

Molekular geprägte Nanopartikel als biomimetisches Erkennungselement in der optischen Sensorik

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Felix Kolarov
aus Reutlingen

Tübingen
2014

Tag der mündlichen Qualifikation:

18.06.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Günter Gauglitz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Udo Weimar

Danksagung

Nach nun fast viereinhalb Jahren ist die Zeit gekommen, sich zu bedanken. Danke an all jene, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit hier zu verfassen und auch an all jene liebenswürdigen Menschen, die mir eine sehr große Hilfe bei dieser Arbeit waren. Mein außerordentlicher Dank gilt zunächst einmal meinem Doktorvater Herrn Gauglitz, dem ich natürlich für die Betreuung, aber auch für Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten, von ganzem Herzen Danken möchte.

Udo Weimar danke ich für die Übernahme des Co-Referates dieser Arbeit.

Auch dem gesamten AK Gauglitz gilt mein Dank. Danke für die zahlreichen schönen Stunden, die schönen Diskussionen und die tolle Arbeitsatmosphäre, die man hier erleben durfte. Ich werde mich immer wieder gerne an diese tolle Zeit mit euch erinnern. Besonders werden mir unsere schönen vielen Ausflüge, die langen Abende an denen es etwas zu feiern gab und auch das schöne Frühstück jeden Freitagmorgen in Erinnerung bleiben.

Ein großes Dankeschön gilt auch Frau Elke Nadler für die REM-Messungen. Lothar Leider danke ich für die ellipsometrischen Messungen und für die Hilfestellung bei dem ein oder anderen mathematischen Problem. Peter Fechner und Oliver Bleher danke ich für die Diskussionen über Bindungskinetik und die Hilfestellung bei allerlei Auswertungen und Computerproblemen. Ich danke Oli auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die schöne Zeit die ich mit dir als Bürokollegen verbringen durfte. Meinem ehemaligen Bürokollegen Alexander Le Blanc danke ich ebenso für die schöne Zeit zusammen im Verfügungsgebäude und für die Einweisung in die Kalorimetrie. Melanie Ewald möchte ich für die schönen Jahre danken die wir hatten. Auch danke ich dir für die vielen kleinen Tipps und Verbesserungen von Postern, Abstracts und Sonstigem, die du mir immer gegeben hattest.

Vielen Dank auch an Dominik Furin. Dir möchte ich für die tolle Zeit, die vielen Diskussionen, für die Unterstützung und auch dafür, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest. Vielen Dank auch für die Hilfe bei den ganzen vielen Deliverables und anderen Berichten, die wir für INSTANT verfassen mussten. Julia Widmaier danke ich insbesondere für die Hilfe bei den ganzen vielen organisatorischen Dingen, die für INSTANT erledigt werden mussten.

Außerhalb unserer Arbeitsgruppe möchte ich vor allem bei Klaus Niedergall und der restlichen Arbeitsgruppe von Herrn Tovar bedanken, die mich mit L-BFA MIPs und vielen Informationen versorgten. Tobias Morawietz danke ich hierbei insbesondere für die Bereitstellung der Partikel zur kovalenten Immobilisierung. Auch danke ich Herrn Kolocouris aus Athen für die Bereitstellung der vielen Proben und die zahlreichen guten wissenschaftlichen Diskussionen, die wir über die Ergebnisse führten.

Zu Guter Letzt möchte ich mich auch gerne bei Nadja Baur bedanken für ihre große Unterstützung, das Korrekturlesen dieser Arbeit und natürlich auch für die vielen aufmunternden Worte falls es mal gerade nicht so lief wie man das gerne hätte. Vielen Dank Dir!

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
2.	THEORETISCHER TEIL	3
2.1	Wechselwirkung von Strahlung und Materie	3
2.1.1	Elektromagnetische Strahlung	3
2.1.2	Reflektion und Brechung	3
2.1.3	Reflektion am Mehrschichtsystem	4
2.1.4	Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS)	6
2.1.5	Absorption von Strahlung	8
2.2	Thermodynamische Grundlagen	9
2.2.1	Erster Hauptsatz der Thermodynamik	9
2.2.2	Zweiter Hauptsatz der Thermodynamik	9
2.2.3	Die Freie Enthalpie	10
2.2.4	Die Freie Enthalpie von Reaktionen	11
2.2.5	Bestimmung von thermodynamischen Reaktionsparametern	11
2.2.6	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	12
2.3	Zwischenmolekulare Wechselwirkungen	15
2.3.1	Elektrostatische Wechselwirkungen	15
2.3.2	Induktive Wechselwirkungen	15
2.3.3	Dispersionswechselwirkungen	16
2.3.4	Hydrophobe Wechselwirkungen	16
2.3.5	Wasserstoffbrückenbindungen	16
2.4	Wechselwirkungsprozesse an Oberflächen	17
2.5	Molekular geprägte Polymere (MIPs)	19
2.5.1	Allgemeine Beschreibung von molekular geprägten Polymeren	19
2.5.2	Polymerisationsverfahren zur Synthese von MIPs	21
2.5.3	Molekulare Erkennung in molekular geprägten Polymeren	22
2.5.4	Anwendungen von molekular geprägten Polymeren	23
2.6	Der M2-Protonenkanal	25
2.6.1	Funktion des M2-Protonenkanals	25
2.6.2	Hemmung des M2-Protonenkanals	25
2.6.3	Aufbau des M2-Protonenkanals und Wechselwirkung mit Hemmstoffen	25
3.	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	28
3.1.1	Grundlagen	28
3.1.2	Betriebsmodi in der Rasterkraftmikroskopie	29
3.1.3	Verwendetes Gerät	29

