz ; das verwendete Material der Blattfeder war halbleiterdotiertes Silizium.

Die Erwärmung der Probe erfolgte nicht wie im vorangegangenen Kapitel über eine Erwärmung der umgebenden Lösung, sondern durch eine spezielle temperierbare Messzelle mit Peltierelement. Die Siliziumunterlage wurde auf einem Metallplättchen mit Leitsilber fixiert, das Metallplättchen selber wurde in der

Messzelle magnetisch fixiert. Durch das Leitsilber war auch ein guter Wärmefluss gegeben. Zusätzlich wurde an der Siliziumunterlage ein Draht befestigt, der mit einer Spannungsquelle verbunden war. Damit wurde die gemessene Probe auf die Masse des AFMs gelegt. Außerdem war es dadurch möglich ein externes Potential an die Probe anzulegen.

Die Temperatur wurde wieder nach jeder Abbildung erhöht und eine Zeitspanne von 30 Minuten gewartet, damit sich das Messsystem equilibrieren konnte. Abbildung 6.3(a) zeigt ausgewählte Histogramme der abgebildeten Oberflächen für die Temperaturen 28°C (rot), 60°C (blau) und 30°C (grün); die Messung bei 30°C wurde am Ende der Temperaturreihe von 28°C bis 60°C durchgeführt. Die Histogramme umfassen dabei jeden Potentialwert einer Abbildung. Das grüne und das rote Histogramm liegen dabei nicht im gleichen Bereich was eindeutig auf eine Drift hinweist. Dies ist auch zu erwarten, da während der Abbildung an der Spitze der Blattfeder Material der Probe adhärert und sich dadurch das Arbeitspotential zwischen Oberflächen und Spitze ändert.

Das Potential Φ_1 ist dabei das elektrische Potential des Siliziumuntergrundes und das zweite Potential Φ_2 das elektrische Potential des Brushes. Der Potentialunterschied $\Delta\Phi = \Phi_2 - \Phi_1$ ist somit der bessere Parameter um den Einfluss der Temperatur auf das elektrische Potential zu messen. Abbildung 6.3(b) zeigt dieselben Histogramme, aber das Potential des Siliziums ist auf Null gesetzt worden. In dieser Darstellung ist auch eindeutig zu erkennen, dass $\Delta\Phi$ für dieselbe Probentemperatur (rot und grün) konstant bleibt. Der Potentialunterschied wird aber größer bei einer Temperatur von 60°C (blau). Die temperaturabhängige Änderung ist dabei ca. 50 mV. Der dritte zu erkennende Potentialwert links bei ca. -40mV ist nicht eindeutig zuzuordnen.

In Tabelle 6.1 sind alle gemessenen Potentialwerte, ohne Offset, für die jeweiligen Temperaturen zusammengefasst. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte bestimmt durch einen Gauß-Fit der Histogramme und der angegebene Fehler ist die sich aus dem Fit ergebende Standardabweichung. Bei einer Temperatur von 28°C wurde ein externes Potential von 2,07 V (das Voltapotentiale; siehe Abschnitt 3.1.1 Abbilden und Potentialmessung) angelegt, um zu testen wie das gemessene Potential des Polymerbrushes durch das angelegte Voltapotentiale verändert wird. Das gemessenen Potentiale Φ_1 und Φ_2 verschieben sich ziemlich genau um den Wert des Voltapotentiale, der Potentialunterschied $\Delta\Phi$ wird aber nicht beeinflusst. Die zeitliche Reihenfolge der Temperaturmessungen verläuft in Tabelle 6.1 dabei von oben nach unten.

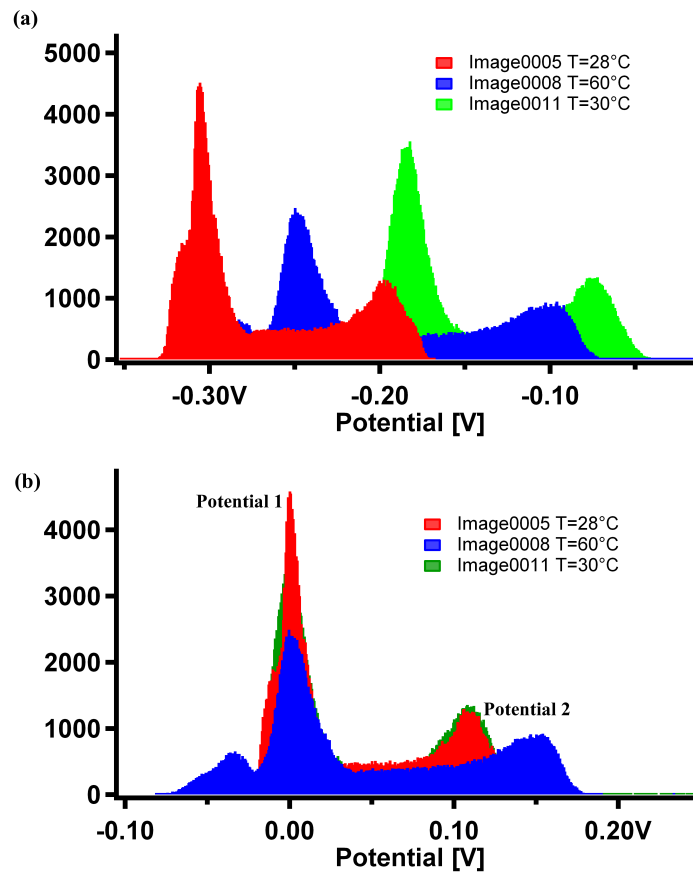


Abbildung 6.3: Histogramme der gemessenen Potentiale für die Temperaturen 28°C (rot), 60°C (blau) und 30°C (grün). (a) Originaldaten (b) Die Daten wurden mit dem globalen Maximum auf ein Potential von Null verschoben.

Temp. [°C]	Potential 1 Φ_1 [V]	Potential 2 Φ_2 [V]	Potentialunterschied $\Delta\Phi = \Phi_2 - \Phi_1$	externes Potential
28	$-0,307 \pm 0,005$	$-0,199 \pm 0,007$	$0,108 \pm 0,007$	Masse
28	$1,770 \pm 0,005$	$1,870 \pm 0,010$	$0,100 \pm 0,010$	2,07
45	$-0,286 \pm 0,005$	$-0,154 \pm 0,011$	$0,132 \pm 0,011$	Masse
60	$-0,246 \pm 0,006$	$-0,106 \pm 0,011$	$0,142 \pm 0,011$	Masse
30	$-0,185 \pm 0,006$	$-0,079 \pm 0,009$	$0,106 \pm 0,009$	Masse

Tabelle 6.1: Zusammenfassung aller aus den Histogrammen ermittelten Potentialwerte ohne Offset. Der Potentialunterschied ist die Differenz der beiden Potentiale 1 und 2. Ein externes Potential wurde nur bei einer Temperatur von 28°C angelegt; ansonsten war die Probe immer auf Masse. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus einem Gauß-Fit der Histogramme und die Fehler die sich aus dem Fit ergebenden Standardabweichungen.

6.2 Freistehende Polymerbrushes: Polymerteppiche

Polymerteppiche sind eigentlich freistehende Polymerbürsten, die auf einem vernetzten SAM aufgebracht sind; dieser SAM liefert auch die mechanische

Stabilität und strukturelle Integrität. Sie werden aber auf Grund ihrer Morphologie als *Polymerteppiche* bezeichnet. Die folgenden Daten entstammen einer Zusammenarbeit mit Dr. Marin Steenackers aus der Arbeitsgruppe von Rainer Jordan¹ und Ihsan Amin aus der Arbeitsgruppe von Armin Götzhäuser². Ein Polymerteppich aus Poly(4-vinylpyridin) auf einer Unterlage aus Silizium wurde in Ethanol (einem guten Lösungsmittel) mit dem AFM im AC-Modus abgebildet. Der 150 nm dicke Polymerteppich war wie erwartet sehr flach mit einer mittleren Rauigkeit von 5,1 nm, ohne dass eine Stauchung zu sehen war (Abb. 6.4(a)).

Hingegen in Wasser bei einem pH-Wert von 7, einem schlechten Lösungsmittel

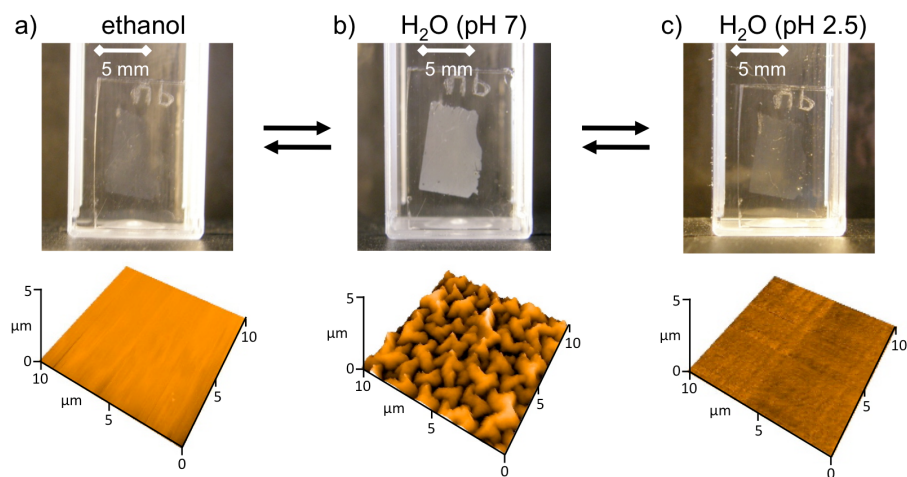


Abbildung 6.4: Fotos (oben) und Abbildungen mit dem AFM (unten) von P4VP-Teppichen in (a) Ethanol, (b) Wasser pH 7 und (c) Wasser bei pH 2,5 (HCl).

für Poly(4-vinylpyridin), zeigt der Polymerteppich eine starke Stauchung auf Grund eines Kollapses der Polymerbürste. Die Rauigkeit erhöhte sich dabei auf einen mittleren Wert von 273 nm (Abb. 6.4(b)). Durch eine wiederholte Auswechslung der Lösungsmittel neutrales Wasser und Ethanol (3x) zeigte sich, dass die starke Änderung in der Rauigkeit des Polymerteppichs komplett reversibel ist, ohne dass sich Defekte bilden.

P4VP reagiert auch auf Änderungen im pH-Wert; bei einem pH-Wert kleiner als $pK_S=5,5$ liegt die Pyridin-Gruppe protoniert vor, wobei Wasser dadurch zu einem guten Lösungsmittel wird. In Abbildung 6.4(b)-(c) ist zu sehen, dass sich bei einem Wechsel von pH 7 zu pH 2,5 die Stauchung des Polymerteppichs auflöst.

¹Wacker-Lehrstuhl für Makromolekulare Chemie, TU München und Professur für Molekulare Chemie, Department Chemie, TU Dresden

²Physik supramolekularer Systeme, Universität Bielefeld

Der Polymerteppich hat eine Dicke von nur 150 nm, zeigt aber lateral makroskopische Ausdehnung. Dies macht es möglich den Übergang in der Morphologie auch mit dem bloßem Auge zu sehen. In Abbildung 6.4 zeigen die photographierten Bilder den Polymerteppich mit Glas als Unterlage in den drei benutzten Lösungsmitteln. In Ethanol ist der P4VP-Teppich transparent und fast unsichtbar, wohingegen in Wasser pH 7 der Polymerteppich lichtundurchlässig wird. Der Umschlag kommt von der Streuung des Lichts durch die rauhen Grenzflächen aus Lösungsmittel, Polymer und Glasoberfläche. In Wasser bei pH 2,5 (HCl) wird die Probe wieder transparent. Durch Beobachtung mit dem bloßem Auge kann man erkennen, dass die Änderung der Morphologie auf jeden Fall unterhalb einer Sekunde stattfindet.

Kapitel 7

Diskussion

*Um die Wahrheit zu finden, muss man diskutieren.
(Peter Weiss, dt. Schriftsteller)*

7.1 Hydrophobe Adhäsion von einzelnen Polymeren

7.1.1 Der Hofmeistereffekt

Denaturierungs- oder Aussalzungsexperimente (engl. *salting out*) zeigen eine hohe Abhängigkeit vom verwendeten Salz in Lösung; vor allem der Wechsel von kosmotropen Salzen zu chaotropen Salzen ist dabei sehr deutlich. Die auftretenden Effekte können mehr als einen Faktor 50 für kolloidale Eisenpartikel [1] oder 5 für die Stabilität von Proteinen [20] ausmachen und zeigen im Allgemeinen eine lineare Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Die Experimente laufen dabei auf zwei verschiedene Arten ab, (i) die Konzentration der verwendeten Salze ist gleich und der gemessene Effekt wie die Absorption eines Proteins ändert sich, (ii) die Konzentrationen variieren und ein konstanter Effekt wie das Ausfallen von gelösten Partikeln wird beobachtet.

Der Einfluss von ein molaren Salzlösungen auf die Adhäsion des künstlichen Spinnenseidenproteins (QAQ)₈NR3 ist sehr gering (Tabelle 4.1), kann aber über geeignete statistische Verfahren nachgewiesen werden; vergleicht man die extremalen Werte dann bewegt sich der gemessene Effekt im Bereich von etwa 10%. Die Adhäsionskraft als direkte Messgröße ist somit nur bedingt für den Nachweis des Hofmeistereffekts bei der Adhäsion einzelner Polymere geeignet. Versucht man nun Hofmeisters Experimente mit Desorptionsexperimenten vergleichen, so muss ein Schwellwert $\Delta F_{Hofmeister}$ für die relative Änderung der

Adhäsionskraft festgesetzt werden, der dann durch Variation der jeweiligen Salzkonzentration erreicht werden muss. Setzt man diesen Schwellwert nun beispielweise auf $\Delta F_{Hofmeister} = 10$ pN, so wird bei dieser Betrachtung der Schwellwert für NaH_2PO_4 bei ca. 2 M und für NaCl bei ca. 3 M erreicht (siehe Abbildung 7.1). Man benötigt in diesem Fall somit für NaCl 50% mehr Salz um dieselbe Änderung der Adhäsionskraft zu bewirken.

In der Abbildung wurden die Desorptionskräfte normiert, da bei nicht vorhandenem Salz die Adhäsionskräfte identisch sein müssen. Außerdem ist es zum Verständnis des Salz- und vor allem Konzentrationseinflusses besser die Änderung der Adhäsionskraft zu betrachten als die absoluten Werte. Die Änderung der Kraft erfolgt durch eine Änderung des chemischen Potentials durch Hinzugabe von Salz. Der graue Fehlerbalken bei null molar gibt die Schwankung der absoluten Werte an.

Eine weit bessere Einteilung der Salzabhängigkeit ist die Messung der Steigung der Adhäsionskraft bei Erhöhung der Salzkonzentration. Je höher die Steigung desto kosmotroper ist das Salz bzw. je niedriger die Steigung desto chaotroper ist das Salz. Das Vorzeichen der Steigung würde dann zwischen kosmotrop (positiv) und chaotrop (negativ) diskret unterscheiden. Ein chaotropes Salz bewirkt somit eine Verringerung der Adhäsionskraft und somit eine bessere Löslichkeit des verwendeten Polymers in Lösung. Verglichen mit Aussalzungsexperimenten die einen Effekt von 500% oder 5000% ergeben, ist die 10%ige Änderung der Adhäsionskraft sehr schwach, vor allem im physiologischen Bereich (Abb. 7.1), aber noch deutlich messbar.

Ungeachtet der Größe des Effekts stellt sich trotzdem die Frage was die Ände-

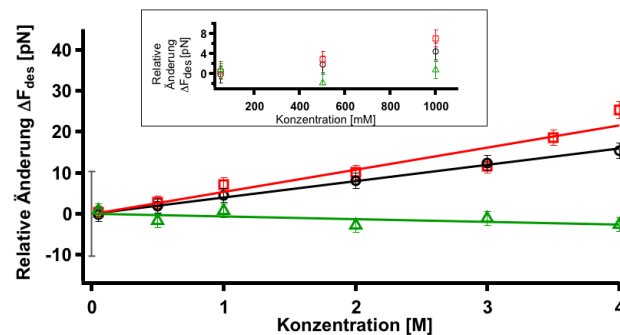


Abbildung 7.1: Desorptionskraft von $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ in den drei wässrigen Salzlösungen NaI (Δ , grün), NaCl (\circ , schwarz) und NaH_2PO_4 (\square , rot) bei jeweiligen Konzentrationen von 0,005 M und 4 M. Der eingefügte Graph zeigt den physiologischen Bereich von 0,005 M bis 1 M. Die angegebenen Fehler betragen 2% (siehe Text). Der graue Fehlerbalken gibt die Unsicherheit an wenn man die absoluten Werte vergleichen möchte. Die verwendete Oberfläche war ein hydrophober SAM.

rung der hydrophoben Adhäsion bedingt. Bei Zugabe von Ionen ändert sich

nun die Grenzflächenenergie linear mit der Konzentration des Salzes. Jedoch erhöhen auch chaotrope Salze die Grenzflächenenergie, aber geringfügiger als kosmotrope Salze (siehe Abschnitt 2.5 Hydratation). Die Verringerung der Adhäsionskraft durch NaI kann damit nicht erklärt werden.

Ein freies Volumen-Effekt ist ebenfalls nicht geeignet das Verhalten der Kraft in Abb. 7.1 zu erklären, obwohl kosmotrope Salze durch ihre starke Hydratation das frei zugängliche Volumen schneller verringern als NaCl oder NaI. Eine Änderung der Adhäsionskraft durch einen freies Volumen-Effekt bei niedrigen Konzentrationen und damit niedrigem Füllgrad ist jedoch nicht plausibel.

Die Dielektrizitätszahl ϵ von Wasser wäre ein weiterer Parameter der sich bei Erhöhung der Konzentration verändert (siehe Abschnitt 2.5 Hydratation). Dadurch erhöhen sich die van der Waals-Kräfte und zwar wiederum für beide Arten von Salzen. Es sollten sich also auch hier die Adhäsionskraft bedingt durch van der Waals-Wechselwirkungen für alle Salze erhöhen.

Der einzige Unterschied zwischen den Salzen bei Messungen an hydrophoben Oberflächen ist deren Vorhandensein an der Oberfläche. MD-Simulationen zeigen, dass chaotrope Ionen in Wasser von unpolaren Oberflächen angezogen werden und kosmotrope Ionen abgestoßen werden. Somit ist die relative Konzentration der chaotropen Ionen an der Oberfläche höher als im Volumen und die kosmotropen Ionen sind nur im Volumen vorhanden (Abb. 2.11 Abschnitt 2.5). (QAQ)₈NR3 zeigt bei Löslichkeitstest in Phosphatlösungen und hohen Konzentrationen eine schlechte Löslichkeit und kann bei Haftungsmessungen somit bestätigt werden.

Setzt man die Konzentration von NaI an hydrophoben Oberflächen c mit der Volumenkonzentration c_0 in Verhältnis, dann nimmt c/c_0 mit steigender Volumenkonzentration zu (siehe Abschnitt 2.5 Hydratation und Abbildung 2.11). (QAQ)₈NR3 ist in chaotropen Elektrolytlösungen besser löslich, vor allem steigt die Löslichkeit mit der Konzentration des Salzes. Deshalb sollte sich die Adhäsionskraft erhöhen; dies ist aber nicht der Fall. Das kann bedeuten, dass die Hydratstruktur an der unpolaren Oberfläche stärker stabilisiert wird, die Enthalpie wird also negativer, und somit die Löslichkeit des (QAQ)₈NR3 an der Oberfläche geringer. Dabei wird der entropische Anteil des chemischen Potentials kleiner, aber der enthalpische Anteil entscheidend größer. Somit wird die Energie die nötig ist um eine Kavität an der Oberfläche zu schaffen höher sein als im Volumen und die van der Waals-Kräfte von der Oberfläche reichen nicht aus den Verlust an Adhäsionsenergie komplett zu kompensieren. Ersetzt man eine hydrophobe Oberfläche durch eine andere, wie die Ersetzung des hydrophoben SAMs durch einen hydrophoben Diamanten, so bleibt das

Verhalten der Adhäsionskraft bei Änderung des Salzes bzw. der Konzentration gleich (siehe Tabelle 4.2). Die Steigungen der Datenreihen für das jeweilige Salz sind zwar leicht unterschiedlich, es kann aber auf Grund der recht hohen Unsicherheit beim Fitprozess für die Datenreihen auf dem hydrophoben Diamanten (siehe Tabelle 4.3) keine Aussage über einen Einfluss der Oberflächen getroffen werden.

7.1.2 pH-Wert

Die Adhäsionsmessungen abhängig von der Konzentration an Hydroniumionen H_3O^+ bzw. Hydroxidionen OH^- (pH-Wert) zeigen keine klare Tendenz, sondern vielmehr nur Schwankungen im Bereich von weniger als 5% (siehe Abbildungen 4.3 und 4.4). Es sieht somit so aus als ob kein Effekt im pH-Bereich von 2 bis 12 existiere; dieser Bereich entspricht aber einer Hydroniumionen- bzw. einer Hydroxidkonzentration von weniger als 0,5 M, bei der auch bei normalen Salzen ein sehr kleiner Effekt zu sehen ist. Es ist deshalb zu erwarten, dass erst in einem pH-Bereich von 0 bis 14 oder höher eine messbare Änderung der Adhäsionskraft auftritt. Dieser Bereich ist aber im Moment mit dem aktuellen Messaufbau nicht zugänglich. Weiterhin ist zu beachten, dass sich bei Verwendung von Phosphatpuffern die Valenz bei unterschiedlichem pH-Wert unterscheidet und es sich damit um unterschiedliche Ionen handelt. Der Effekt bei einer Konzentration von weniger als 0,5 M wäre aber wiederum zu klein um ihn zu erkennen. Außerdem ergeben die Messungen in NaCl-Lösungen mit unterschiedlichem pH-Wert keine nennenswerte Änderung der Adhäsionskraft. An dieser Stelle muss berücksichtigt werden, dass ein paar Seitenketten des $(\text{QAQ})_8\text{NR}_3$ Gruppen enthalten die protoniert bzw. deprotoniert werden können und somit ein Ladungseffekt auftreten könnte. Bei den pH-Werten von 2 und 12 wurde der Isoelektrische Punkt des Polymers unterschritten bzw. überschritten und es liegen geladene Seitenketten vor. Der Einfluss der effektiven Ladung von Proteinen ist sehr gut verstanden [9] und kann deswegen gut abgeschätzt werden. Bei einem pH-Wert von 11 sind ca. 90% der Tyrosine des $(\text{QAQ})_8\text{NR}_3$ mit einem pK_S -Wert von 10,07 [106] negativ geladen. Die hydrophobe Oberfläche wirkt als negativ geladene Oberfläche mit einem isoelektrischen Punkt im sauren Bereich (siehe Abschnitt 2.5 Hydratation) und einer geschätzten Oberflächenladungsdichte von einer Ladung pro nm^2 bei pH 11. Die sich ergebende abstoßende Kraft [86] wäre ungefähr 3 pN. Im sauren pH-Bereich sind die Tyrosine nicht negativ geladen was dazu führt, dass der Wert von 3 pN ein oberer Grenzwert für einen elektrostatischen Einfluss ist

und somit vernachlässigt werden kann.

7.1.3 Salzmischungen

Oben wurde gezeigt, dass die Änderung der Adhäsionskraft linear von der Konzentration abhängt und die Steigung spezifisch für ein Salz ist. Aus den Experimenten mit gemischten Salzlösungen lässt sich auf eine Additivität dieser beiden Effekte schließen. Abbildung 7.2 zeigt die Adhäsionskraft in Abhängigkeit von der Natriumionenkonzentration (grüne Kurve) (vgl. Abbildung 4.5); zusätzlich sind noch die Datenreihen für eine reine Salzlösung mit NaI (blau) und NaCl (schwarz) aufgetragen. Im Konzentrationsbereich von 0 M bis 3 M liegt eine reine NaCl-Lösung vor, deshalb ist die Steigung der grünen Kurve

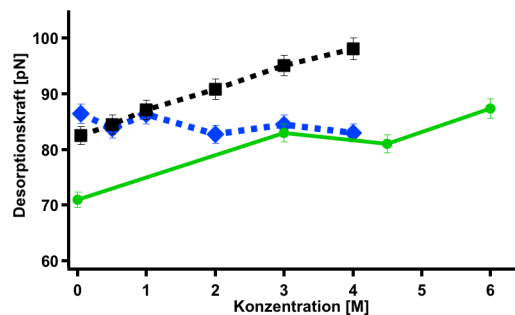


Abbildung 7.2: Die Desorptionskraft von Poly-D-Tyrosin auf einem hydrophoben SAM in gemischten Salzlösungen; in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration (schwarz), der NaI-Konzentration (rot) und der Natriumionen-Konzentration (grün). Die Linien sollen den Trend der Datenpunkte zeigen. Der angegebene Fehler ist 2%.

mit der schwarzen identisch. Im Konzentrationsbereich von 3 M bis 6 M wurde NaI zugegeben und die Konzentration von Cl^- blieb konstant; somit auch deren Einfluss. Von 3 M bis 4,5 M ist die Steigung der grünen Kurve auch wieder mit der Steigung der blauen Kurve (der NaI-Einfluss) identisch und somit die angesprochene Additivität des Iodid- und Chlorid-Einflusses zeigt. Ab einer Konzentration von 4,5 M bis 6 M muss aber ein neuer Effekt eintreten, da die Zunahme von Iodid keine Erhöhung der Kraft ausmachen sollte. Falls das Natriumion als kosmotropes Ion wirkt sollte die Steigung sich nicht so drastisch ändern, sondern linear und ebenfalls additiv. Ein weiterer kosmotroper Effekt ist also unwahrscheinlich.

Bei den verwendeten Konzentrationen kommt man schon sehr nah an die Löslichkeit der verwendeten Salze; NaI ist bis zu ca. 13 M löslich und NaCl nur bis zu ca. 6 M [107] bei ca. 55 Mol Wasser pro Liter. Je mehr Salze gelöst und auch hydratisiert werden desto weniger freie Wassermoleküle stehen zur

Verfügung und das freie Volumen zum Lösen von Partikeln nimmt ab. Dadurch steigt die benötigte Energie und somit auch die Kraft für den Lösungsprozess (siehe Abschnitt 2.5 Hydratation). Es könnte sich also um einen freies Volumen-Effekt handeln.

7.1.4 Kettenpolarität

Das künstliche Spinnenseidenprotein $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ besitzt eine interne Variation der Hydrophobizität (siehe Abb. 4.7), welche jedoch nicht ausreicht um eine Überstruktur im Desorptionsplateau zu erzeugen (siehe Abb. 3.2). Einzelne Aminosäuren sind also definitiv nicht zu sehen. Vergleicht man nun das mild hydrophobe $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ mit dem sehr hydrophoben Poly-D-Tyrosin, so ist der Unterschied in der Adhäsionskraft nur ca. 5% und auf Grund des Fehlers quasi nicht vorhanden. $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ und Poly-D-Tyrosin decken dabei mehr als 50% der Hydrophobizitätsskala ab. Erst wenn man fast die komplette Skala nimmt und Poly-D-Tyrosin mit Poly-L-Lysin vergleicht ergibt sich ein Unterschied von ca. 13%.

$(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ besteht abwechselnd aus Blöcken aus kleinen Aminosäuren wie Alanin mit einem van der Waals-Volumen von 67 \AA^3 und aus Blöcken aus großen Aminosäuren wie Tyrosin mit einem van der Waals-Volumen von 141 \AA^3 [101]. Dies heißt, dass für größere Aminosäuren größere Kavitäten geschaffen werden müssen, wofür mehr Energie aufgewendet werden muss. Für Partikel mit einem Radius kleiner als ca. zwei Nanometer ist die Solvatationsenergie kleiner als die Grenzflächenenergie γ und abhängig vom Radius des Partikels [15]. Auch hier muss zum Lösen von Alanin eine geringere Energie aufgewendet werden als für Tyrosin. Dieser Unterschied ist in der gemessenen Adhäsionskraft nicht zu sehen. Der Unterschied in einzelnen Aminosäuren scheint somit unwichtig zu sein. Eventuell müssen Segmente angenommen werden die viel größer sind als eine Aminosäure, wobei diese effektiven Segmente (vgl. Kuhn-segmente) schließlich Stück für Stück desorbiert werden und keine einzelnen Aminosäuren.

Wie erwähnt ist die Solvatationsenergie für die Größen der verwendeten Aminosäuren abhängig vom Radius und weniger von der Grenzflächenenergie. Es kann also für das polare Poly-L-Lysin und das unpolare Poly-D-Tyrosin die Grenzflächenenergie vernachlässigt werden, da deren Partikelgröße nahezu identisch ist (135 \AA^3 für das Lysin und 141 \AA^3 für das Tyrosin [101]). Dies hat zur Folge, dass sich die Solvatationsenergien von Lysin und Tyrosin nicht unterscheiden. Dies ist vermutlich auch die Ursache für den relativ kleinen Un-

terschied in der Desorptionskraft von Poly-D-Tyrosin und Poly-L-Lysin. Aber da dieser Unterschied für die beiden Polymere bei gleicher Solvatationsenergie existiert, sollte noch ein weiterer noch unbekannter Parameter die Adhäsion beeinflussen.

Ein abstoßender Einfluss der negativen Ladungen des Poly-L-Lysins auf einer negativ erscheinenden hydrophoben Oberfläche kann auf Grund der Abschirmung der Elektrostatik durch die verwendete 1 M NaCl-Lösung vernachlässigt werden.

7.1.5 Oberflächenpolarität

Die Adhäsionskraft von $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ erhöht sich erwartungsgemäß mit der Hydrophobizität bzw. mit dem Kontaktwinkel der Oberfläche. Für die Beschreibung der Abhängigkeit vom Kontaktwinkel würde sich eine Stufenfunktion mit einem Umkehrpunkt bei ca. 65° eignen. Dies würde bedeuten, dass bei ca. 65° eine Art Phasenübergang stattfindet und das Substrat von hydrophil (Werte kleiner als 65°) nach hydrophob (Werte größer als 65°) wechselt. Abbildung 7.3 zeigt die Adhäsionskräfte von $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ auf Misch-SAMs, wobei die Daten linear und mit einer Stufenfunktion gefittet wurden; eine lineare Abhängigkeit kann nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin tritt das stufenförmige Verhalten bei Verwendung von Poly-D-Tyrosin und Poly-L-Lysin nicht auf, weshalb nachfolgend nur die lineare Abhängigkeit diskutiert wird.

Aus Messungen der Transferenergie von Aminosäuren (Tabelle 2.1) und der

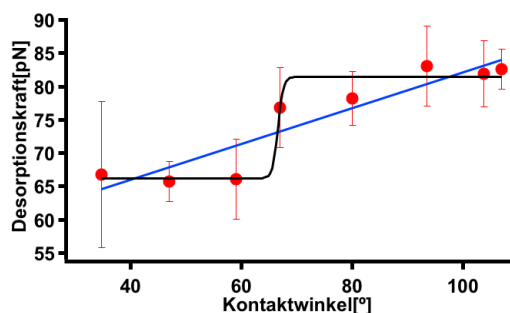


Abbildung 7.3: Die Desorptionskraft von $(\text{QAQ})_8\text{NR3}$ auf sogenannten Misch-SAMs mit unterschiedlichen Kontaktwinkeln in jeweils 1 M NaCl. Die Datenpunkte stammen von mehreren Blattfedern weshalb jeweils Mittelwerte verwendet wurden. Die Standardabweichung wurde durch die Student-t-Funktion korrigiert. Die Daten wurden linear (blau) und durch eine Stufenfunktion (schwarz) gefittet.

Analyse von Adsorptionsisothermen (Tabelle 2.2) würde man erwarten, dass sich die Adhäsionsenergie mindestens um 50% bis 100% ändert, wenn ein hydrophobes Substrat durch ein hydrophiles Substrat ausgetauscht wird; dies ist

jedoch nicht der Fall. Das Verhalten weist hingegen auf eine Art Kompensationsmechanismus der im Folgenden diskutiert wird.

Es wurde bereits in MD-Simulationen ohne Salzeinfluss gezeigt, dass sich mehrere große Anteile der Adhäsionsenergie nahezu ausgleichen und in der Summe eine vergleichsweise kleine Adhäsionsenergie ergeben (siehe Abschnitt 2.3). Die Anteile welche zu berücksichtigen sind lauten: Peptid-Peptid, Peptid-Wasser, Peptid-Oberfläche, Wasser-Oberfläche und Wasser-Wasser. Im vorliegenden Fall muss noch das Salz berücksichtigt werden; es ergeben sich zusätzlich Salz-Peptid, Wasser-Salz, Salz-Oberfläche und Salz-Salz. Aktuell können aber viele Anteile noch nicht berechnet oder analytisch abgeschätzt werden, da in MD-Simulationen im Moment Salzeffekte durch die Standardkraftfelder noch nicht simuliert werden können [13].