3.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	29
3.2.1	Grundlagen	29
3.2.2	Verwendetes Gerät	30
3.3	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	30
3.3.1	Grundlagen	30
3.3.2	Kalibrieren des Kalorimeters	31
3.3.3	Bestimmung von Affinitätskonstanten mittels ITC	32
3.3.4	Verwendetes Gerät	34
3.4	Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RlFS)	34
3.4.1	Grundlagen	34
3.4.2	Durchführung von RlFS-Messungen	34
3.4.3	Referenzieren von RlFS-Messungen	35
3.4.4	Bestimmung von kinetischen und thermodynamischen Parametern mittels RlFS	35
3.4.5	Bestimmung analytischer Parameter	36
3.4.6	Verwendete Komponenten	37
3.5	Oberflächenpräparation	37
3.5.1	Oberflächenpräparation	37
3.5.2	Oberflächenreinigung und -aktivierung	37
3.5.3	Silanisierung mit GOPTS	38
3.5.4	Silanisierung mit APTES	38
3.5.5	Modifikation mit PEG	38
3.5.6	Modifikation mit AMD	38
3.5.7	Nichtkovalente Anbindung der nanoMIPs/nanoNIPs	38
3.5.8	Kovalente Anbindung modifizierter nanoMIPs/nanoNIPs	38
3.6	Sonstige Methoden	39
3.6.1	Batch Bindungsexperimente	39
3.6.2	Entfernung der Polymerpartikel aus Suspensionen	39
3.6.3	Bestimmung der adsorbierten Stoffmenge durch UV/Vis Messungen	39
3.6.4	Bestimmung der maximalen Löslichkeit von L-BFA	39
3.6.5	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von L-BFA	39
3.6.6	Durchführung von ITC-Messungen mit Polymerpartikeln	40
3.6.7	Durchführung von ITC-Messungen mit Peptiden	40
3.7	Software	41
3.8	Chemikalien	42
3.8.1	Strukturformeln für Kapitel 4.1 und Kapitel 4.2 relevante Moleküle	42
3.8.2	Strukturformeln für Kapitel 4.3 relevante Moleküle	43
3.9	Lösungen, Suspensionen, Puffer	44
3.10	Geräte	45

4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	46
4.1	Molekular geprägte Nanopartikel als sensitive Schicht	46
4.1.1	Elektrostatische Immobilisierung	46
4.1.1.1	RIFS-Messungen mit elektrostatisch immobilisierten nanoMIPs	49
4.1.1.2	Vergleich verschiedener Oberflächenmodifikationen	51
4.1.1.3	Chip zu Chip Reproduzierbarkeit	52
4.1.1.4	Bewertung analytischer Rahmenparameter der MIPs	53
4.1.1.5	Stabilität der Oberflächen	55
4.1.1.6	Kurzzusammenfassung Kapitel 4.1.1	58
4.1.2	Kovalente Immobilisierung von nanoMIPs	59
4.1.2.1	Möglichkeiten und Voruntersuchungen	59
4.1.2.2	Oberflächenbelegung und RIFS-Messungen	60
4.1.2.3	Kurzzusammenfassung Kapitel 4.1.2	61
4.2	Untersuchungen des Prägeeffekts	63
4.2.1	Lösemittelabhängigkeit des RIFS Bindungssignals und des Prägeeffektes	63
4.2.1.1	Untersuchung der lösemittelabhängigen Selektivität	66
4.2.1.2	Untersuchung der Enantioselektivität	67
4.2.2	Ermittlung der Gleichgewichtskonstante der Templat-Polymer Wechselwirkung mittels RIFS	70
4.2.3	Bestimmung kinetischer Daten der Wechselwirkung	74
4.2.3.1	Betrachtung der Dissoziationsphase	74
4.2.3.2	Vergleich der ermittelten Dissoziationsratenkonstanten	75
4.2.3.3	Betrachtung der Assoziationsphase	79
4.2.4	Bestimmung der Bindungsenthalpie der Wechselwirkung	86
4.2.4.1	Messtechnische Anforderungen	86
4.2.4.2	Ergebnisse der Bestimmung der Wechselwirkungsenthalpie	88
4.2.4.3	Ursachen der Lösemittelabhängigkeit der Wechselwirkungsenthalpie	90
4.2.4.4	Betrachtung der Bindungsentropie	91
4.2.5	Kurzzusammenfassung Thermodynamik und Kinetik der Wechselwirkung zwischen MIP, NIP und Templatmolekül	94
4.3	Untersuchung des M2-Protonenkanals	95
4.3.1	Auswertung der ITC-Messungen	95
4.3.1.1	Nichtlineare Kurvenanpassung	95
4.3.1.2	Auswertestrategie	96
4.3.2	Voruntersuchungen des Systems	97
4.3.2.1	Optimale Messbedingungen	97
4.3.2.2	Spezifität der Bindung	97
4.3.3	Ergebnisse der Messungen	99
4.3.3.1	Ergebnisse für Am, Rim und Ligand 24	102
4.3.3.2	Ergebnisse für Ligand 8, 9, 10, 11	104
4.3.3.3	Ergebnisse für Lig 13, 16, 27, 26	106
4.3.3.4	Ergebnisse für Ligand 14, 16, 17, 18	108
4.3.4	Vergleich zu berechneten Werten	109

5.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	112
5.1	Zusammenfassung	112
5.2	Ausblick	114
6.	LITERATURVERZEICHNIS	116
7.	ANHANG	121
7.1	Abkürzungsverzeichnis	121
7.2	Veröffentlichungen:	123
7.2.1	Publikationen	123
7.2.2	Poster	123
7.2.3	Vorträge	124
7.3	Akademische Lehrer	125
7.4	Titrationenkurven der ITC-Messungen	126

1. Einleitung

Ein flexibel einsetzbares Sensorsystem, das einen schnellen Nachweis jedes beliebigen Analyten innerhalb kürzester Zeit in komplexen Matrices erlaubt und dabei auch unter widrigsten Bedingungen funktioniert, ist Fiktion und wird es vermutlich auch immer bleiben. Zu komplex und zum Teil widersprüchlich sind die Anforderungen in ihrer Gesamtheit an ein solches Sensorsystem. Allein einem Teil der Kriterien dieses Forderungskataloges zu entsprechen ist bereits eine Herausforderung. Einer eben solchen Herausforderung stellt sich diese Arbeit. Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Charakterisierung sensitiver Schichten, die Selektivität und Robustheit in sich vereinen und so auch widrigen Bedingungen trotzen können.

Der am weitesten verbreitete Ansatz um Selektivität in einem Sensor zu erhalten, liegt in der Nutzung von Antikörpern. Diese biologischen Erkennungselemente ermöglichen eine zielgenaue molekulare Erkennung. Antikörper sind jedoch teuer in ihrer Herstellung, sind nicht sehr robust und denaturieren innerhalb kurzer Zeit unter widrigen Bedingungen wie hohen Temperaturen, hohem oder niedrigem pH-Wert oder hohen Salzkonzentrationen [1]. Um nun eine hohe Selektivität wie die von Antikörpern mit mehr Robustheit zu kombinieren, können alternativ zum Beispiel DNA oder RNA basierte Aptamere [2], oder auch peptidbasierte Scaffolds [3] eingesetzt werden. Allerdings erlauben diese Erkennungselemente nicht immer eine Detektion in nichtwässrigen Medien, sind nicht auf jeden Analyt anwendbar und können ebenfalls denaturieren. Molekular geprägte Polymere (MIPs) [4] erweitern dieses Spektrum an Erkennungselementen und vereinen molekulare Selektivität und Robustheit in sich. Diese Polymere imitieren biomolekulare Erkennungsprozesse und verfügen über Bindungskavitäten mit einer zum Zielanalyten komplementären Struktur.

Das Konzept des molekularen Prägens ist seit den 1980er Jahren [5] bekannt, wurde seitdem zunehmend optimiert und auf eine zunehmende Zahl an Analyten angewendet. Die Verwendung von MIPs als Erkennungselement in Sensoren ist eine jüngere Entwicklung der letzten 20 Jahre, wobei die Anzahl der Publikationen zu diesem Thema innerhalb der letzten Jahre rapide steigt. Das Hauptaugenmerk liegt dabei nicht nur auf der Entwicklung von MIPs zum Nachweis stets neuer Analyten; von ebenso hoher Bedeutung sind die Entwicklung von neuen physikalischen Formen der MIPs und deren Kombination mit verschiedenen Transduktionsprinzipien, um die Wechselwirkung zwischen Analyt und MIP auszulesen. Auch sind noch viele Details zur molekularen Erkennung der MIPs nicht eingehend untersucht.

Die physikalische Form der MIPs ist von entscheidender Bedeutung für die Leistungsfähigkeit des Sensorsystems. So zeigten erste Arbeiten mit flächig aufgetragenen MIP Schichten nur sehr langsame Ansprechzeiten und waren oftmals nur schlecht regenerierbar [6]. Bei alleiniger Nutzung der Oberfläche durch sogenanntes „surface imprinting“ konnten zwar schnelle Ansprechzeiten erzielt werden, die Anzahl der Bindungsstellen war jedoch gering und somit auch die erzielte Signaldynamik [7]. Um nun schnelle Ansprechzeiten und eine hohe Signaldynamik des Sensors zu erzielen, muss dementsprechend die zur Wechselwirkung zur Verfügung stehende Oberfläche vergrößert werden. Der beste Weg zur Vergrößerung der Oberfläche der sensitiven Schicht besteht dabei in der Nutzung von möglichst kleinen Partikeln. Das einfache Mahlen eines Polymermonolithen ist dabei wenig zielführend. Man erhält nur eine sehr geringe

Menge in der angestrebten Größe, die Partikel sind sehr inhomogen in ihrer Morphologie [8] und für sensorische Anwendungen eher ungeeignet [9]. Sehr homogene, sphärische Polymerpartikel mit enger Größenverteilung lassen sich durch spezielle Polymerisationstechniken, wie z.B. die Miniemulsionspolymerisation erhalten. Mit dieser Technik ist es zudem auch möglich, molekular geprägte Polymerpartikel herzustellen [10].

Ein Ziel dieser Arbeit ist es nun, sich diese Partikel als sensitive Schicht für optische Sensoren zu Nutze zu machen. Hierzu werden verschiedene Ansätze zur Präparierung der sensitiven Schichten untersucht und miteinander verglichen. Die Stabilität dieser sensitiven Schichten, insbesondere gegenüber widrigen Bedingungen, sowie die sensorischen Charakteristika der Schichten werden dabei eingehend evaluiert. Als Transduktionsprinzip zum Auslesen der Wechselwirkung wird in dieser Arbeit die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) verwendet. Ein großer Vorteil dieses Transduktionsprinzips liegt dabei darin, dass der Bindungsvorgang der Analyten an das MIP zeitaufgelöst verfolgt werden kann, was es erlaubt, ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu formulieren. Dieses weitere Ziel besteht darin, die Kinetik und Thermodynamik der Wechselwirkung zwischen MIP und Analyt näher zu untersuchen und somit die ablaufenden Wechselwirkungsprozesse bei der molekularen Erkennung dieser biomimetischen Erkennungselemente besser zu verstehen. Um dies zu verwirklichen, wird untersucht, ob in Biosensoren klassischerweise verwendete Bindungsmodelle auch auf MIPs angewendet werden können, welche Limitierungen dabei existieren und inwiefern sich die Bindungsparameter bei Änderung der Umgebungsbedingungen ändern. Durch die Kombination mit kalorimetrischen Messungen kann zudem aufgezeigt werden, wie sich Enthalpie und Entropie der Wechselwirkung entsprechend verhalten. Basierend auf der Gesamtheit dieser Daten wird ein Modell postuliert, das die Wechselwirkung zwischen MIP und Analyt detailliert beschreibt. Diese Arbeiten, die die Kombination aus optischer Sensorik und MIPs als Erkennungselement darstellen, fanden im Rahmen der vom Land Baden-Württemberg geförderten Projekte „Biomimetischer Prozesssensor“ (Förderkennzeichen 33-720.830-6-16A) und „BioMIP“ (Förderkennzeichen 7533-7-11.6-5A) statt.