Es ist somit noch nicht möglich die Anteile an der Adhäsion quantitativ zu diskutieren, es ist aber möglich Anteile, welche direkt durch die Änderung der Oberflächenhydrophobizität beeinflusst werden, abzuschätzen, während alle anderen konstant gehalten werden. Es wären dann Salz-Oberfläche, Wasser-Oberfläche und Polymer-Oberfläche, die sich gegenseitig kompensieren.

Die Änderung in den Anteilen Salz-Oberfläche und Wasser-Oberfläche kann durch die Grenzflächenenergie zusammengefasst werden (Abb. 7.4, türkis), die durch die Messung der Kontaktwinkel bestimmt werden kann. Die totale

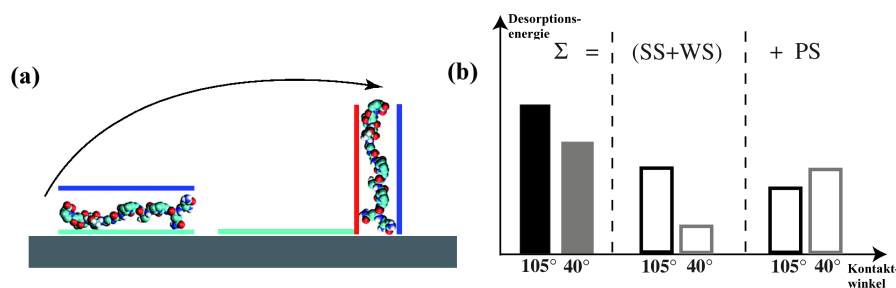


Abbildung 7.4: (a) Schema der Desorption eines Polymers. Desorbiert man das Polymer von der Oberfläche erzeugt man zwei neue Grenzflächen (türkis und rot). (b) Schema des Kompensationsmechanismus. Die Summe der Änderungen der freien Energien Σ während der Desorption wird direkt aus der Desorptionskraft bestimmt. Sie können dabei in ihre Anteile aufgespalten werden: Wasser-Oberfläche (WS), Salz-Oberfläche (SS) und Polymer-Oberfläche (PS). Die ersten beiden Anteile (SS+WS) wurden aus dem makroskopischen Grenzflächenenergien bestimmt. Der Anteil Polymer-Oberfläche (PS) ist durch die Differenz $\Sigma - (WS+SS)$ bestimmbar. Alle anderen Anteile bleiben konstant und erzeugen nur einen konstanten Offset.

Grenzflächenenergie ist durch die Young-Gleichung 2.10 und die Young-Dupré-Gleichung 2.11 mit dem Kontaktwinkel θ verknüpft. Die Grenzflächenenergie von Wasser ist $\gamma_L=73 \text{ pN nm nm}^{-2}$ und der Kontaktwinkel kann gemessen werden. Die Oberfläche kann als ein hydrophobes Substrat aus Cyclohexan betrachtet werden, das eine Grenzflächenenergie von $\gamma_S=25 \text{ pN nm nm}^{-2}$

aufweist [24]. Die Änderung der freien Energie bei einem Kontaktwinkel von $\theta=105^\circ$ ist $\gamma_{SL}=44$ pN nm nm⁻² und spiegelt die Grenzflächenenergie zwischen Wasser und der Oberfläche wider. Bei der Annahme, dass die Fläche die während der Desorption dem Substrat zugewandt ist in etwa der Oberfläche des van der Waals-Volumens einer Aminosäure ist, benötigt man für eine durchschnittliche Aminosäure eine Energie von 24 pN nm um diese Grenzfläche zu schaffen.

Die Fläche unterhalb der Kraft-Abstandskurve während einer Steady-State-Desorption ist die Energie pro Einheitslänge. Wählt man nun eine Aminosäure als Einheitslänge, dann kann direkt aus den obigen 24 pN nm berechnet werden welche Kraft benötigt wird. Dafür dividiert man die Energie pro Aminosäure durch deren Länge $l_{aa}=0,365$ nm und erhält eine Kraft von $F_{SW}(105^\circ) = 65$ pN. Bezogen auf die Gleichungen 2.10 und 2.11 ergibt sich bei einem Kontaktwinkel von 40° eine Grenzflächenenergie von 10 pN nm nm⁻², woraus sich eine Kraft von $F_{SW}(40^\circ) = 15$ pN errechnen lässt. Dies würde bedeuten, dass sich die Adhäsionskraft um 50 pN ändern sollte, wenn der Kontaktwinkel von 40° auf 105° erhöht wird.

Dieser abgeschätzte Wert wird aber nicht beobachtet. Aus diesem Grund muss der Anteil Polymer-Oberfläche einen großen Teil der aufzuwendenden Energie kompensieren, so dass sich nur eine Änderung von weniger als 20% ergibt. Die Adhäsionsenergie für ein hydrophobes Polymer ist bei Verwendung von hydrophileren Oberflächen, also kleine Kontaktwinkel, größer als für hydrophobere Oberflächen. Dieser Effekt wird dann durch die Anteile Salz-Oberfläche und Wasser-Oberfläche kompensiert wie in Abbildung 7.4 zu sehen ist. Es ist zu beachten, dass bei dieser Abschätzung nur die Anteile verwendet werden bei denen die Oberfläche beteiligt ist; alle anderen Anteile werden konstant gehalten. Der Hauptanteil besteht somit aus den Wechselwirkungen von Oberfläche-Wasser und Oberfläche-Salz, wobei dieser Effekt durch die Wechselwirkung zwischen Polymer und Oberfläche abgeschwächt wird.

Misst man die Adhäsion von Poly-D-Tyrosin und Poly-L-Lysin auf den Misch-SAMs ergibt sich exakt das gleich Bild, nur dass für das hydrophile Poly-L-Lysin die Adhäsionskraft etwas schwächer ist. Abbildung 7.5 zeigt noch einmal alle drei verwendeten Polymere und deren Adhäsionskraft auf Misch-SAMs bei unterschiedlichen Kontaktwinkeln. Dabei ist es erstaunlich, dass die Steigung der drei Fits so gut wie identisch ist; der Unterschied bewegt sich im Bereich des Fehlers (siehe Tabelle 7.1). Der weiter oben beschriebene Kompensationsmechanismus gilt somit auch für weitaus hydrophobere und hydrophilere Polymere als (QAQ)₃NR3. Ein ähnlich schwacher Effekt ist für die Adhäsion

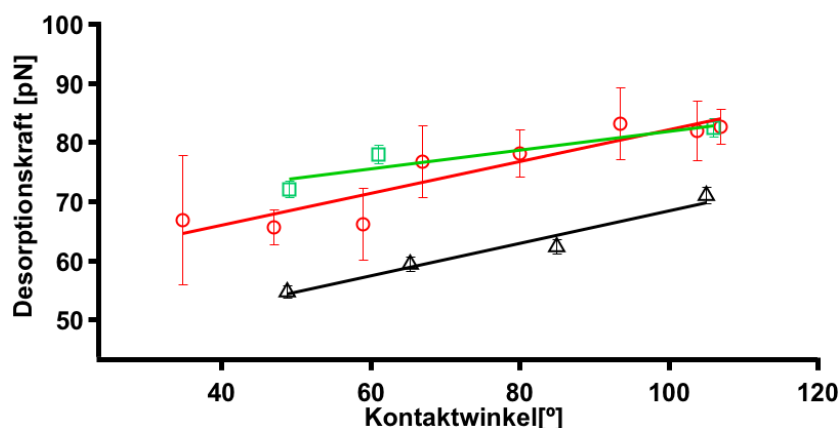


Abbildung 7.5: Die Desorptionskraft von (QAQ)₈NR3 (○, rot), Poly-D-Tyrosin (□, grün) und Poly-L-Lysin (△, blau) auf Misch-SAMs mit verschiedenen Kontaktwinkeln jeweils in 1 M NaCl. Bis auf die Datenreihe mit dem Poly-L-Lysin (Fehler von 2%) wurden mehrere Blattfedern verwendet und die Kräfte sind gemittelt; die Standardabweichungen wurden durch die Student t-Funktion korrigiert. Bei einem Vergleich der Datenreihen muss ein Fehler von 13% angenommen werden.

Parameter	Offset F_0 [pN]	Steigung m [pN/°]
Poly-D-Tyrosin	$66,0 \pm 5, 3$	$0,2 \pm 0, 1$
(QAQ) ₈ NR3	$55,3 \pm 3, 5$	$0,3 \pm 0, 1$
Poly-L-Lysin	$41,0 \pm 3, 1$	$0,3 \pm 0, 1$

Tabelle 7.1: Übersicht der Parameter der linearen Fits in Abbildung 7.5. Die angegebenen Fehler sind die Unsicherheiten des Fitprozesses.

von hydrophilen Polymeren auf hydrophoben und hydrophilen SAMs gemessen worden [108]. Die Ergebnisse können eventuell durch Wasserstoffbrücken erklärt werden.

Als erste Zusammenfassung kann man sagen, dass die Adhäsionskraft linear von der Konzentration der verwendeten Salze abhängt und additiv ist; die Steigung ist dabei eine Funktion des Salzes bzw. des Ions. Für einzelne Polymere bei der Adhäsion an Festkörperoberflächen ist der Hofmeistereffekt vergleichsweise klein, kann aber trotzdem ohne Probleme gemessen werden. All diese Beobachtungen sprechen für eine Art Kooperativität des Hofmeistereffektes bei physiologischen Konzentrationen von Salzen und Proteinen. Das chemische Potential lässt sich nun in Abhängigkeit von der Konzentration c_i des Salzes i angeben, wobei der Einfluss durch die Kosmotropizität bzw. der Chaotropizität durch einen salzabhängigen Faktor \mathcal{H} , dem Hofmeisterfaktor, analog zum Jones-Dole-Parameter (siehe Abschnitt 2.5 Hydratation), angegeben wird. Weiterhin muss das freie Volumen im chemischen Potential

berücksichtigt werden.

Ändert man die Kettenpolarität bleibt die Solvatationsenergie für die verwendeten Aminosäuren dieselbe, aber die gesamte Transferenergie, gemessen durch die Desorptionskraft, unterscheidet sich. Die Änderung der Oberflächenpolarität hat auch nur einen relativ kleinen Einfluss auf die Adhäsionskraft und weist auf eine Art Kompensationsmechanismus hin. Der Einfluss der Ketten- und Oberflächenpolarität lässt sich also nur durch das chemische Potential des Transfers angeben.

$$\mu = \mu_{Transfer} + \sum_i \mathcal{H}_i c_i + k_B T \ln \frac{V_A}{V_0} + \mu_0 \quad (7.1)$$

Das chemische Potential des Transfers $\mu_{Transfer}$ ist die Gibbs-Energie für das Lösen der Monomere des verwendeten Polymers in reinem Wasser; es sind hier somit Solvatationsenergie im Volumen, van der Waals-Energien an der Oberfläche, entropische Beiträge, usw. vereinigt. Der Einfluss von Salzen wird durch den Hofmeisterfaktor beschrieben. Das zugängliche Volumen V_A ist natürlich wieder eine Funktion von der Konzentration der Salze, T ist die Temperatur, k_B die Boltzmannkonstante, V_0 das ideale Volumen und μ_0 eine Konstante die alle restlichen Abhängigkeiten und das Standardpotential beinhaltet.

7.2 *Hydrophobes Wasser* - Der Einfluss der Hydratationsschicht

Die Experimente aus Kapitel 5 zeigen, dass bei einer Änderung der Polarität einer Festkörperoberfläche sich die Adhäsionskraft nur sehr wenig ändert. Wechselt man nun zu einer anderen Art von hydrophobem Substrat, wie zum Beispiel der Austausch des hydrophoben SAMs durch Luft, bleibt die Eigenschaft der Hydrophobizität zwar erhalten, jedoch ändert sich die Grenzflächenenergie drastisch (siehe Abbildung 5.3). Erstaunlicherweise ändert sich die Adhäsionskraft für fest-flüssig-, flüssig-flüssig- und gasförmig-flüssig-Grenzflächen so gut wie überhaupt nicht; nur die Desorption von der Luft-Wasser-Grenzfläche benötigt ein wenig mehr Kraft. In beiden Fällen wurde reines Wasser verwendet. Ändert man nun das Lösungsmittel durch Hinzugabe von Ethanol verändert man die Grenzflächenenergie und Adhäsionskraft drastisch (siehe Abbildung 7.6).

Auf Grund der Daten bieten sich drei mögliche Mechanismen an, die durch die Annahme eines Bereichs geringerer Wasserdichte, *Verarmungszone* genannt,

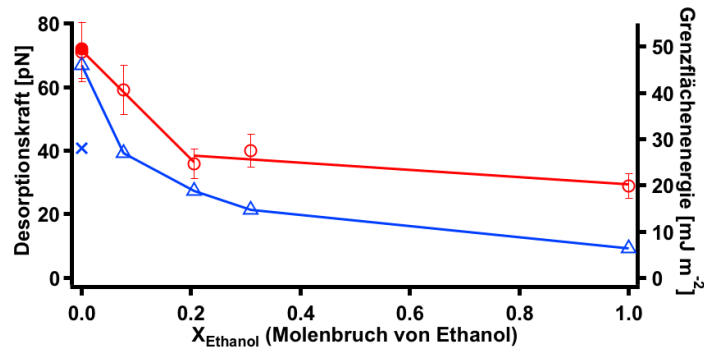


Abbildung 7.6: Desorptionskraft von Poly-D-Tyrosin auf hydrophobem SAM in Abhängigkeit vom Molenbruch von Ethanol in Wasser (○, rot). Die blaue Kurve (△) zeigt die Grenzflächenenergie des verwendeten SAM für den jeweiligen Molenbruch von Ethanol in Wasser. Es wurden zusätzlich noch die Desorptionskraft (●, rot) und die Grenzflächenenergie (×, blau) der Chloroform-Wasser-Grenzfläche angegeben. Der Fehler ist 13%.

an hydrophoben Grenzflächen und einer Hydratationsschicht (siehe Abschnitt 2.5 Hydratation) die gemessenen Effekte erklären können. Daraus ergibt sich automatisch die genaue Lage des Polymers, wobei mit Lage die Distanz zur Grenzfläche gemeint ist.

Vor ungefähr fünfzig Jahren wurde durch Kauzmann das Modell eingeführt, dass unpolare Partikel in Wasser durch eine sogenannte Klathratschicht umgeben sind [16]. Klathrat ist Wasser dessen Struktur eisartig ist und somit weniger dynamisch. Für makroskopische Grenzflächen ist dieses Modell aber in dieser Form nicht haltbar. Die Wassermoleküle in der Hydratschicht besitzen vielmehr eine ausgezeichnete Richtung [109] und es existiert eine Verarmungszone. Es stellt sich nun die Frage: Wo liegt das Polymer während der Desorption? In Abbildung 7.7 sind die Positionen skizziert, die sich aus drei möglichen Mechanismen der Adhäsion ergeben.

Für die anschließende Diskussion soll nun folgende Notation für die Änderung der freien Energie G_{ade} während der Desorption des Polymers gelten.

$$\Delta G_{ade} = \Delta G_{hyhy} + \Delta G_{vdW} + \Delta G_{sol} + \Delta G_{pp} \quad (7.2)$$

Die Definitionen der einzelnen Komponenten sind in Tabelle 7.2 zusammengefasst.

Mechanismus 1: Das Polymer befindet sich vollständig in der Verarmungszone.

In diesem Fall sollten ΔG_{hyhy} und ΔG_{sol} ungefähr konstant bleiben, und zwar für alle Grenzflächen. Die Ursache hierfür ist, dass immer dasselbe Polymer verwendet wird und die hydrophobe Hydratationsschicht ist vor und nach der

Komponenten von ΔG_{ade}	Beschreibung
ΔG_{hyhy} :	Änderung der freien Energie der hydrophoben Hydratationsschicht, also der Gewinn an freier Energie, wenn Wassermoleküle während der Desorption den Platz des Polymers einnehmen. Hier sind auch schon die Entropie des Wassers und der enthalpische Beitrag durch die Wasserstoffbrücken und van der Waals-Kräfte berücksichtigt.
ΔG_{vdW} :	freie Energie der van der Waals-Wechselwirkung zwischen Polymer und Substrat.
ΔG_{sol} :	freie Solvatationsenergie des Polymers in Lösung, inklusive der Entropie der Lösungsmittelmoleküle und dem enthalpischen Beitrag durch van der Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken.
ΔG_{pp} :	Wechselwirkungsenergie des Polymers mit sich selbst. Dieser Wert bleibt für alle möglichen Positionen des Polymers ungefähr konstant und wird deshalb nicht weiter diskutiert.