Der letzte Teil dieser Arbeit befasst sich ebenfalls mit der Untersuchung molekularer Wechselwirkungen. Hierbei wird untersucht, wie sich geringfügige strukturelle Änderungen eines Liganden auf dessen Wechselwirkung mit der Bindungstasche eines Protonenkanals auswirken. Dabei wird aufgezeigt, dass eine günstige Enthalpie der Wechselwirkung nicht immer ausreicht, sondern auch der entropische Beitrag von hoher Bedeutung für eine gute Anbindung in die Bindungstasche ist.

2. Theoretischer Teil

2.1 Wechselwirkung von Strahlung und Materie

2.1.1 Elektromagnetische Strahlung

Elektromagnetische Strahlung kann als Transversalwelle mit der allgemeinen Wellengleichung (siehe Gl. 2.1.1) beschrieben werden.

$$\Psi = \Psi_0 \cdot e^{i(\vec{k} \cdot \vec{x} - \omega t - \varphi)} \quad \text{Gl. 2.1.1}$$

Die Welle verfügt dabei über einen elektrischen und einen magnetischen Feldvektor, die orthogonal zueinander und orthogonal zum Wellenvektor \vec{k} stehen. Schwingen die elektrischen Feldvektoren mehrerer Photonen in ein und derselben Ebene wird die Strahlung hierbei als linear polarisiert bezeichnet. Weitere Polarisationsformen sind die elliptische Polarisation und die zirkulare Polarisation, bei denen der resultierende elektrische Feldvektor eine Ellipse bzw. eine Kreisbahn um die Ausbreitungsrichtung beschreibt. Die Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit Materie kann am allgemeinsten über den Brechungsindex n beschrieben werden, der sich aus dem Quotienten der Phasengeschwindigkeit der elektromagnetischen Strahlung im Vakuum (c_0) und innerhalb von Materie (c) ergibt.

$$n = \frac{c_0}{c} \quad \text{Gl. 2.1.2}$$

Durch den Brechungsindex lässt sich nicht nur die Ausbreitung von Licht innerhalb von Materie beschreiben, sondern auch das Verhalten an Phasengrenzen, sowie, bei Mitberücksichtigung des Imaginärteils des Brechungsindex, auch das Absorptionsverhalten von Materie.

2.1.2 Reflexion und Brechung

Trifft ein Lichtstrahl auf eine Grenzfläche zwischen zwei Medien unterschiedlicher Brechungsindices, so kommt es zu Reflexion und Brechung, wie in Abbildung 1 illustriert.

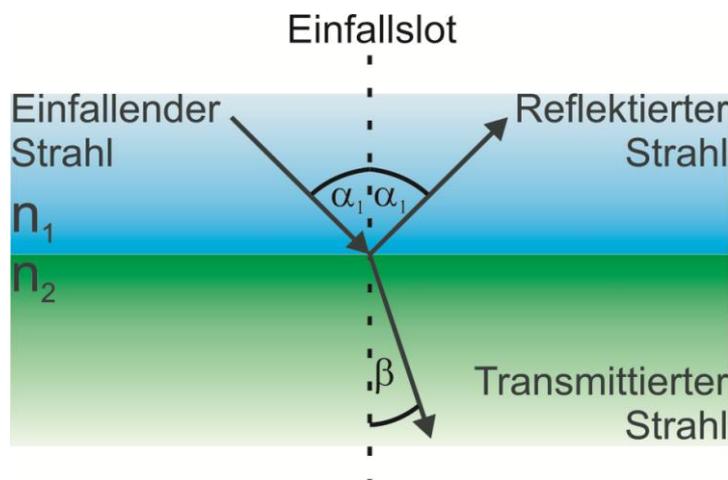


Abbildung 1: Reflexion und Brechung an einer Grenzschicht

Der reflektierte Anteil sowie der Brechungswinkel β werden hierbei durch den Einfallswinkel α und den Brechungsindices n_1 und n_2 beider Medien bestimmt. Den Zusammenhang zwischen diesen Größen stellt hierbei das Brechungsgesetz von Snellius (Gl. 2.1.3) her:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_1}{n_2} \quad \text{Gl. 2.1.3}$$

Der reflektierte bzw. transmittierte Anteil des Lichtes lässt sich aus den Fresnelschen Gleichungen ableiten. Bei den Fresnelschen Gleichungen wird hierbei zwischen senkrecht und parallel zur Einfallsebene polarisiertem Licht differenziert. Für nicht magnetische Materialien mit gleicher magnetischer Permeabilität erhält man hierbei für die Amplitude des parallel zur Einfallsebene polarisierten Teilstrahls:

$$\left(\frac{E_t}{E_e} \right)_{\text{parallel}} = t_{\text{parallel}} = \frac{2n_1 \cdot \cos \alpha_e}{n_1 \cdot \cos \alpha_e + n_2 \cdot \cos \alpha_t} \quad \text{Gl. 2.1.4}$$

$$\left(\frac{E_r}{E_e} \right)_{\text{parallel}} = r_{\text{parallel}} = \frac{n_2 \cdot \cos \alpha_e - n_1 \cdot \cos \alpha_t}{n_2 \cdot \cos \alpha_e + n_1 \cdot \cos \alpha_t} \quad \text{Gl. 2.1.5}$$

Hierbei werden t_i und r_i als Amplitudentransmissionskoeffizienten bzw. Amplitudenreflektionskoeffizienten bezeichnet. Entsprechend ergibt sich für die Amplitude des senkrecht zur Einfallsebene polarisierten Teilstrahls:

$$\left(\frac{E_t}{E_e} \right)_{\text{senkrecht}} = t_{\text{senkrecht}} = \frac{2n_1 \cdot \cos \alpha_e}{n_2 \cdot \cos \alpha_e + n_1 \cdot \cos \alpha_t} \quad \text{Gl. 2.1.6}$$

$$\left(\frac{E_r}{E_e} \right)_{\text{senkrecht}} = r_{\text{senkrecht}} = \frac{n_1 \cdot \cos \alpha_e - n_2 \cdot \cos \alpha_t}{n_1 \cdot \cos \alpha_e + n_2 \cdot \cos \alpha_t} \quad \text{Gl. 2.1.7}$$

Betrachtet man nun den Fall eines senkrechten Auftreffens nicht polarisierter Strahlung auf eine Grenzfläche, so ergibt sich für diesen Spezialfall das Reflektionsvermögen R nach Gl. 2.1.8:

$$R = \frac{I_r}{I_e} = \left(\frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \right)^2 \quad \text{Gl. 2.1.8}$$

Das Reflektionsvermögen R ist hierbei gleich dem Quotient aus der Intensität des reflektierten Lichtes I_r und des einfallenden Lichtes I_e .