Tabelle 7.2: Zusammenfassung der relevanten Komponenten der freien Energie G_{ade} während der Desorption.

Desorption diesselbe. ΔG_{vdW} hingegen sollte auf Grund der unterschiedlichen Substrate variieren; die Unterschiede in der Dielektrizitätszahl (ein Maß für die Polarisierbarkeit des Substrates) befindet sich im Bereich 1,9 für Luft und 4,8 für Chloroform [24]. Da die Adhäsionskräfte hier nicht konstant bleiben sollten, ist Mechanismus 1 zu verwerfen.

Mechanismus 2: Das Polymer befindet sich vollständig in der hydrophoben Hydratationsschicht.

Die Hydratationsschicht kann als eine Art “Maske“ von unpolaren Materialien gesehen werden. Die gleichbleibende Adhäsionskraft in Abbildung 5.3 kann durch so eine Maske erklärt werden, die für alle hydrophoben Materialien innerhalb der untersuchten Grenzflächenenergien von 73 bis 28 mJm⁻² gleich ist. Das Polymer adsorbiert in dieser Grenzsicht und muss während der Desorption aus dieser herausgezogen werden. Die zu betrachtenden Komponenten wären in diesem Fall ΔG_{hyhy} und ΔG_{sol} , die hier für alle verwendeten Grenzflächen gleich sind oder zumindest sehr ähnlich Werte haben sollten.

Um den zu Grunde liegenden Mechanismus weiter zu verstehen wurde die Adhäsion in Ethanol-Wasser-Mischungen untersucht. Bei sukzessiver Zugabe von Ethanol zu Wasser verschlechtert sich die Löslichkeit des Polymers, die hydrophobe Hydratationsschicht ist weniger ausgeprägt und die Dielektrizitäts-

zahl wird kleiner. Damit würde man erwarten, dass die Adhäsionskraft größer wird da Poly-D-Tyrosin in Ethanol-Wasser-Mischungen schlechter löslich ist [110], weniger hydrophobes Hydratationswasser vorhanden ist, um das Fehlen des Polymers auszugleichen und die Energiekosten zu reduzieren, und die van der Waals-Kräfte größer werden. Es ist aber genau das Gegenteil der Fall und die Adhäsionskraft sinkt bei Zugabe von Ethanol. Somit muss auch der Mechanismus 2 verworfen werden.

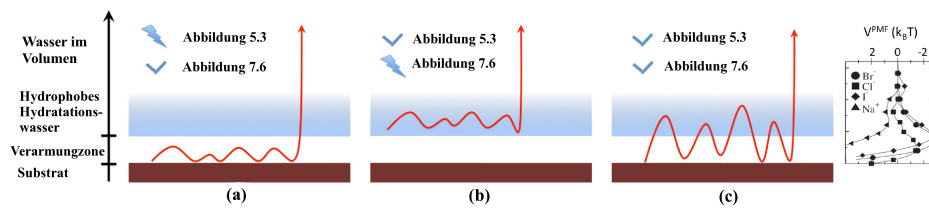


Abbildung 7.7: Schematische Darstellung der möglichen Aufenthaltsorte des Poly-D-Tyrosins an hydrophoben Grenzflächen. (a) Das Polymer kann in der Verarmungszone liegen, (b) in der hydrophoben Hydratationsschicht oder (c) in beiden. Rechts: Position von Ionen an hydrophoben Grenzflächen (nach [111]).

Mechanismus 3: Das Polymer befindet sich in der Verarmungszone und in der hydrophoben Hydratationsschicht.

Weiter oben wurde für hydrophobe Festkörperoberflächen ein Kompensationsmechanismus vorgeschlagen, wobei Hydratationseffekte und die Dispersionswechselwirkung von ähnlicher Größe sind und sich gegenseitig ausgleichen; dies könnte auch hier der Fall sein. Wird die Grenzflächenspannung verringert ist es energetisch gesehen etwas günstiger, dass Wassermoleküle das Polymer ersetzen; die Adhäsionskraft würde kleiner. Um nun die Adhäsionskraft konstant zu halten muss die Dispersionskraft ins Spiel kommen, was beim Ersetzen der Luft durch Chloroform oder einen Festkörper der Fall ist. Die Grenzflächenenergie von Chloroform in Vakuum deutet darauf hin, dass die van der Waals-Kräfte in Chloroform oder an der Grenzfläche etwas größer sind als vergleichsweise an PTFE; jedoch ist die Grenzflächenenergie an der Chloroform-Wasser-Grenzfläche kleiner als bei PTFE. Außerdem besitzt Chloroform eine etwas größere Dielektrizitätszahl ($\epsilon = 4,8$) als PTFE oder hydrophober SAM (beide $\epsilon \approx 2$). Somit steigen bei sinkender Grenzflächenenergie die van der Waals-Kräfte in den benutzten Systemen an.

Bedauerlicherweise konnte kein Experiment erdacht werden durch das der erwähnte Kompensationsmechanismus eindeutig nachgewiesen werden könn-

te. Bei jeder Änderung eines Systemparameters, wie zum Beispiel Substrat, Konzentration von Ethanol oder Grenzflächenenergie, werden mindestens zwei Anteile der freien Energie variiert. Jedoch können alle bisherigen Experimente den Kompensationsmechanismus für die freie Adhäsionsenergie indirekt bestätigen. Weiterhin bestätigen MD-Simulationen die Vorstellung, dass sich die Anteile gegenseitig kompensieren.

Eine weitere offene Fragestellung betrifft die Größenordnung der Adhäsionsenergien, also der Lösungsenergien der Polymere. Multipliziert man die Desorptionskraft mit der Länge einer Aminosäure von 0,365 nm so erhält man die Gibbs-Energie der Adhäsion für eine Aminosäure. Verwendet man 70 bis 80 pN als Desorptionskraft eines Polymers an einer hydrophoben Grenzfläche in reinem Wasser erhält man ungefähr 15 bis 17 kJ/mol pro Aminosäure; dies entsprechen ungefähr $6 - 7 k_B T$. Der Anteil der Kettenentropie pro Aminosäure wäre nach Gl. 2.19 ungefähr 10%.

Die Adsorptionsenergien aus Adsorptionsisothermen unterscheiden sich von den Gibbs-Energien in Desorptionsexperimenten im ungünstigsten Fall um den Faktor 6. Jedoch stellt sich die Frage ob ein energetischer Vergleich in diesem Fall überhaupt gerechtfertigt ist. Bei der Messung von Adsorptionsisothermen (siehe Abschnitt 2.2.5) werden keine Polymere verwendet, sondern kurze Oligomere aus Aminosäuren, bei denen zum Beispiel die Peptid-Peptid-Wechselwirkung im besten Fall kleiner ausgeprägt ist. Bei der Desorption sollte dieser Anteil laut MD-Simulation aber ungefähr um den Faktor 3-4 größer sein als die gesamte freie Energie.

Vergleicht man nun die Gibbs-Energie der Adsorption eines ungefalteten Biopolymers wie Poly-D-Tyrosin mit der Gibbs-Adsorptionsenergie des Lysozyms aus dem Hühnereiweiß, jeweils auf hydrophoben Oberflächen, so ergeben sich enorme Unterschiede. Für das Lysozym wurde die Gibbs-Energie zu ca. 20 kJ/mol für das gesamte Protein (mit 129 Aminosäuren) bestimmt [112], wohingegen bei der Desorption von Poly-D-Tyrosin für eine Aminosäure mind. 15 kJ/mol gemessen wurden. Für ein Poly-D-Tyrosin mit 129 Monomeren wären das ungefähr 2000 kJ/mol. Messungen mit weiteren Proteinen wie dem Myoglobin und der Ribonuklease A auf hydrophoben Oberflächen haben Gibbs-Adsorptionsenergien von 20 - 23 kJ/mol ergeben [112]; obwohl die Proteine bei gleicher Masse unterschiedlich hydrophob waren. Ähnliche Werte erhält man für die Gibbs-Adsorptionsenergie von Statherin auf dem Mineral Hydroxyapatit [113].

Bei diesem qualitativen Vergleich ist die Gibbs-Energie bei der Desorption eines Polymers ungefähr um den Faktor 100 größer als die Transferenergie eines

Proteins wie dem Lysozym. An dieser Stelle könnte man folgern, dass von freien Proteinen lediglich 1% der Aminosäuren mit Oberflächen bzw. Grenzflächen wechselwirken. Lysozym sollte also über ungefähr 1,3 Aminosäuren mit einer Oberflächen wechselwirken; dies ist aber sehr unwahrscheinlich. Es bleibt also noch zu klären welche Ursache für diesen enormen Unterschied sorgt.

7.3 Umgebungssensitive Grenzflächen

7.3.1 Festkörpergebundene Polymerbrushes

Das verwendete Polymer Poly-MAEMA zeigt in Lösung einen Phasentübergang bei einem LCST von ca. 50°C [114]. Oberhalb dieser Temperatur fällt PMAEMA aus, es bilden sich Aggregate und die Lösung wird trüb; das Lösungsmittel wird von einem guten zu einem schlechten Lösungsmittel. In diesem Fall kollabiert das Polymer, wobei sich der mittlere End-zu-End Abstand verringert [64]. Benutzt man PMAEMA in Polymerbrushes so erwartet man, dass auch hier das Polymer kollabiert und sich die Höhe des Polymerbrushes ändert. Dies ist aber nicht der Fall.

Die verwendeten Brushes waren sogenannte Gradientenbrushes, die einen Höhengradienten aufwiesen (siehe Kapitel 6). Unterhalb wie oberhalb des oben genannten LCST zeigte sich das Höhenprofil in reinem Wasser unabhängig von der Temperatur. Ein Einfluss der Höhe auf den LCST kann auf Grund des Gradienten ausgeschlossen werden. Jedoch sind die LCST-Werte in der Regel abhängig von der Konzentration [115] und die Dichte der Polymerbrushes unterscheidet sich ziemlich stark von der einer Polymerlösung. Es könnte somit bedeuten, dass sich der LCST zu viel kleineren Temperaturen, unterhalb der Raumtemperatur, verschoben hat. Deshalb wäre der benutzte Polymerbrush von Beginn an kollabiert gewesen und es konnte sich keine Höhenänderung mehr zeigen.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei einem höheren Drive während der Abbildung in AC-Modus die Höhe sich von maximal 100 nm auf maximal 40 nm verkleinert hat. Dies kommt dadurch zu Stande, dass beim verwendeten Drive der Brush durch die sich ergebende Kraft in z-Richtung gestaucht wurde. Auch in diesem Fall änderte sich die Höhe bei einer Erhöhung der Temperatur nicht mehr und konnte im Temperaturbereich von 30°C bis 70°C auch nicht mehr rückgängig gemacht werden. Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die schlechte Löslichkeit von PMAEMA bei Raumtemperatur sein, wenn es als Polymerbrush vorliegt.

Experimente mit modifiziertem PMAEMA haben gezeigt, dass sich die LCST-Werte zu niedrigeren Temperaturen verschieben lassen [114]. Durch die Modifikation der Polymere wurden die N,N-dimethylamino-Gruppen weniger dem umgebenden Wasser ausgesetzt, was zu einer geringeren Hydratation und daraus folgend zu einer geringeren Löslichkeit führt. Auf Grund der erhöhten Dichte an Polymeren in einem Brush ist es somit möglich, dass die schlechtere Hydratation einen vorzeitigen Kollaps herbeigeführt hat.

Hydrophobe Grenzflächen besitzen in wässriger Umgebung eine Wasserschicht in der die Wassermoleküle eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine ausgezeichnete Richtung haben. Auf Grund der sich dadurch ergebenden Polarisation existiert an einer hydrophoben Grenzfläche ein elektrostatisches Potential. Aber auch hydrophobe Oberflächen die sich nicht in wässriger Umgebung befinden besitzen wie auch hydrophile Oberflächen eine Schicht Wasser [116] und somit sollte ein Potential messbar sein.

Für die Messung des elektrostatischen Potentials wurde ein weiterer PMAEMA-Brush verwendet der dieselben Eigenschaften wie der oben diskutierte besitzt. Dieser Polymerbrush zeigt an Luft eine Änderung seines elektrischen Oberflächenpotentials wenn die Temperatur variiert wird. Der Temperaturbereich von 30°C bis 60°C ist zu gering um allein durch eine Temperaturänderung die Wasserschicht zu verdampfen. Somit kann es nur bedeuten, dass der PMAEMA-Brush bei höheren Temperaturen weniger stark hydratisiert ist und die Struktur der Hydratschicht sich geändert hat.

Die auftretende Verschiebung der gemessenen Potentiale zu höheren Werten ist ein Drifteffekt der durch eine Verunreinigung der Blattfederspitze bedingt ist. Dies führt zu einer Änderung des Arbeitspotentials und damit zu einer zeitlichen Drift. Bei der Messung des Potentials werden die Werte für den Brush und die Werte der Siliziumunterlage bestimmt. Das elektrische Potential des Siliziums ist in den Histogrammen (siehe Abbildung 6.3) eindeutig zu sehen und wird benutzt um die erwähnte Drift zu korrigieren. Dafür wurde das Potential des Siliziums auf Null gesetzt. Die gemessene Änderung des Potentials ist natürlich auf Grund der Reversibilität der Hydrophobizität ebenfalls reversibel.

Bei Erhöhung der Temperatur verschiebt sich das gemessene Potential des Brushes in positive Richtung. Experimente von Lu et al. [52] mit hydrophilen und hydrophoben SAMs ergaben für das unpolare Substrat ebenfalls ein positiveres Potential (siehe Abschnitt 2.5 Hydratation). Der gemessene Potentialunterschied des Brushes über den angegebenen Temperaturbereich unter-

scheidet sich natürlich von den Messungen auf den SAMs, da vermutlich auf Grund des erniedrigten LCSTs kein hydrophober Kollaps mehr möglich war. Unter dieser Annahme konnte aber gezeigt werden, dass sich die Hydrophobizität des verwendeten Polymerbrushes bei Änderung der Temperatur trotzdem noch ändern kann.

Legt man nun ein externes Potential an die Siliziumunterlage an, dann zeigt sich innerhalb der Messunsicherheit kein Einfluss auf den Potentialunterschied zwischen Siliziumunterlage und dem Polymerbrush. Beide Werte sind aber um den Wert des externen Potentials, dem sogenannten Voltapotentiale Ψ , verschoben, da sich nun auf dem Silizium Ladungsträger befinden. Das gemessene Potential ist somit die Summe aus Oberflächenpotential und dem Voltapotentiale.

7.3.2 Polymerteppiche

Poly(vinylpyridin) (P4VP) ist ein temperatursensitives Polymer mit möglichen LCST-Werten oberhalb der Raumtemperatur. Die Übergangstemperaturen von temperatursensitiven Polymeren sind in der Regel abhängig von der Kettenlänge und von der Konzentration [117]. In [118] wird zum Beispiel ein Wert von 40°C für P4VP in Wasser pH 7-10 angegeben. Bei einem pH-Wert von weniger als 4,5 ist das Vinylpyridin-Monomer protoniert und der LCST liegt höher. Für den Fall eines Polymerteppichs konnte bisher kein LCST angegeben werden, aber es werden weiterhin der pH-Wert, die Kettenlänge, die hohe Konzentration innerhalb eines Brushes und ganz allgemein die Löslichkeit eine Rolle spielen.

In Kapitel 6 konnte für einen Polymerteppich aus Poly(4-vinylpyridin) gezeigt werden, dass freistehende Polymerteppiche erstaunlich stabil sind. Ein gutes Lösungsmittel für Poly(4-vinylpyridin) und auch für den daraus bestehenden Polymerteppich ist Ethanol; Wasser bei pH 7 ist dagegen ein schlechtes Lösungsmittel. Dies zeigt sich durch die Stauchung und die Änderung der Transparenz des Polymerteppichs. Da die Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt wurden lässt sich der LCST für den verwendeten Polymerteppich in Wasser pH 7 auf unter 25° abschätzen. Die Verschiebung des LCST ist auf jeden Fall bedingt durch die hohe lokale Konzentration im Polymerteppich und möglicherweise beeinflusst durch die Kettenlänge. Durch Verwendung von Wasser mit einem pH-Wert von 2,5 (eingestellt durch Zugabe von Salzsäure) wird die Stauchung des Teppichs aufgehoben. Die Ursache hierfür ist die Verschiebung des LCST auf mehr als die Raumtemperatur durch die Protonierung der Vinylpyridin-Monomere; auch hier ist die Reversibilität gegeben.

Der verwendete Polymerteppich ließe sich hervorragend für die Bestimmung der Qualität eines Lösungsmittels, wie den pH-Bereich oder den Anteil von Ethanol in Wasser, benutzen. Es müsste vorher nur die Streuung des Teppichs in den verschiedenen Lösungen als Kalibration gemessen werden. Weiterhin sollte es möglich sein den Polymerteppich als Kraftsensor zu benutzen, da bei der Stauchung nämlich Zugarbeit in lateraler Richtung geleistet wird. Dadurch wird eine Kraft erzeugt die gemessen werden könnte, und zwar wiederum durch Änderung des Lösungsmittels oder der Temperatur.

Ein freistehender Polymerteppich haftet auf verschiedenen Oberflächen wie Silizium oder Glas allein durch van der Waals-Kräfte. Abhängig vom verwendeten Material, sei es nun polar oder unpolar, ändern sich die van der Waals-Kräfte und die Haftkraft des Teppichs ist verschieden. Weiterhin beeinflussen die van der Waals-Kräfte die Stauchung, da sie der Zugarbeit entgegenwirken. Ein Polymerteppich auf einer Festkörperoberfläche könnte daher als Modellsystem zur Messung von Reibung verwendet werden; vor allem wenn die Rauigkeit des Festkörpers sich erhöht könnten die Polymere trotzdem in die Unebenheiten eindringen und für eine gleichbleibende Haftung sorgen. Dieser Effekt wäre dann vergleichbar mit der Haftung eines Geckofußes [119].

Kapitel 8

Ausblick

Die Zukunft soll man nicht voraussehen wollen, sondern möglich machen.

(Antoine de Saint-Exupéry, Ein Lächeln ist das Wesentliche)

- Bei der Untersuchung von einzelnen Biopolymeren mit dem AFM ist es von Vorteil eine Art Fingerabdruck für das Biopolymer in jeder Kraftkurve zu sehen. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür die Desorptionslänge des bakteriell exprimierten Spinnenseidenproteins herangezogen. Die Länge kann aber durch verschiedene Messparameter beeinflusst werden, woraus sich letztendlich ein abweichender Wert ergeben kann. Ein weitaus eindeutiger Fingerabdruck wäre eine bekannte Variation der Desorptionskraft. Dies könnte durch ein Blockcopolymer mit alternierenden stark hydrophoben und hydrophilen Blöcken verwirklicht werden. Im Laufe dieser Arbeit hat die Studentin Bettina Kracke im Rahmen eines Praktikums versucht Poly-L-Lysin und Poly-D-Tyrosin im Volumen zu koppeln um im Anschluss ein Diblockcopolymer kovalent an die Blattfeder zu binden. Die Kopplung im Volumen hat dabei teilweise funktioniert, die Kopplung an der Blattfeder jedoch noch nicht. Mit verbesserten Kopplungsprotokollen sollte es aber möglich sein beide Kopplungen erfolgreich durchzuführen und damit den idealen Fingerabdruck zu schaffen.
- Die Adsorptionsenergie von Protein wie dem Lysozym auf Festkörperoberflächen beträgt ungefähr 20 kJ/mol; ein ähnlicher Wert ergibt sich aber auch für die Desorptionsenergie einer einzelnen Aminosäure. Diese Diskrepanz ist bis jetzt noch nicht verstanden.
Eine zum AFM komplementäre Methode ist die Adhäsionsmessung durch Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF, engl.: total inter-

nal reflection fluorescence). Hierbei werden die Polymere mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und deren Adhäsionsverhalten zeitlich untersucht. Aus der mittleren Verweildauer kann schließlich die Gibbs-Adsorptionsenergie berechnet werden. Erste Versuche haben dabei gezeigt, dass die Energie sich im Bereich von ungefähr 50 mJ/mol pro Polymer befindet [120]. Parallele AFM- und TIRF-Messungen sollten die oben beschriebene Diskrepanz klären können.

- Umgebungssensitive Grenzflächen besitzen auf dem Gebiet der Kraftspektroskopie mit einzelnen Biopolymeren ein enormes Potential. Auf Grund des Phasenübergangs bei der Übergangstemperatur sollte sich an diesen Grenzflächen die Adhäsionskraft eines einzelnen Polymers kontrolliert schalten lassen.

Vor kurzem veröffentlichte ein Forschungsteam aus Cleveland, Ohio, eine Arbeit mit Dreiersträngen aus elastinartigen Peptiden (ELP) die ebenfalls umgebungssensitiv sind [121]; ein Dreierstrang setzt sich aus drei Polypeptiden zusammen die am C-Terminus miteinander verknüpft sind. Ein einziger Dreierstrang besitzt dabei die Fähigkeit bei Änderung der Umgebungstemperatur zu kollabieren und wieder zu quellen. Modifiziert man die Seitenketten der Peptide durch zum Beispiel Azobenzenderivate so kann der Schaltvorgang auch durch Licht ausgelöst werden. Ein auf diese Weise modifizierter Dreierstrang kann beispielsweise als schaltbare Feder zur Übertragung von Kräften, analog zu Hydraulikpumpen, in molekularen Maschinen zum Einsatz kommen; als „Kraftstoff“ würde Licht dienen.

Anhang A

Detaillierte Protokolle

Herstellung der Oberflächen

Diamantoberflächen Die in dieser Arbeit benutzten Diamantoberflächen wurden von der Gruppe um Jose Garrido vom Walter Schottky Institut der TU München zur Verfügung gestellt. Sie bestehen aus poliertem polykristallinem Diamant (ElementSix Advancing Diamond Ltd., U.K.) und besitzen auf einer Fläche von $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ eine mittlere Rauigkeit von weniger als 0,3 nm [90]. Hydrophober Diamant wurde dabei erzeugt durch eine Beschichtung mit Wasserstoff. Die Funktionalisierung mit Wasserstoff erfolgte in einer Vakuumkammer durch einen Wasserstoffgasstrahl von 300 sccm oberhalb eines heißen (2000°C) Wolframdrahtes, in einem Abstand vom Substrat von 4 cm. Die Temperatur der Diamantoberfläche lag während dieses Prozesses bei ca. 200°C .

Self-Assembled Monolayer Für die Herstellung der SAMs wurden Glasplättchen mit einer 2%igen Hellmanex (Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim, Deutschland) in Wasser für 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend noch zweimal dieselbe Prozedur mit Reinstwasser. Die getrockneten Glasplättchen wurden durch einen Vakuumbedampfer (Edwards GmbH, Kirchheim, Deutschland) mit 10 nm Chrom-Nickel-Legierung und mit 100 nm Gold beschichtet. Die fertigen Goldplättchen wurden maximal vier Wochen im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Vor der Beschichtung mit Alkanthiolen erfolgte eine Reinigung der Plättchen mit RCA-Lösung (v:v:v: 5:1:1 Reinstwasser, 32% Ammoniaklösung, 35% Wasserstoffperoxid) bei 70°C für 15 min. Vor der weiteren Benutzung wurden sie noch mit Reinstwasser gespült und unter einem Stickstoffstrahl getrocknet. Die maximal hydrophoben SAMs wurden hergestellt durch Inkubation der gereinigten Goldplättchen in 2 mM 1-Dodekanthiol

in Ethanol für 12 h. Für SAMs mit geringerer Hydrophobizität (Misch-SAMs) wurden die Goldplättchen in 11-Merkapto-1-Undekanol und 1-Dodekanthiol in Chloroform für 12 h inkubiert. Durch verschiedene Konzentrationsverhältnisse der beiden verwendeten Alkanthiole konnte die Oberflächenhydrophobizität eingestellt werden. Nach der Inkubationszeit wurden die Plättchen mit Ethanol bzw. mit Chloroform gespült. Die reinen SAMs wurden anschließend noch intensiv mit Reinstwasser gespült, um das Ethanol komplett zu entfernen; das Chloroform ist in der Zeit bis zur Messung verdunstet. Nach der Präparation wurden die SAMs sofort verwendet und nicht gelagert. Der Kontaktwinkel der maximal hydrophoben SAMs hatte einen Wert von ca. 107° .

Polymerbürsten aus PMAEMA Die in dieser Arbeit verwendeten Polymerbrushes wurden von Naima Hutter vom Wacker-Lehrstuhl von Prof. Rainer Jordan der TU München hergestellt. Die Herstellung von PMAEMA-Brushes erfolgte durch die im Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Techniken. EBCD wurde auf Siliziumoxid mit einem fokussierten Elektronenstrahl eines Zeiss E-Line Scanning Electron Microscope mit einem Vakuumdruck von ungefähr 2×10^{-5} durchgeführt. Der Elektronenstrahl hatte dabei eine Energie von 20 keV mit einem Elektronenstrom von 300 pA. Die Brushes ohne Gradient wurden dabei mit einer Dosis von 40 mC cm^{-2} bestrahlt und die Gradienten mit einer linear ansteigenden Dosis von 0 bis 50 mC cm^{-2} .

Für die Photoreaktion wurden die strukturierten Siliziumsubstrate in 2 ml entgaste Lösung aus N,N-Dimethyl-aminoethyl-methacrylat (MAEMA; Sigma Aldrich) gelegt; der Inhibitor wurde vorher auf einer Aluminiumoxidsäule entfernt. Die Photoreaktion fand schließlich unter Argonatmosphäre statt und dauerte 2,5 Stunden bei einer konstanten UV-Bestrahlung ($\lambda=350 \text{ nm}$) bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Substrate sofort mehrmals mit jeweils Wasser, CAN und Ethanol für fünf Minuten im Ultraschallbad gereinigt.

Polymerteppiche Die in dieser Arbeit verwendeten Polymerteppiche wurden von Ishan Amin vom Lehrstuhl von Prof. Armin Götzhäuser, Universität Bielefeld, und Marin Steenackers vom Wacker-Lehrstuhl von Rainer Jordan der TU München bereitgestellt. Die Herstellung der quervernetzten SAMs basiert im wesentlichen aus den Protokollen beschrieben in [122]. Zu Beginn wurden Glimmerplättchen mit einer 300 nm dicken Goldschicht gedampft und mit einem UV/Ozon-Reiniger (UVOH 150 LAB, FHR, Deutschland) für drei Minuten behandelt; anschließend wurden die Plättchen mit Ethanol gespült und unter einem Stickstoffstrahl getrocknet. Im nächsten Schritt wurden die Plätt-

chen in einer 10mM Lösung aus 4'-nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol (NBPT; Taros Chemicals GmbH & Co. KG) oder 1,1'-biphenyl-4-thiol (BPT; Platte Valley Scientific) in N,N-dimethylformamid (DMF, VWR International) für drei Tage inkubiert; die Lösungen wurden vorher durch ein 0,4-nm-Molekularsieb bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluß wurden die Plättchen mit DMF und Ethanol (VWR International) gespült und einem Stickstoffstrahl getrocknet. Die Quervernetzung erfolgte im Hochvakuum ($< 5 \times 10^{-7}$ mbar) mit einer Elektronenkanone (Specs FG20) bei einer Elektronenenergie von 100 eV und einer typischen Dosis von 50 mC cm^{-2} für homogene SAMs. Die Dosis wurde dabei in nächster Nähe zum Substrat mit einem Faraday Cup-Elektrometer gemessen.

Der quervernetzte SAM wurde schließlich mit einer ca. 400 nm dicken Schicht aus PMMA rotationsbeschichtet und auf einer Heizplatte gebacken; das PMMA diente zu Stabilisierung während des Transfers des SAMs vom Gold auf ein anderes Substrat. Das Gold wurde mit 48%iger Flusssäure (5 min) vom Glimmer getrennt und in einem Bad mit I_2/KI für 15 Minuten weggeätzt. Anschließend wurde der SAM mit PMMA auf eine Siliziumoberfläche aufgebracht die entweder eine 300 nm dicke Oxidschicht trug oder eine 150 nm dicke Schicht aus Siliziumnitrid auf einer 10 nm dicken Oxidschicht besaß. Im Anschluß wurde das PMMA in Aceton aufgelöst, die Probe mit Methanol gespült und durch einen Stickstoffstrahl getrocknet.

Zur Erzeugung des Brushes wurde der durch Silizium unterstützte SAM in eine frisch hergestellte und entgaste Lösung aus 4-vinylpyridin in eine Glasflasche mit einem ungefähren Volumen von einem Milliliter transferiert. Die Polymerisation fand in einer Atmosphäre aus Argon unter UV-Bestrahlung ($\lambda=350$ nm) statt; für verschiedene Brushdicken wurden die Bestrahlzeiten variiert. Unmittelbar nach der Polymerisation wurden die Substrate in Ethanol gespült, da es das geeignetste Lösungsmittel für Poly(4-vinylpyridin) darstellt. Ausserdem wurden die Substrate noch in Ethylacetat gespült.

In [99] wird eine weiterführende Behandlung und die Herstellung weiterer Polymerteppiche beschrieben.

Herstellung des Spinnenseidenproteins (QAQ)₈NR3

Wenn man Experimente mit einzelnen Molekülen durchführt ist es ratsam ein System zu wählen, das einem erlaubt ein einzelnes Molekül zu identifizieren. Aus diesem Grunde wurde das künstliche, bakteriell exprimierte Spinnenseidenprotein (QAQ)₈NR3 als Biopolymer verwendet. Die Herstellung des

Spinnenseidenproteins führte die Gruppe um Thomas Scheibel am Chemie Department der TU München durch. Für die Herstellung des Proteins wurde das Genkonstrukt wie in [123, 7] beschrieben geklont. Es besteht aus den Motifen A und Q abgeleitet aus dem Gen ADF-3 (*Araneus diadematus* fibroin). Die Motife wurden dabei synthetisch an die Codon-Benutzung von *Escherichia coli* angepasst und in den Expressionsvektor pET21a (Novagen) geklont. *E. coli* BLR(DE3) (Novagen) wuchsen in einem LB Medium bei einer Temperatur von 37 °C mit einem Ampicilingehalt von 100 µg/ml bis die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm einen Wert von 0,5 erreicht hat. Vor Zugabe von 1 mM isopropyl β-D-galactopyranosid (IPTG) wurden die Zellen für drei Stunden einer Temperatur von 30 °C ausgesetzt. Nach der drei bis vier Stunden dauernden Zugabe wurden die Zellen geerntet und die Zellpellets in 20 mM HEPES, 100 mM NaCl bei pH 7,5 (5 mL/g Zellen) resuspendiert. Auf die Zugabe von 0,2 mg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) wurde die Suspension bei 37 °C für 30 min inkubiert bis sie viskos wurde. Nach anschließender Zugabe eines Proteaseinhibitors (Serva, Heidelberg, Deutschland) wurde die Lösung mit Ultraschall behandelt, eventuelle DNA-Rückstände durch 10µg/ml DNase (Roche, Mannheim, Deutschland) und 3 mM MgCl₂ verdaut und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die sich ergebende Lösung wurde bei 50000g bei einer Temperatur von 4 °C für 30 min zentrifugiert und anschließend für 20 min bei 80 °C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt konnte man das (QAQ)₈NR3 im Überstand finden und wurde durch Zugabe von 20% Ammoniumsulfat ausgefällt. Die Pellets wurden mit Ammoniumsulfat ausgespült, mit 6 M Guanidiniumthiocyanat resuspendiert und bei einer Temperatur von 4 °C gegen eine 10 mM Ammoniumhydrogenkarbonat-Lösung dialysiert. Zuletzt wurde das Protein lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

Funktionalisierung der Blattfedern

Am Anfang wird das Material der Blattfeder (Siliziumnitrit) mit Sauerstoffplasma aktiviert (Plasmaanlage „Tetra“ und „Femto“, Diener electronics, Ebhausen, Deutschland). Im Anschluss werden die Chips mit den Blattfedern kurz in Aceton getaucht um noch vorhandenes Wasser zu entfernen, um daraufhin für 10 min in 2,5 ml Aceton mit 50 µl Vectabond (Vector Laboratories) zu inkubieren. Unmittelbar nach der Inkubation wurden die Chips mit Aceton gespült, gefolgt von einem Spülschritt mit Wasser. Eine Inkubation für mindestens 30 min in 50 mM Boratpuffer sorgte für eine Deprotonierung der durch Vectabond aufgebrauchten Aminogruppen; der pH-Wert

des Boratpuffers wurde im Laufe dieser Arbeit von 8,5 auf 8,0 gesenkt. Im nächsten Schritt wurden die Blattfedern mit einer Mischung aus α -Methoxy- ω -NHS-Poly(ethylenglykol) (mPEG-NHS; Rapp-Polymere) mit einer molekularen Masse von 5 kDa und α,ω -Di-NHS-Poly(ethylenglykol) (DiNHS-PEG; Rapp-Polymere) mit einer molekularen Masse von 6 kD für 30 min inkubiert (im Laufe dieser Arbeit wurde die Inkubationszeit auf 15 min reduziert); beide PEGs sind auf Grund des NHS-Aktivesters aminoreaktiv. Das molare Verhältnis der beiden PEGs wurde von Funktionalisierung zu Funktionalisierung verändert, um die Anzahl der kovalent gebundenen Polymere zu kontrollieren. Die Konzentration der PEGs betrug dabei 25 mM und die Verhältnisse von DiNHS-PEG zu mPEG-NHS verliefen von 1:600 bis 1:2500. Nach der Inkubation wurden die Chips mit den Blattfedern in einem 50 mM Boratpuffer gespült und mit Filterpapier getrocknet. An den zweiten Aktivester des DiNHS-PEG wird ein Polymer mit mindestens einer vorhandenen und reaktiven Aminogruppe gebunden; die Inkubationsdauer ist hier variabel und betrug mindestens 40 min. Im Anschluss erfolgte eine Spülung in reinem Wasser und eine Inkubation von 5 min in einer 10 mM Tris-Lösung. Nach einem weiteren Spülschritt wurden die Chips mit den Blattfedern mit Filterpapier getrocknet und in Vakuum oder Luft gelagert. Abbildung 3.12 zeigt eine schematische Darstellung einer funktionalisierten Blattfeder.