2.1.3 Reflektion am Mehrschichtsystem

Die Grundlage für die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) bildet die Vielfachreflektion an dünnen Schichten [11]. Als „dünne Schichten“ werden hierbei Schichten bezeichnet, deren Dicke im Bereich der Wellenlänge des verwendeten Lichts liegt. Bei einem solchen System aus mehreren planparallelen dünnen Schichten treten an jeder Phasengrenze Reflektion und bei nicht senkrechter Einstrahlung auch Brechung auf. Die Überlagerung der

Theoretischer Teil

reflektierten Teilstrahlen führt hierbei zur Interferenz. Die hierbei auftretenden Prozesse lassen sich gut an einem Dreischichtsystem exemplarisch zeigen. Ausgangspunkt ist eine Welle der Intensität 1, die in die dünne Schicht eindringt.

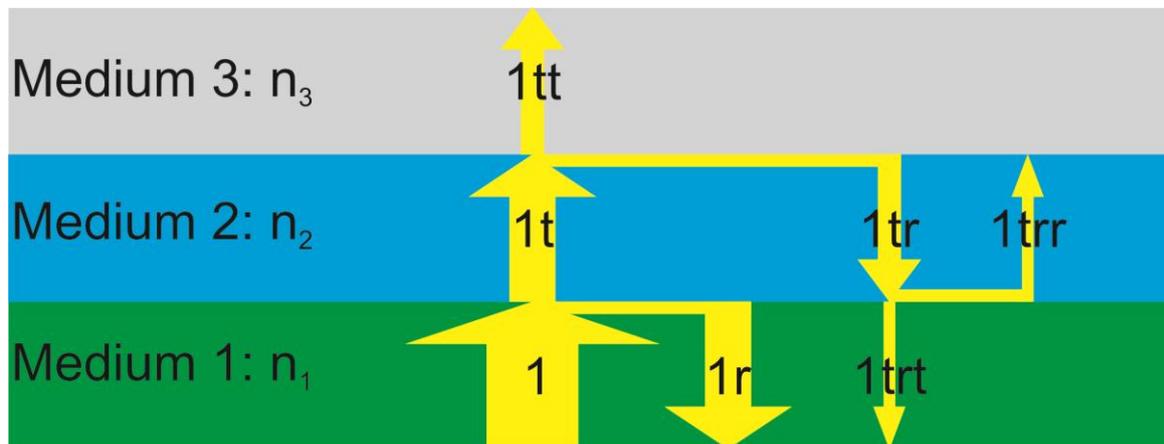


Abbildung 2: Reflektion an dünnen Schichten. Der einfallende Strahl (1) tritt durch die Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes hindurch, wird jedoch an den einzelnen Phasengrenzen teilweise reflektiert.

An der Phasengrenze zwischen Medium 1 und Medium 2 wird ein Teil der eindringenden Welle reflektiert, der reflektierte Teilstrahl (1r) ergibt sich nach Gl. 2.1.9, die Intensität entsprechend aus dem Quadrat von r_1 .

$$r_1 = \frac{n_1 - n_2}{n_1 + n_2} \quad \text{Gl. 2.1.9}$$

Die Intensität der transmittierten Welle (1t) wird somit auf den Wert $\sqrt{1-r_1^2}$ reduziert. An der Phasengrenze zwischen Medium 2 und Medium 3 findet erneut Reflektion statt. Der reflektierte Teilstrahl (1tr) ergibt sich gemäß Gl. 2.1.10:

$$r_2 = \frac{n_2 - n_3}{n_2 + n_3} \quad \text{Gl. 2.1.10}$$

Zurück in Richtung der Phasengrenze 1/2 läuft somit ein Strahl (1tr) mit der Amplitude $r_2 \cdot \sqrt{1-r_1^2}$, der in Medium 3 transmittierte Strahl (1tt) hat eine Amplitude von $r_2 \cdot (1-r_1^2)$. Wenn die an der Phasengrenze zwischen Medium 2 und Medium 3 reflektierte Welle auf die Phasengrenze zwischen Medium 1 und Medium 2 trifft, so wird erneut ein Teil reflektiert (1trr) und transmittiert (1trt). Die reflektierte Amplitude ergibt sich zu $-r_1 \cdot r_2 \cdot \sqrt{1-r_1^2} \cdot e^{-i\Delta_1}$, der transmittierte Teil wird erneut um den Faktor $\sqrt{1-r_1^2}$ reduziert. Der Strahl (1trt) verlässt demnach die Schicht mit der Amplitude $r_2 \cdot (1-r_1^2)$.

Zu beachten ist hierbei, dass der Strahl 1trt die dünne Schicht „Medium 2“ zweimal durchlaufen hat. Es besteht somit ein Gangunterschied von $2 \cdot n_2 \cdot d_2$ zwischen den reflektierten Strahlen 1r und 1trt, womit sich die Phase wie folgt ergibt:

$$\Delta_1 = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot n_1 \cdot d_1 \quad \text{Gl. 2.1.11}$$

Für die Superposition dieser beider Strahlen ergibt sich:

$$r_1 + r_2 \cdot (1 - r_1^2) \cdot e^{-i\Delta_1} \quad \text{Gl. 2.1.12}$$

Da immer ein Teil wieder reflektiert wird, kommt man auf eine unendliche Zahl an mehrfachreflektierten Teilwellen, die sich überlagern. Man erhält hierbei für die final resultierende Welle folgenden Ausdruck:

$$r \cdot e^{i\varepsilon} = \frac{r_1 + r_2 \cdot e^{-i\frac{4\pi}{\lambda} n_2 d_2}}{1 + r_1 \cdot r_2 \cdot e^{-i\frac{4\pi}{\lambda} n_2 d_2}} \quad \text{Gl. 2.1.13}$$

Die Multiplikation mit dem komplex konjugierten Wert ergibt die Reflektivität:

$$R = \left| r \cdot e^{i\varepsilon} \right|^2 = \frac{r_1^2 + r_2^2 + 2 \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot \cos \Delta_1}{1 + r_1^2 \cdot r_2^2 + 2 \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot \cos \Delta_1} \quad \text{Gl. 2.1.14}$$

Die wellenlängenabhängige Reflektivität an dünnen Schichten wird demnach nicht nur über den Brechungsindex der Materialien bestimmt, sondern wird durch den Gangunterschied moduliert.