Anhang B

Adhäsion auf Polymerfilmen und chiralen Kristallen

Adhäsion auf Polymerfilmen

In den bisherigen Experimenten wurden einzelne Polymere von Festkörperoberflächen und hydrophoben Grenzflächen desorbiert und deren Adhäsionseigenschaften bestimmt. Der Fall eines einzigen Polymers adhärirt an eine Grenzfläche ist jedoch in der Realität sehr selten anzutreffen. Tatsächlich ist die Wechselwirkung von vielen Polymeren weitaus häufiger zu sehen.

Um diesen Fall zu untersuchen wurden die Spitzen von Blattfedern mit einem Polymer flächendeckend beschichtet; die Beschichtung erfolgte durch das im Abschnitt 3.4 und im Anhang A beschriebene kovalente Anbindungsprotokoll. Auf Grund der Verwendung von Poly-D-Tyrosin bzw. Poly-L-Lysin lagen hydrophobe und hydrophile Messsonden vor. Als zu untersuchende Grenzflächen wurden Glas und PTFE verwendet, auf denen ein Polymerfilm mit jeweils eingetrocknetem Poly-D-Tyrosin bzw. Poly-L-Lysin vorlag. Die Messungen wurden in reinem Wasser durchgeführt.

Die Zielsetzung war herauszufinden welche qualitative Unterschiede in den Kraftkurven auftreten, wenn viele Polymere mit gleicher bzw. verschiedener Hydrophobizität miteinander wechselwirken. Außerdem sollte untersucht werden ob die verwendete Unterlage einen signifikanten Einfluss hat.

Abbildung B.1 zeigt typische Kraftkurven für eine Blattfeder beschichtet mit Poly-D-Tyrosin auf vier unterschiedlichen Proben. Für die Poly-D-Tyrosinfilme auf Glas (Abbildung B.1(a)) und PTFE (Abbildung B.1(b)) lässt sich gut sehen, dass auf der PTFE-Unterlage eine etwa doppelt so hohe Adhäsionskraft

gemessen wird; da in diesem Fall keine Kraftplateaus zu sehen sind, wird die maximale gemessene Kraft als Adhäsionskraft bezeichnet. Weitere wichtige Parameter neben der Adhäsionskraft sind die Länge über der eine Adhäsion stattfindet und die Kraft multipliziert mit der Länge (die Adhäsionsenergie). Die Länge liegt dabei im Bereich von ungefähr 200 nm bis 400 nm, was in etwa der Länge der verwendeten Polymere entspricht (siehe Abschnitt 3.3 Biopolymere).

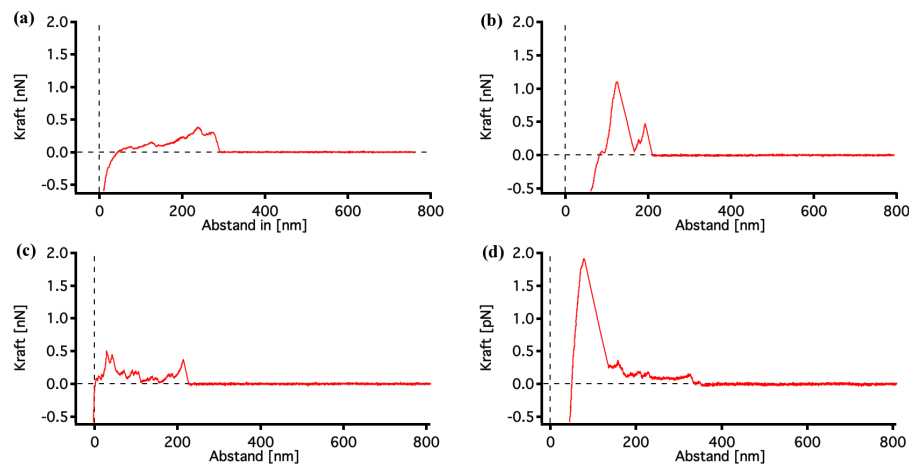


Abbildung B.1: Typische Kraftkurven einer Blattfeder beschichtet mit Poly-D-Tyrosin. Die verwendeten Polymerfilme bestanden aus Poly-D-Tyrosin auf (a) Glas und (b) PTFE und aus Poly-L-Lysin auf (c) Glas und (d) PTFE. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die jeweiligen Nulllinien der Achsen.

Ein Einfluss der Filmunterlage in den gezeigten Experimenten ist lediglich durch die höhere Adhäsionskraft zu Beginn einer Kraftkurve zu erkennen. Es scheint, dass der Poly-D-Tyrosinfilm hier auf beiden Oberflächen wegen der schlechten Löslichkeit des Tyrosins in Wasser kollabiert ist. Die Unterlage ist dadurch zum größten Teil abgeschirmt und beeinflusst die adhäsiven Eigenschaften eher wenig bis gar nicht.

Bei den Poly-L-Lysinfilmen auf Glas (Abbildung B.1(c)) und PTFE (Abbildung B.1(d)) ist die Reihenfolge dieselbe, aber auf PTFE ist die Adhäsionskraft sogar in etwa viermal so hoch wie auf Glas. Die Längen befinden sich wieder im Bereich der Polymerlängen von 200 nm bis 400 nm, was in diesem Fall der halben Konturlänge entspricht; hier wurde ein Poly-L-Lysin verwendet das eine doppelt so hohe Molmasse besaß wie das im Hauptteil verwendete Polymer (siehe Abschnitt 3.3 Biopolymere). Dies entspricht in etwa einer maximalen Länge von 600 nm. Für den Verlauf der gemessenen Kräfte lässt sich wieder grob sagen, dass die Kräfte auf Glas im niedrigen Kraftregime unterhalb von 500 pN bleiben und die Kräfte auf PTFE zu Beginn eine hohe Kraft

aufweisen und gegen Ende sich wieder im niedrigen Kraftregime befinden. Es scheint aber, dass im Falle von Poly-L-Lysinfilmen die Adhäsionsenergie entscheidend durch die Unterlage PTFE beeinflusst wird.

Im Allgemeinen ist die Wechselwirkung der Poly-D-Tyrosin-Blattfedern mit Polymerfilmen auf PTFE stärker als mit Filmen auf Glas. Im Moment sieht es auch so aus als ob die Stärke der Wechselwirkung nur wenig von der Hydrophobizität des verwendeten Polymers abhängt, wobei die Adhäsion beim hydrophilen Poly-L-Lysinfilm am stärksten ist. Die schlechte Löslichkeit des Poly-D-Tyrosins sorgt für einen Kollaps und somit können die Polymere schlechter in den Film eindringen um die Adhäsion zu erhöhen. Der Poly-L-Lysinfilm sollte nicht kollabiert vorliegen, da Poly-L-Lysin in Wasser gut löslich ist. Die Polymere an der Blattfeder können tiefer in den Film eindringen, wodurch mehr Kraft aufgewendet werden muss um diese zusätzlichen sterischen Wechselwirkungen zwischen den Polymeren zu kompensieren.

Abbildung B.2 zeigt typische Kraftabstandskurven für eine Blattfeder beschichtet mit Poly-L-Lysin auf vier unterschiedlichen Proben. Bei den Poly-D-Tyrosinfilmen auf Glas (Abbildung B.2(a)) und PTFE (Abbildung B.2(b)) lässt sich im Mittel kein Unterschied in den Adhäsionskräften und bei der Adhäsionsenergie erkennen. Die gemessenen Längen sind ebenfalls im Mittel gleich und befinden sich wieder im Bereich der Polymerlänge von 200 nm bis 400 nm.

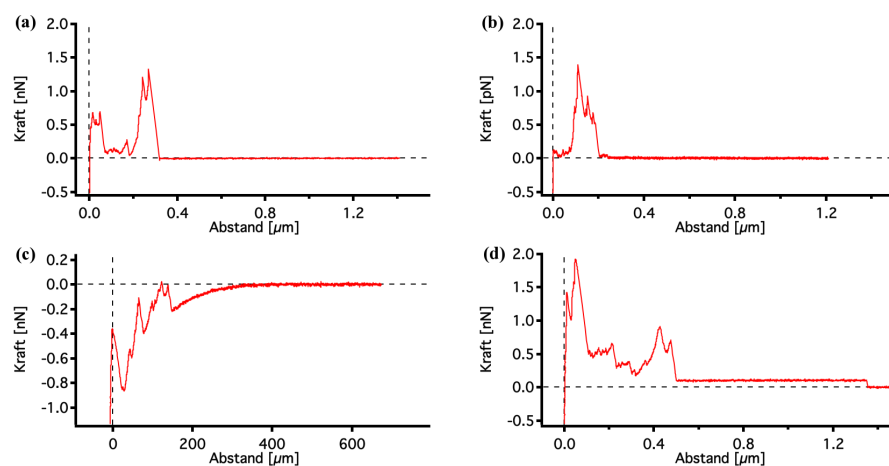


Abbildung B.2: Typische Kraftkurven einer Blattfeder beschichtet mit Poly-L-Lysin. Die verwendeten Polymerfilme bestanden aus Poly-D-Tyrosin auf (a) Glas und (b) PTFE und aus Poly-L-Lysin auf (c) Glas und (d) PTFE. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die jeweiligen Nulllinien der Achsen.

Bei den Poly-L-Lysinfilmen auf Glas (Abbildung B.2(c)) und PTFE (Abbil-

dung B.2(d)) zeigen sich markante Unterschiede zu den bisherigen Kraftkurven. Befindet sich auf der Blattfeder und auf Glas das positiv geladene Poly-L-Lysin so erkennt man, dass die Adhäsionspeaks durch eine abstoßende Kraft überlagert sind, die sich durch eine Krümmung der Kraftkurve (nach unten) bemerkbar macht. Diese abstoßende Kraft stammt von den positiven Ladungen des Lysins. Korregiert man die Kraftkurven um die elektrostatische Abstoßung erhält man Adhäsionskräfte die im niedrigen Kraftregime unterhalb von 500 pN liegen. Die gemessenen Längen befinden sich wieder im Bereich von 200 nm bis 400 nm.

Erstaunlicherweise tritt auf PTFE keine Abstoßung auf, woraus geschlossen werden kann, dass in diesem Fall die Lysine nicht geladen sind. Hydroxidionen werden von hydrophoben Grenzflächen angezogen [124] und nimmt man an, dass dadurch lokal der pH-Wert ansteigt und somit eine basische Umgebung existiert, dann wären die Lysine mit einem pK_s -Wert von 11 [101] ungeladen. Die hier auftretenden Adhäsionskräfte liegen im Bereich von ungefähr 2 nN und sind im Mittel höher als die bisher gemessenen Kräfte.

Außerdem ist zu sehen, dass sich bei Verwendung eines Poly-L-Lysinfilms auf PTFE Kraftplateaus einstellen, die eine beachtliche Länge von mehreren hundert Nanometern bis zu einem Mikrometer haben können. Wie oben schon erwähnt besitzen die hier verwendeten Poly-L-Lysine eine maximale Länge von 600 nm. Die beobachteten Plateaus sind somit einzelne Poly-L-Lysine die von der PTFE-Unterlage desorbiert oder aus dem Polymerfilm herausgezogen wurden. Längen von einem Mikrometer und mehr kann man nur erklären wenn man annimmt, dass ganze Bündel von Polymeren an der Blattfeder hängen bleiben und während des Entfernens der Blattfeder entflochten werden oder sich wie ein Reißverschluss voneinander lösen. Nach Kierfeld [125] sollten sich auch in diesem Fall Kraftplateaus bilden können.

Wird nur Poly-L-Lysin verwendet sollte der Einfluss der Unterlage erkennbar sein, da der Film nicht kollabiert vorliegt, ist aber für Glas eventuell zu schwach. Rechnet man die elektrostatische Abstoßung heraus so existieren nur relativ leichte kohäsive und natürlich sterische Kräfte. Ein Poly-L-Lysinfilm auf PTFE erzeugt erstaunlicherweise die stärkste Wechselwirkung. Die gemessenen Kräfte werden durch mehrere Ursachen erzeugt: die kohäsive und sterische Wechselwirkung der Poly-L-Lysine und die hydrophobe Adhäsion auf Grund des PTFE. Letzteres führt sogar zu deutlichen Kraftplateaus und zeigt, dass hydrophile Polymere auf hydrophoben Unterlagen augenscheinlich die stärksten Adhäsionskräfte erzeugen und die längste Reichweite besitzen. Die fehlende elektrostatische Abstoßung wie auf Glas ist nicht zu sehen und

momentan nur durch die Annahme eines lokal basischen pH-Wertes an der PTFE-Wasser-Grenzfläche zu erklären.

Adhäsion auf chiralen Kristallen

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Einfluss der Kristallchiralität auf die Adhäsion von Polyaminosäuren. Ethylendiammoniumsulfat (EDS) bildet unter bestimmten Umständen chirale Kristalle die gut zu Polarisationsstudien verwendet werden können [126]. Die entstehenden Kristalle sind immer linksdrehend, außer in speziellen Fällen, wenn bestimmte Aminosäuren in Lösung vorhanden sind und die chirale Symmetrie brechen [127] bilden sich rechtsdrehende Kristalle. So ergeben sich zum Beispiel für L-Serin rechtsdrehende und für D-Serin linksdrehende Kristalle, für L-Tyrosin linksdrehende und für D-Tyrosin beide Richtungen, aber für L-Lysin und D-Lysin nur linksdrehende Kristalle.

Eine Untersuchung der Adhäsionseigenschaften könnte zeigen welche Ursache

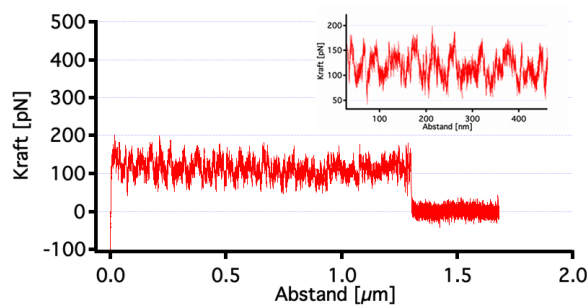


Abbildung B.3: Eine typische Kraftkurve bei der Desorption von Poly-D-Tyrosin auf einem EDS-Kristall. Die Strukturen im Rauschen auf dem Plateau stammen vermutlich diskreten Bindungen wie zum Beispiel Wasserstoffbrücken.

hinter dem Symmetriebruch steht. Es wurde mit zwei Einzelpolymersonden, nämlich Poly-D-Tyrosin und Poly-L-Lysin, die Adhäsion auf linksdrehenden EDS-Kristallen in gesättigter EDS-Lösung in Wasser gemessen; EDS-Kristalle sind wasserlöslich. In den bisherigen Experimenten zeigte Poly-D-Tyrosin keine Adhäsion. Für Poly-L-Lysin hingegen konnten Kraftplateaus gemessen werden, die eine Adhäsionskraft im Bereich von 100 pN bis 150 pN aufwiesen (siehe Abbildung B.3). Die Vergrößerung in der Abbildung zeigt, dass das Kraftplateau hauptsächlich aus einzelnen kleinen Peaks besteht und nicht wie bei einem Kraftplateau auf hydrophoben Oberflächen einfaches Rauschen zeigt. Dies ist ein Hinweis, dass die Wechselwirkung mehr auf diskreten Bindungen beruht wie z. B. Wasserstoffbrücken. Die Wechselwirkungskraft beträgt dabei im Mittel ungefähr 150 pN.

Anhang C

Bau eines AFMs für weitere Experimente

Das AFM

Kommerzielle AFMs haben den Vorteil, dass sie komplette, abgeschlossene Geräte sind und es dadurch erlauben schnell und einfach Experimente durchzuführen; ein sehr gutes technisches Verständnis vom Gerät ist dabei nützlich, aber nicht zwangsläufig nötig. Gleichzeitig ist aber ein Umbau bzw. eine Anpassung an experimentelle Verhältnisse nur sehr schwer möglich. Deswegen bietet es sich an ein AFM speziell für die Kraftspektroskopie zu bauen, das auf viele unnötige Funktionen verzichtet und relativ schnell anpassbar oder erweiterbar ist. Abbildung C.1 zeigt ein Kraftspektrometer das im Laufe dieser Arbeit entstanden ist.

Innerhalb der metallischen Basis befindet sich ein Piezo (Physik Instrumente PI, Karlsruhe) der für den Hub der zu untersuchenden Probe verwendet wird. Die Halterung für den Chip mit den Blattfeder aus Plexiglas ist im AFM-Aufsatz (bräunlich gefärbt in Abbildung C.1) integriert. Weiterhin umfasst der AFM-Aufsatz noch den Kollimator für das Licht der Laserdiode (von links kommend) und die Photodiode inklusive Vorverstärker zum Auslesen des auf der Blattfeder reflektierten Laserdiodenlichtes. Die Laserdiode wurde hergestellt von der Firma Superlum (Dublin, Irland) und erzeugt infrarotes Licht; auf Grund der vergleichsweise kurzen Kohärenzlänge treten bei dieser Photodiode weniger Störungen durch Interferenz auf. Die Photodiode mit Vorverstärker stammt von der Firma Laser2000 (Wessling bei München) und wurde für den Einbau in das AFM leicht verändert; ein Widerstand im Widerstandsnetzwerk der Vorverstärkerplatine wurde durch einen höheren Wi-

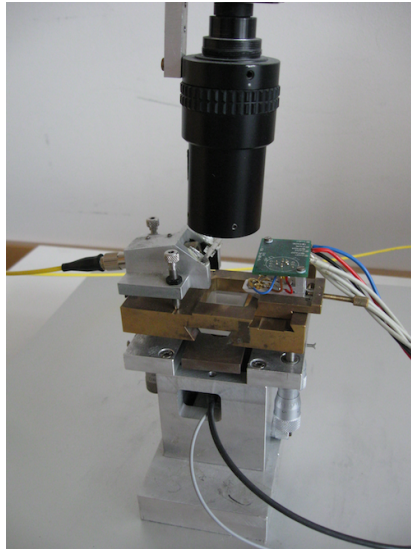


Abbildung C.1: Fotografie des im Rahmen dieser Arbeit selbst gebautem AFM. Für eine Beschreibung siehe Text.

derstand ersetzt, die Photodiode von der Platine entfernt und auf einen beweglichen Schlitten montiert.

Die Datenerfassung erfolgt durch eine Datenerfassungskarte der Firma DataTranslation (Bietigheim-Bissingen, Deutschland) und der Kontrollsoftware implementiert in IgorPro (Wavemetrics, Portland, Oregon, USA). Die Fokussierung des Laserdiodenlichtes auf die Blattfeder wird überwacht durch eine selbstgebaute Kamera, bestehend aus der Elektronik inklusive des CCD-Chips einer einfachen Webcam und einem passenden Objektiv.

Ergänzend zum AFM und den dafür nötigen Flüssigkeitszellen wurde eine temperierbare Flüssigkeitszelle entwickelt, die durch ein Heizdrahtelement eine Erwärmung der Messlösung erlaubt. Die Bestimmung und Kontrolle der Temperatur erfolgt durch ein Thermoelement das flexibel in die Flüssigkeitszelle integriert ist.

Das Auswerteprogramm WaveGuide

Im Laufe dieser Arbeit wurde das Programm WaveGuide (aktuelle Version 3.0), basierend auf der Umgebung IgorPro, entwickelt, um einfach und schnell Kraftkurven auswerten zu können. Abbildung C.2 zeigt die Benutzeroberfläche der Version 3.0. Bei der Programmierung wurde gezielt auf Benutzerfreundlichkeit und die Erweiterbarkeit des Programmcodes geachtet. Durch eine streng modulare Programmierung kann WaveGuide jederzeit den Erfordernissen an-

gepasst werden; so ist zum Beispiel eine Auswertung von Kraftplateaus (siehe Abb. 3.2) und Polymerstreckkurven (siehe Abb. C.2 rote Kurve) möglich. Weiterhin erlaubt die modulare Struktur die Auswertung von Kraftkurven verschiedener AFMs, wie dem oben beschriebenen selbstgebauten AFM und dem MFP3D-SA von Asylum Research.

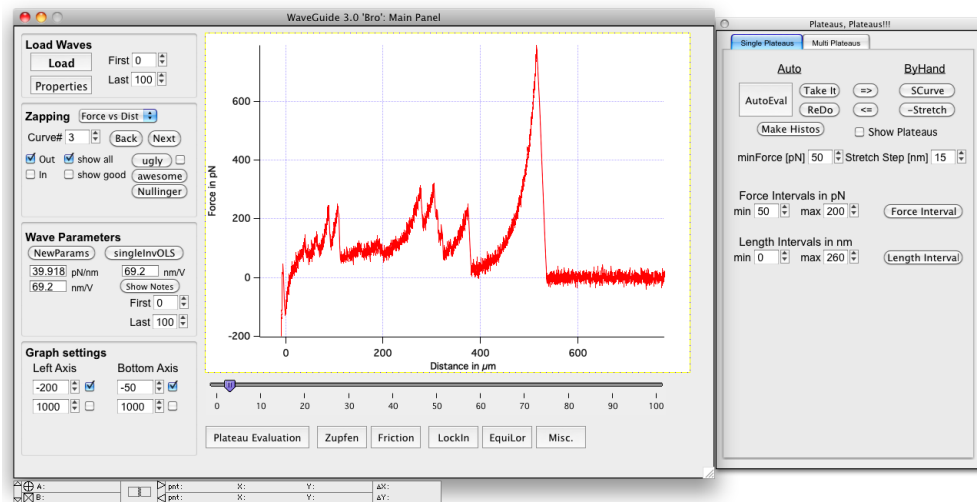


Abbildung C.2: Benutzeroberfläche des Auswerteprogramms WaveGuide 3.0, basierend auf der Umgebung IgorPro. Zentral gelegen ist der Bereich für die Visualisierung der Daten. Im linken Bereich können die Daten geladen und die Parameter der angezeigten Kraftkurven eingestellt werden. Am unteren Rand können verschiedene Module zum Auswerten der Daten ausgewählt werden, die rechts vom Hauptfenster (Main Panel) geöffnet werden. Dies sind vor allem die Auswertung von Kraftplateaus (Plateau Evaluation) und die Bestimmung von Federkonstanten (EquiLor).

Literaturverzeichnis

- [1] W Kunz, J Henle, and BW Ninham. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(1-2):19–37, 2004.
- [2] D Horinek, A Serr, M Geisler, T Pirzer, U Slotta, S. Q Lud, J. A Garrido, T Scheibel, T Hugel, and R. R Netz. Peptide adsorption on a hydrophobic surface results from an interplay of solvation, surface, and intrapeptide forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105:2842–2847, 2008.
- [3] R Lipowsky and E Sackmann, editors. *Structure and Dynamics of Membranes*, volume 1. Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [4] H Heise, T Bayerl, G Isenberg, and E Sackmann. Human platelet p-235, a talin-like actin binding protein, binds selectively to mixed lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 1061:121–131, 1991.
- [5] F Gotz. Staphylococcus and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43:1367–1378, 2002.
- [6] L Hall-Stoodley, JW Costerton, and P Stoodley. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2:95–108, 2004.
- [7] C Vendrely and T Scheibel. Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromolecular Bioscience*, 7(4):401–409, 2007.
- [8] X Chatellier, TJ Senden, JF Joanny, and JM di Meglio. Detachment of a single polyelectrolyte chain adsorbed on a charged surface. *Europhys Lett*, 41(3):303–308, Jan 1998.

- [9] T Hugel, M Grosholz, H Clausen-Schaumann, A Pfau, H Gaub, and M Seitz. Elasticity of single polyelectrolyte chains and their desorption from solid supports studied by afm based single molecule force spectroscopy. *Macromolecules*, 34(4):1039–1047, 2001.
- [10] M Geisler, T Pirzer, C Ackerschott, S Lud, J Garrido, T Scheibel, and T Hugel. Hydrophobic and hofmeister effects on the adhesion of spider silk proteins onto solid substrates: An AFM-based single-molecule study. *Langmuir*, 24(4):1350–1355, 2008.
- [11] C Friedsam, H. E Gaub, and R. R Netz. Probing surfaces with single-polymer atomic force microscope experiments. *Biointerphases*, 1(1):MR1–MR21, 2006.
- [12] F Hanke, L Livadaru, and H. J Kreuzer. Adsorption forces on a single polymer molecule in contact with a solid surface. *Europhys. Lett.*, 69(2):242–248, Jan 2007.
- [13] AS Thomas and AH Elcock. Molecular dynamics simulations of hydrophobic associations in aqueous salt solutions indicate a connection between water hydrogen bonding and the hofmeister effect. *Journal of the American Chemical Society*, 129:14887–14898, 2007.
- [14] EE Meyer, KJ Rosenberg, and J Israelachvili. Recent progress in understanding hydrophobic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences UAS*, 103(43):15739–15746, 2006.
- [15] D Chandler. Hydrophobicity: Two faces of water. *Nature*, 417(6888):491–491, 2002.
- [16] W Kauzmann. Chemical specificity in biological systems. *Review of Modern Physics*, 31:549–556, 1959.
- [17] C Tanford. How protein chemists learned about the hydrophobic factor. *Protein Science*, 6(6):1358–1366, 1997.
- [18] WF Mcdevit and FA Long. The activity coefficient on benzene in aqueous salt solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 74:1773–1777, 1952.
- [19] X Tadeo, M Pons, and O Millet. Influence of the hofmeister anions on protein stability as studied by thermal denaturation and chemical shift perturbation. *Biochemistry*, 46:917–923, 2007.

- [20] R Vogel. Influence of salts on rhodopsin photoproduct equilibria and protein stability. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(1-2):133–138, 2004.
- [21] J Koo, T Gutberlet, and C Czeslik. Control of protein interfacial affinity by nonionic cosolvents. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112:6292–6295, 2008.
- [22] S Lindman, WF Xu, O Szczepankiewicz, MC Bauer, H Nilsson, and S Linse. Salting the charged surface: ph and salt dependence of proteins g b1 stability. *Biophysical Journal*, 90:2911–2921, 2006.
- [23] AC Dumetz, AM Chockla, EW Kahler, and AM Lehnhoff. Effects of ph on protein-protein interactions and implications for protein phase behavior. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 1784:600–610, 2008.
- [24] J Israelachvili. *Intermolecular & Surface Forces*. Academic Press, Oxford, zweite edition, 1991.
- [25] DA Beard and H Qian, editors. *Chemical Physics*. Cambridge University Press, Cambridge, 2008.
- [26] H J Kreuzer, S H Payne, and L Livadaru. Stretching a macromolecule in an atomic force microscope: Statistical mechanical analysis. *Biophysical Journal*, 80(6):2505–2514, 2008.
- [27] M Geisler. Single molecule sensors to study hydrophobic phenomena. *Dissertation, TU München*, 2010.
- [28] A Radzicka and R Wolfenden. Comparing the polarities of the amino acids: Side-chain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane, 1-octanol, and neutral aqueous solution. *Biochemistry*, 27(5):1664–1670, 1988.
- [29] N Singh and SM Husson. Adsorption thermodynamics of short-chain peptides on charged and uncharged nanothin polymerfilms. *Langmuir*, 22:8443–8451, 2006.
- [30] R Glaser. *Biophysik*. Gustav Fischer Verlag, Jena, vierte edition, 1996.
- [31] M Grandbois, M Beyer, M Rief, H Clausen-Schaumann, and H Gaub. How strong is a covalent bond? *Science*, 283(5408):1727–30, 1999.

- [32] MK Beyer and H Clausen-Schaumann. Mechanochemistry: The mechanical activation of covalent bonds. *Chemical Reviews*, 105:2921–2948, 2005.
- [33] W Hoppe, W Lohmann, H Markl, and H Ziegler, editors. *Biophysik*. Springer Verlag, Berlin, zweite edition, 1982.
- [34] HJ Butt and M Kappl. *Surface and Interfacial Forces*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, first edition, 2010.
- [35] T Raschke. Water structure and interactions with protein surfaces. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(2):152–159, 2006.
- [36] MY Kiriukhin and KD Collins. Dynamic hydration numbers for biologically important ions. *Biophysical Chemistry*, 99(2):155–168, 2002.
- [37] KD Collins. Charge density-dependent strength of hydration and biological structure. *Biophysical Journal*, 72(1):65–76, 1997.
- [38] DE Goldsack and R Franchetto. The viscosity of concentrated electrolyte solutions. I. concentration dependence at fixed temperature. *Canadian Journal of Chemistry*, 55:1062–1072, 1977.
- [39] I Tinoco, K Sauer, JC Wang, and JD Puglise. *Physical Chemistry - Principles and Applications in Biological Sciences*. Pearson Education International, Upper Saddle River, New Jersey, fourth edition, 2002.
- [40] E Sackmann and R Merkel. *Lehrbuch der Biophysik*. Wiley-VCH, Weinheim, erste edition, 2010.
- [41] R Buchner, SG Capewell, G Hefter, and PM May. Ion-pair and solvent relaxation processes in aqueous Na_2SO_4 solutions. *Journal of Physical Chemistry B*, 103:1185–1192, 1999.
- [42] W Wachter, W Kunz, R Buchner, and G Hefter. Is there an anionic Hofmeister effect on water dynamics? dielectric spectroscopy of aqueous solutions of NaBr, NaI, NaNO_3 , NaClO_4 , and NaSCN. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(39):8675–8683, 2005.
- [43] R Buchner, GT Hefter, and PM May. Dielectric relaxation of aqueous NaCl solutions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103:1–9, 1999.

- [44] PK Weissenborn and RJ Pugh. Surface tension of aqueous solutions of electrolytes: Relationship with ion hydration, oxygen solubility, and bubble coalescence. *Journal of Colloid and Interface Science*, 184(2):550–563, 1996.
- [45] S Enders and H Kahl. Interfacial properties of water+alcohol mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 263:160–167, 2007.
- [46] P Petong, R Pottel, and U Kaatz. Water-ethanol mixtures at different compositions and temperatures. a dielectric relaxation study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 104:7420–7428, 2000.
- [47] WC Swope and HC Andersen. A molecular dynamics method for calculating the solubility of gases in liquids and the hydrophobic hydration of inert-gas atoms in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 88:6548–6556, 1984.
- [48] F Sedlmeier, J Janecek, C Sendner, L Bocquet, RR Netz, and D Horinek. Water at polar and nonpolar solid walls. *Biointerphases*, 3(3):FC23–FC39, 2008.
- [49] A Hartl, JA Garrido, S Nowy, R Zimmermann, C Werner, D Horinek, RR Netz, and M Stutzmann. The ion sensitivity of surface conductive single crystalline diamond. *Journal of the American Chemical Society*, 129(5):1287–1292, 2007.
- [50] R Schweiss, PB Welzel, C Werner, and W Knoll. Dissociation of surface functional groups and preferential adsorption of ions on self-assembled monolayers assessed by streaming potential and streaming current measurements. *Langmuir*, 17(14):4304–4311, 2001.
- [51] R Zimmermann, S Dukhin, and C Werner. Electrokinetic measurements reveal interfacial charge at polymer films caused by simple electrolyte ions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105:8544–8549, 2001.
- [52] J Lü, E Delamarche, L Eng, R Bennewitz, E Meyer, and H.-J Güntherodt. Kelvin probe force microscopy on surfaces: Investigation of the surface potential of self-assembled monolayers on gold. *Langmuir*, 15(23):8184–8188, 1999.
- [53] R Schweiss, PB Welzel, C Werner, and W Knoll. Dissociation of surface functional groups and preferential adsorption of ions on self-assembled

- monolayers assessed by streaming potential and streaming current measurements. *Langmuir*, 17:4304–4311, 2001.
- [54] KA Karraker and CJ Radke. Disjoining pressures, zeta potentials and surface tensions of aqueous non-ionic surfactant/electrolyte solutions: theory and comparison to experiment. *Advances in Colloid and Interface Science*, 96(1-3):231–264, 2002.
- [55] K Ciunel, M Armelin, GH Findenegg, and R von Klitzing. Evidence of surface charge at the air/water interface from thin-film studies on polyelectrolyte-coated substrates. *Langmuir*, 21:4790–4793, 2005.
- [56] N Schwierz, D Horinek, and RR Netz. Reversed anionic hofmeister series: The interplay of surface charge and surface polarity. *Langmuir*, 26:7370–7379, 2010.
- [57] P Jungwirth and DJ Tobias. Ions at the air/water interface. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(25):6361–6373, 2002.
- [58] Dominik Horinek and Roland R Netz. Specific ion adsorption at hydrophobic solid surfaces. *Physical Review Letters*, 99(22):226104, 2007.
- [59] RL Baldwin. How hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal*, 71(4):2056–2063, 1996.
- [60] MG Cacace, EM Landau, and JJ Ramsden. The hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 30(3):241–277, 1997.
- [61] JW Kurutz and SH Xu. Hofmeister solute effects on hydrophobic adhesion forces in sfm experiments. *Langmuir*, 17(23):7323–7326, 2001.
- [62] KD Collins, GW Neilson, and JE Enderby. Ions in water: Characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. *Biophysical Chemistry*, 128(2-3):95–104, 2007.
- [63] P Lo Nostro, BW Ninham, S Milani, A Lo Nostro, G Pesavento, and P Baglioni. Hofmeister effects in supramolecular and biological systems. *Biophysical Chemistry*, 124(3):208–213, 2006.
- [64] M Rubinstein and RH Colby. *Polymer Physics*. Oxford University Press, Oxford, first edition, 2003.