2.1.4 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RfS)

Wie aus dem letzten Abschnitt hervorgeht, hängt das Reflektionsvermögen dünner Schichten direkt vom Aufbau des Schichtsystems (physikalische Schichtdicke, Brechungsindex) sowie von der Wellenlänge ab. Diese physikalischen Zusammenhänge macht man sich bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie zu Nutze.

Hierzu wird Weißlicht von unten senkrecht auf einen optisch transparenten Transducer gestrahlt. Auf der Oberseite des Transducers befindet sich eine sensitive Schicht, die mit einem Analyten wechselwirken kann. Das eingestrahlte Licht wird an den Phasengrenzen des Transducers reflektiert. Die reflektierten Teilstrahlen überlagern sich, man erhält demnach ein für ein bestimmtes Schichtsystem charakteristisches Interferenzspektrum, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben. Ändern sich die optischen Eigenschaften der sensitiven Schicht (sprich physikalische Schichtdicke und/oder Brechungsindex) beispielsweise durch Anbindung eines Analyten, so hat dies entsprechende Änderungen im Interferenzspektrum zur Folge. Die Intensität des reflektierten Teilstrahls lässt sich nach Gleichung Gl. 2.1.15 berechnen [12]:

$$\frac{I_R}{I_0} = r_1^2 + r_2^2 + 2 \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot \cos \left(\frac{4 \cdot \pi \cdot n \cdot d}{\lambda} \right) \quad \text{Gl. 2.1.15}$$

Theoretischer Teil

Für den Fall, dass keine Phasensprünge auftreten, erhält man mit den Intensitäten der reflektierten Teilstrahlen I_1 und I_2 :

$$I_R = I_1 + I_2 + 2 \cdot \sqrt{I_1 \cdot I_2} \cdot \cos\left(\frac{4 \cdot \pi \cdot n \cdot d}{\lambda}\right) \quad \text{Gl. 2.1.16}$$

Man erhält somit für ganzzahlige Vielfache des Terms $\frac{2 \cdot n \cdot d}{\lambda}$ Maxima, für halbzahlige Vielfache

Minima. Verfolgt man nun die zeitliche Änderung eines Extrempunktes im Interferenzspektrum, so kann auf die Änderung der optischen Schichtdicke (Produkt aus Brechungsindex n und physikalischer Schichtdicke d) der sensitiven Schicht rückgeschlossen werden, was es somit erlaubt, molekulare Wechselwirkungen an Oberflächen zu beobachten.

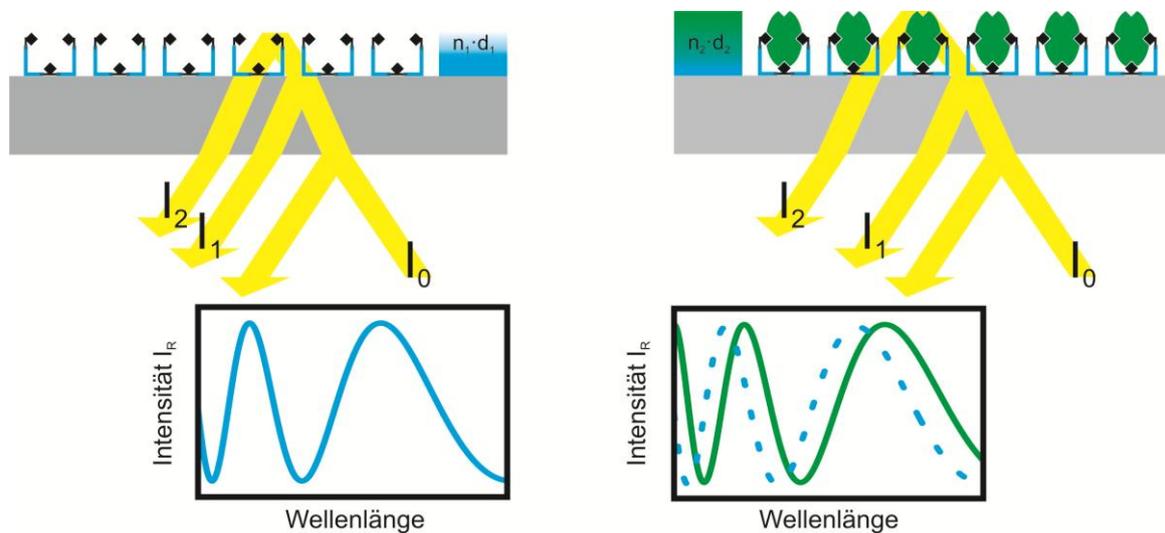


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie. Licht fällt durch einen Transducer auf eine sensitive Schicht und wird dort reflektiert gemäß ihrer optischen Eigenschaften $n_1 \cdot d_1$. Bindet ein Analyt an die sensitive Schicht (rechts), so ändern sich deren optische Eigenschaften ($n_2 \cdot d_2$) und das Interferenzspektrum verschiebt sich.

Da sowohl die physikalische Schichtdicke d als auch der Brechungsindex n in das detektierte Signal zu gleichen Anteilen einfließen, heben sich deren entgegengesetzte Temperaturabhängigkeiten gegenseitig auf, so dass RIFS unempfindlich gegenüber Temperaturschwankungen ist [13].

Alternativ zum Verfolgen der Änderung eines Extrempunktes im Interferenzspektrum kann man zur Auswertung der Messdaten ebenfalls die Intensitätsänderung bei einer Wellenlänge heranziehen. Diese Methode wird als $1-\lambda$ -Reflectometric Interference Sensing ($1-\lambda$ -RIFS) bezeichnet. Die Auswahl der optimalen Wellenlänge hängt hierbei stark vom betrachteten System ab, da nicht jede Wellenlänge dieselbe Signaldynamik zeigt. Die in dieser Arbeit gezeigten $1-\lambda$ -RIFS-Messungen wurden hierbei stets bei der Wellenlänge mit der maximalen Signaländerung durchgeführt.

2.1.5 Absorption von Strahlung

Die Grundvoraussetzung für die Absorption von Strahlung bildet die Resonanzbedingung. Dies bedeutet, dass die Energie der Strahlung der Energiedifferenz zwischen zwei Energieniveaus entsprechen muss. Im UV/Vis Bereich entspricht die Energiedifferenz hierbei derjenigen zwischen zwei unterschiedlichen elektronischen Zuständen.

Lambert-Beersches Gesetz

Beim Durchtritt eines Lichtstrahls durch einen absorbierenden Stoff wird der Lichtstrahl absorbiert, wodurch dessen Intensität vom Anfangswert I_0 nach I hin abnimmt. Der Quotient I/I_0 wird als Transmissionsvermögen bezeichnet, $\log_{10}(1/T)$ als die Extinktion. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz Gl. 2.1.17 gilt hierbei, dass die Extinktion proportional zur Konzentration c des absorbierenden Stoffes sowie der Weglänge d des Lichtes durch die Probe ist. Der Proportionalitätsfaktor ϵ_λ ist eine wellenlängenabhängige Stoffkonstante und wird als dekadischer molarer Extinktionskoeffizient bezeichnet.

$$E = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 2.1.17}$$

Das Lambert-Beersche Gesetz gilt hierbei für verdünnte Lösungen und bildet die Basis für die Quantifizierung von Stoffen mittels UV/Vis Spektroskopie. Wichtig ist hierbei, dass keinerlei Störungen des Systems (wie z.B. Wechselwirkung von einzelnen Molekülen des absorbierenden Stoffes untereinander) vorliegen.

2.2 Thermodynamische Grundlagen

2.2.1 Erster Hauptsatz der Thermodynamik

Der erste Hauptsatz der Thermodynamik besagt, dass die Summe an Wärme ∂Q und Arbeit ∂W , die ein System mit seiner Umgebung austauscht, gleich der Änderung der inneren Energie dU des Systems ist:

$$dU = \partial Q + \partial W \quad \text{Gl. 2.2.1}$$

Betrachtet man nun den Fall, dass ein System nur Volumenarbeit mit seiner Umgebung austauschen kann, so kann man Gl. 2.2.1 umformulieren:

$$dU = \partial Q + \partial W = \partial Q - pdV \quad \text{Gl. 2.2.2}$$

Dies bedeutet, dass für isochore Prozesse ($dV=0$) die Änderung der inneren Energie gleich der Änderung der Wärme des Systems entspricht:

$$dU_v = \partial Q_v \quad \text{Gl. 2.2.3}$$

Um nun isobar ablaufende Prozesse ($dp=0$) analog zu beschreiben wird die Enthalpie definiert:

$$dH = dU + d(pV) = dU + Vdp + pdV \quad \text{Gl. 2.2.4}$$

Analog zu Gl. 2.2.3 bedeutet dies für isobare Prozesse, dass die Änderung der Enthalpie gleich der Änderung der Wärme des Systems entspricht:

$$dH = dU + pdV = \partial Q_p \quad \text{Gl. 2.2.5}$$

Hierbei werden je nach der mit der Umgebung ausgetauschten Wärmemenge Prozesse mit:

- $dH=0$ als isenthalpisch
- $dH>0$ als endotherm
- $dH<0$ als exotherm

bezeichnet.

2.2.2 Zweiter Hauptsatz der Thermodynamik

Der erste Hauptsatz der Thermodynamik liefert nur Aussagen darüber, inwiefern sich Wärme und Arbeit während eines Prozesses ändern, jedoch liefert er keine Hinweise in welche Richtung ein Prozess abläuft. Der zweite Hauptsatz führt hierzu die Entropie ein, welche Informationen über die Richtung spontan ablaufender Prozesse gibt. In einem abgeschlossenen System nimmt die Entropie bei irreversiblen Prozessen zu:

$$\Delta S_{\text{gesamt}} > 0 \quad \text{Gl. 2.2.6}$$

Die Entropie ist dabei thermodynamisch definiert nach Gl. 2.2.7 :

$$dS \geq \frac{dQ}{T} \quad \text{Gl. 2.2.7}$$

Die Entropie eines Systems kann auch über die statistische Thermodynamik definiert werden. Die Boltzmann-Formel Gl. 2.2.8 stellt dabei den Zusammenhang zwischen Entropie und der Verteilung der Zustände bei gegebener Temperatur eines Systems her.

$$S = k \cdot \ln W \quad \text{Gl. 2.2.8}$$

Die Entropie kann demnach als ein Maß für die Unordnung des Systems betrachtet werden. Unter den gegebenen Bedingungen (z.B. Temperatur, Druck,...) strebt demnach jedes System eine möglichst breite Verteilung der Teilchenzustände an. Konkret bedeutet dies, dass zum Beispiel eine hochgeordnete Ausrichtung von Solvensmolekülen in der Hydrathülle eines Moleküls entropisch eher ungünstig ist. Durch Abstreifen der Solvathülle können die Solvensmoleküle eine höhere Anzahl an Zuständen einnehmen, wodurch dieser Prozess entropisch begünstigt ist.