- [65] Oesterhelt Philipp. Kraftinduzierte sekundärstrukturänderungen in einzelnen molekülen. *Dissertation, LMU München*, 2001.
- [66] M Doi and SF Edwards. *The Theory of Polymerdynamics*. Oxford University Press, Oxford, first edition, 1986.
- [67] A Kumar, A Srivastava, IY Galaev, and B Mattiasson. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Progress in Polymer Science*, 32:1205–1237, 2007.
- [68] M Heskins and JE Guillet. Solution properties of poly(*n*-isopropylacrylamide). *Journal of Macromolecular Science A*, A2:1441–1455, 1968.
- [69] G Wanka, H Hoffmann, and W Ulbricht. Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxaethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromolecules*, 27:4145–4159, 1994.
- [70] DW Urry. Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers. *J. Phys. Chem. B*, 101:11007–11028, 1997.
- [71] FK Kneubühl. *Lineare und nichtlineare Schwingungen und Wellen*. Teubner Verlag, Stuttgart, erste edition, 1995.
- [72] JP Cleveland, S Manne, D Bocek, and PK Hansma. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 64(2):403–405, 1993.
- [73] CT Gibson, DA Smith, and CJ Roberts. Calibration of silicon atomic force microscope cantilevers. *Nanotechnology*, 16(2):234–238, 2005.
- [74] JE Sader, JWM Chon, and P Mulvaney. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments*, 70(10):3967–3969, 1999.
- [75] JL Hutter and J Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments*, 64(7):1868–1873, 1993.
- [76] HJ Butt and M Jaschke. Calculation of thermal noise in atomic-force microscopy. *Nanotechnology*, 6(1):1–7, 1995.

- [77] AP French. *Vibrations and waves*. Butler & Tanner Ltd., London, first edition, 1971.
- [78] R Proksch, TE Schäffer, JP Cleveland, RC Callahan, and MB Viani. Finite optical spot size and position corrections in thermal spring constant calibration. *Nanotechnology*, 15(9):1344–1350, 2004.
- [79] EL Florin, M Rief, H Lehmann, M Ludwig, C Dormair, VT Moy, and HE Gaub. Sensing specific molecular-interactions with the atomic-force microscope. *Biosensors and Bioelectronics*, 10(9-10):895–901, 1995.
- [80] MV Athawale, G Goel, T Ghosh, TM Truskett, and S Garde. Effects of lengthscales and attractions on the collapse of hydrophobic polymers in water. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104(3):733–738, 2007.
- [81] G Binnig, CF Quate, and C Gerber. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9):930–933, 1986.
- [82] JP Cleveland, B Anczykowski, AE Schmid, and VB Elings. Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 72(20):2613–2615, 1998.
- [83] G Bar, R Brandsch, M Bruch, L Delineau, and MH Whangbo. Examination of the relationship between phase shift and energy dissipation in tapping mode atomic force microscopy by frequency-sweep and force-probe measurements. *Surface Science*, 444(1-3):L11–L16, 2000.
- [84] Hendrik Dietz. Mechanik des Grün fluoreszierenden Proteins. *Diplomarbeit, LMU München*, 2004.
- [85] M Schlierf, F Berkemeier, and M Rief. Direct observation of active protein folding using lock-in force spectroscopy. *Biophysical Journal*, 93(11):3989–3998, 2007.
- [86] M Seitz, C Friedsam, W Jostl, T Hugel, and HE Gaub. Probing solid surfaces with single polymers. *ChemPhysChem*, 4(9):986–990, 2003.
- [87] T Pirzer and T Hugel. Atomic force microscopy spring constant determination in viscous liquids. *Review of Scientific Instruments*, 80(3):035110, 2009.

- [88] C Bergaud and L Nicu. Viscosity measurements based on experimental investigations of composite cantilever beam eigenfrequencies in viscous media. *Review of Scientific Instruments*, 71(6):2487–2491, 2000.
- [89] H Clausen-Schaumann, M Rief, C Tolksdorf, and HE Gaub. Mechanical stability of single dna molecules. *Biophysical Journal*, 78:1997–2007, 2000.
- [90] T Pirzer, M Geisler, T Scheibel, and T Hugel. Single molecule force measurements delineate salt, ph and surface effects on biopolymer adhesion. *Physical Biology*, 6(2):025004, 2009.
- [91] AF Stalder, G Kulik, D Sage, L Barbieri, and P Hoffmann. A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloid Surface A*, 286(1-3):92–103, 2006.
- [92] M Steenackers, ID Sharp, K Larsson, NA Hutter, M Stutzmann, and R Jordan. Structured polymer brushes on silicon carbide. *Chemistry of Materials*, 22:272–278, 2009.
- [93] T Djenizian, E Balaur, and P Schmucki. Direct immobilization of dna on diamond-like carbon nanodots. *Nanotechnology*, 17:2004–2007, 2006.
- [94] NA Hutter, A Reitingner, N Zhang, M Steenackers, OA Williams, JA Garrido, and R Jordan. Microstructured poly(2-oxazoline) bottle-brush brushes on nanocrystalline diamond. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12:4360–4366, 2010.
- [95] R Jordan, editor. *Surface-initiated Polymerization I & II*, volume Advanced Polymer Science 197 & 198. Springer, Berlin, 2006.
- [96] R Ducker, A Garcia, J Zhang, T Chem, and S Zauscher. Polymeric and biomacromolecular brush nanostructures: progress in synthesis, patterning and characterization. *Soft Matter*, 4:1774–1786, 2008.
- [97] A Turchanin, A Beyer, CT Nottbohm, X Zhang, R Stosch, A Sologubenko, J Mayer, P Hinze, T Weimann, and A Götzhäuser. One nanometer thin carbon nanosheets with tunable conductivity and stiffness. *Advanced Materials*, 21(12):1233–1237, 2009.
- [98] RC Advincula, WJ Brittain, KC Kaster, and J Rühe, editors. *Polymer Brushes*. Wiley-VCH, Weinheim, 2004.

- [99] I Amin, M Steenackers, N Zhang, X Zhang A Beyer, T Pirzer, T Hugel, R Jordan, and A Götzhäuser. Polymer carpets. *Small*, 6(15):1623–1630, 2010.
- [100] DW Urry. Five axioms for the functional design of peptide-based polymers as molecular machines and materials: Principle for macromolecular assemblies. *Biopolymers*, 47(2):167–178, 1998.
- [101] TE Creighton. *Proteins: Structures and Molecular Properties*. W. H. Freeman and Company, New York, second edition, 1993.
- [102] HE Auer and E Patton. Kinetics of the disordered chain-to- β transformation of poly(l-tyrosine) in aqueous solution. *Biophysical Chemistry*, 4(1):15 – 21, 1976.
- [103] JS Chiou, T Tatara, SSawamura, Y Kaminoh, H Kamaya, A Shibata, and I Ueda. The α -helix to β -sheet transition in poly(-lysine): Effects of anesthetics and high pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1119(2):211 – 217, 1992.
- [104] PM Abdella, PK Smith, and GP Royer. New cleavable reagent for cross-linking and reversible immobilization of proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 87(3):734–742, 1979.
- [105] G Vazquez, E Alvarez, and JM Navaza. Surface-tension of alcohol plus water from 20-degrees-C to 50-degrees-C. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 40(3):611–614, 1995.
- [106] DE Nelson and MM Cox. *Lehninger Biochemie*.
- [107] A Willmes. *Taschenbuch Chemische Substanzen*. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, zweite edition, 2001.
- [108] C Friedsam, A Del Campo Bécares, U Jonas, M Seitz, and HE Gaub. Adsorption of polyacrylic acid on self-assembled monolayers investigated by single-molecule force spectroscopy. *New Journal of Physics*, 6:9, 2004.
- [109] F Sedlmeier, D Horinek, and R Netz. Nanoroughness, intrinsic density profile, and rigidity of the air-water interface. *Physical Review Letters*, 103:136102, 2009.
- [110] PS Winnek and CLA Schmidt. The solubilities of the l-dihalogenated tyrosines in ethanol-water mixtures and certain related data. *J Gen Physiol*, 19(5):773–780, Jan 1936.

- [111] D Horinek and RR Netz. Specific ion adsorption at hydrophobic solid surfaces. *Physical Review Letters*, 99(22):1–4, 2007.
- [112] FY Lin, WY Chen, and MT Hearn. Microcalorimetric studies on the interaction mechanism between proteins and hydrophobic solid surfaces in hydrophobic interaction chromatography: Effects of salts, hydrophobicity of the sorbent, and structure of the protein. *Analytical Chemistry*, 73:3875–3883, 2001.
- [113] G Goobes, R Goobes, WJ Shaw, JM Gibson, JR Long, V Raghunathan, O Schueler-Furman, JM Popham, D Baker, CT Campbell, PS Stayton, and GP Drobny. The structure, dynamics, and energetics of protein adsorption - lessons learned from adsorption of statherin to hydroxyapatite. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45:S32–S47, 2007.
- [114] SH Cho, MS Jhon, SH Yuk, and HB Lee. Temperature-induced phase transition of poly(n,n-dimethylaminoethyl methacrylate-co-acrylamide). *J. of Polymer Science B: Polymer Physics*, 35:595–598, 1997.
- [115] R Hoogenboom, HML Thijs, MJHC Jochems, BM van Lankvelt, MWM Fijten, and US Schubert. Tuning the lct of poly(2-oxazoline)s by varying composition and molecular weight: alternatives to poly(n-isopropylacrylamide)? *Chemical Communications*, pages 5758–5760, 2008.
- [116] AP Sommer, A Caron, and HJ Fecht. Tuning nanoscopic water layers on hydrophobic and hydrophilic surfaces with laser light. *Langmuir*, 24:635–636, 2008.
- [117] S Huber. Schaltbare Poly(2-oxazolin)e. *Dissertation, TU München*, 2009.
- [118] DCD Seifert. Synthese und Charakterisierung von sensitiven vernetzungsfähigen blockcopolymeren mittels RAFT. *Dissertation, TU Dresden*, 2005.
- [119] K Autumn, YA Liang, ST Hsieh, W Zesch, WP Chan, TW Kenny, R Fearing, and RJ Full. Adhesive force of a single gecko foot-hair. *Nature*, 405(6787):681–685, 2000.
- [120] BN Balzer. Haftung und Reibung von Einzelpolymeren auf Festkörperoberflächen in wässrigen Medium. *Diplomarbeit, TU München*, 2008.

- [121] A Ghoorchian, JT Cole, and NB Holland. Thermoreversible micelle formation using a three-armed star elastin-like polypeptide. *Makromolekules*, pages 4340–4345, 2010.
- [122] A Beyer, A Godt, I Amin, CT Nottbohm, C Schmidt, J Zhao, and A Götzhäuser. Fully cross-linked and chemically patterned self-assembled monolayers. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10:7233–7238, 2008.
- [123] D Huemmerich, CW Helsen, S Quedzuweit, J Oschmann, R Rudolph, and T Scheibel. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry - US*, 43(42):13604–13612, 2004.
- [124] HJ Kreuzer, RLC Wang, and M Grunze. Hydroxide ion adsorption on self-assembled monolayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(27):8384–8389, Jan 2003.
- [125] J Kierfeld. Force-induced desorption and unzipping of semiflexible polymers. *Physical Review Letters*, 97(5):1–4, 2006.
- [126] L Koby, JB Ningappa, M Dakessian, and LA Cuccia. Chiral crystallization of ethylenediamine sulfate. *Journal of Chemical Education*, 82:1043–1045, 2005.
- [127] PSM Cheung and LA Cuccia. Amino acid directed mirror symmetry breaking and chiral amplification of ethylenediammonium sulfate crystals. *Chemical Communications*, pages 1337–1338, 2009.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in

- M Geisler, T Pirzer, C Ackerschott, SQ Lud, JA Garrido, T Scheibel und T Hugel. Influence of Hofmeister Salts on the adhesion of spider silk proteins onto hydrophobic substrates: an AFM-based single molecule study. *Langmuir*. 24:1350, 2008.
- D Horinek, A Serr, M Geisler, T Pirzer, U Slotta, SQ Lud, JA Garrido, T Scheibel, T Hugel und RR Netz. Peptide adsorption on a hydrophobic surface results from an interplay of solvation, surface, and intrapeptide forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105:2842, 2008.
- T Pirzer und T Hugel. Atomic force microscopy spring constant determination in viscous liquids. *Review of Scientific Instruments*. 80:035110, 2009.
- T Pirzer, M Geisler, T Scheibel und T Hugel. Single molecule force measurements delineate salt, pH and surface effects on biopolymer adhesion. *Physical Biology*. 6:025004, 2009.
- T Pirzer und T Hugel. Adsorption mechanism of polypeptides and their location at hydrophobic interfaces. *ChemPhysChem*. 10:2795, 2009.
- I Amin, M Steenackers, N Zhang, A Beyer, X Zhang, T Pirzer, T Hugel, R Jordan und Armin Götzhäuser. Polymer Carpets. *Small*. 6:1623, 2010.

Danksagung

Keine Schuld ist dringender als die, Dank zu sagen
(*Marcus Tullius Cicero*)

An erster Stelle möchte ich Prof. Thorsten Hugel danken. Ohne seine exzellente Betreuung und der großen „künstlerischen“ Freiheit während der letzten Jahre wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Großen Dank bin ich meinen Kollegen Bizan, Frank, Michael Gr., Sandra und Steffi verpflichtet. Es gibt einfach keine besseren Kollegen.

Achtung: Jedes Polymer könnte Spuren von AFP enthalten!

Weiterhin danke ich den ehemaligen Mitgliedern meiner Subgroup; angefangen bei meinem ersten Studenten Bizan, meiner Bachelorstudentin Katrin Ziegelbauer, Alessandro Sepe für seine Hilfe mit *Lucy* und meiner Praktikantin Bettina Kracke. Nicht zu vergessen sind die drei Grazien Christin, Martina und Katharina.

Ohne meine Kooperationspartner hätte ich es natürlich auch nicht geschafft. Vielen Dank Nadine und Dominik für produktive Diskussionen über theoretische Biophysik, Simon für die Diamanten, Naima und Marin für die Smartness in dieser Welt, David und Ute für die Spinnenseidenproteine. Vielen Dank Ali, Jim, Mehmet und Nolan für den Aufenthalt in Cleveland und für die ELPs.

Natürlich darf ich alle Mitarbeiter und Kollegen am IMETUM und den Lehrstühlen für Biophysik des Physik-Departments nicht vergessen. Auch euch schulde ich Dank. Barney, vielen Dank für deine Erzählungen, denn sie haben mich auf das Leben vorbereitet. Ich danke der Kino-Crew für tolle Lichtspielabende. Leider kann ich nicht alle namentlich nennen.

Ein besonderer Dank gehört meinen Eltern auf die ich jederzeit bauen konnte und die mir letzten Endes all dies erst ermöglicht haben.

Zu guter Letzt danke ich noch all meinen Freunden, den alten und den vielen neuen, aber insbesondere Stefan und Meike, Andi, Christoph, Mike und Li Lu.