2.2.3 Die Freie Enthalpie

Um eine Zustandsänderung in einem System komplett zu beschreiben, bedarf es somit Angaben bezüglich der Änderung der Wärme des Systems wie auch der Entropie. Gibbs und Helmholtz führten hierzu zur Verknüpfung dieser beider Größen die Freie Enthalpie G (für isobare Prozesse) sowie die freie Energie F (für isochore Prozesse) ein, die als Bedingung für den Ablauf eines spontanen Prozesses in einem geschlossenen System gelten:

$$F = U - T \cdot S \quad \text{Gl. 2.2.9}$$

$$G = H - T \cdot S \quad \text{Gl. 2.2.10}$$

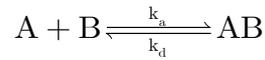
Im Folgenden wird die Diskussion auf isobare Fälle beschränkt, da sämtliche Experimente, die in dieser Dissertation beschrieben sind, unter diesen Bedingungen durchgeführt wurden. Für Änderungen des Systems ergibt sich somit der Zusammenhang nach Gl. 2.2.11. Ist ein System im Gleichgewicht, so ist die Änderung der Freien Enthalpie null.

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad \text{Gl. 2.2.11}$$

Möchte man beschreiben, wie sich ein System, das sich noch nicht im Gleichgewicht befindet verhalten wird, wird die freie Standardenthalpie ΔG^0 eingeführt. Diese Energie beschreibt das Verhalten des Systems unter Standardbedingungen und gibt quasi die energetischen Unterschiede zwischen Ausgangs- und Endzustand des Systems wider. Hierbei läuft eine Reaktion dann freiwillig ab, wenn die Bedingung $\Delta G^0 < 0$ erfüllt ist.

2.2.4 Die Freie Enthalpie von Reaktionen

Die Gleichgewichtskonstante einer chemischen Reaktion gibt Informationen darüber, in welcher Relation Edukte und Produkte zueinander stehen. Gegeben sei folgende Reaktion:



Hierbei bezeichnet k_a die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion, k_d die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion. Die Assoziationskonstante K_A (auch Gleichgewichtskonstante genannt) bzw. die Dissoziationskonstante K_D der Reaktion ergibt sich zu:

$$K_A = \frac{1}{K_D} = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AB]}{[A] \cdot [B]} \quad \text{Gl. 2.2.12}$$

Die Assoziationskonstante einer Reaktion kann hierbei mit der freien Enthalpie verknüpft werden:

$$\Delta G = \Delta G^0 + R \cdot T \cdot \ln K_A \quad \text{Gl. 2.2.13}$$

Für ein System, das sich im Gleichgewicht befindet ($\Delta G=0$) kann man somit direkt aus der Gleichgewichtskonstante die Freie Standardreaktionsenthalpie bestimmen. Diese steht nach der Gibbs Gleichung direkt in Beziehung mit der Standardreaktionsenthalpie sowie der Standardreaktionsentropie:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad \text{Gl. 2.2.14}$$

2.2.5 Bestimmung von thermodynamischen Reaktionsparametern

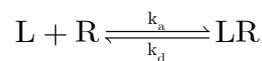
Um den Ablauf von Wechselwirkungsprozessen besser verstehen und daraus Schlussfolgerungen für nicht bekannte Systeme ziehen zu können, ist die Kenntnis der im vorangegangenen Abschnitt eingeführten thermodynamischen Parameter essentiell. So sind kinetische Daten prinzipiell durch zeitabhängige Konzentrationsmessungen der Reaktanden einer Reaktion zugänglich. Eine Messung der Produkte in Abhängigkeit der Konzentration der Edukte erlaubt die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante der Reaktion. Durch temperaturabhängige Messungen kann zudem mittels der van't Hoff'schen Reaktionsisobaren [14] die Reaktionsenthalpie bestimmt werden.

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H^0}{RT^2} \quad \text{Gl. 2.2.15}$$

Da die Bestimmung mehrerer Gleichgewichtskonstanten bei unterschiedlichen Temperaturen recht aufwändig ist, sind kalorimetrische Methoden, die eine direkte Messung der Reaktionsenthalpie erlauben, hierfür weitaus besser geeignet. Bei kalorimetrischen Methoden wird die Wärmeänderung ΔQ gemessen, die mit einer stofflichen Umwandlung verbunden ist. Genaue technische Details zur Messung dieser Wärmeänderung sind in Kapitel 3.3.1 erläutert.

2.2.6 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Eine kalorimetrische Methode, deren Grundlagen im Folgenden näher erläutert werden sollen, stellt die isotherme Titrationskalorimetrie dar. Bei einem ITC Experiment wird der Ligand sukzessive zu einer bestimmten Stoffmenge an Rezeptor in der Vorlage zutitriert. Es kommt zur Reaktion zwischen Ligand und Rezeptor, bei der Wärme freigesetzt oder aufgebraucht wird. Die mit der Reaktion verbundene Reaktionswärme wird registriert. Welcher Anteil der zutitrierten Menge an Ligand mit dem Rezeptor reagiert, hängt dabei von der Gleichgewichtskonstanten, der Konzentration des Rezeptors sowie von der Konzentration des Liganden ab. Dies ist im Folgenden für eine Reaktion mit äquimolarer Stöchiometrie zwischen Ligand L und Rezeptor R , die einen Ligand-Rezeptor Komplex LR ausbilden beschrieben. Diese Herleitung wurde der Publikation von Wisemann et al. [15] entnommen:



Es lässt sich somit die Gleichgewichtskonstante nach Gl. 2.2.16 formulieren.

$$K_A = \frac{[LR]}{[L] \cdot [R]} \quad \text{Gl. 2.2.16}$$

Für die gesamte Stoffmenge an Ligand (L_{ges}) und Rezeptor (R_{ges}) erhält man somit folgende Ausdrücke:

$$L_{ges} = [L] + [LR] \quad \text{Gl. 2.2.17}$$

$$R_{ges} = [R] + [LR] = \frac{[LR]}{[L] \cdot K_A} + [LR] = \frac{[LR]}{(L_{ges} - [LR]) \cdot K_A} + [LR] \quad \text{Gl. 2.2.18}$$

Durch Multiplikation mit dem Nenner im rechten Ausdruck von Gl. 2.2.18 erhält man folgende quadratische Gleichung:

$$[LR]^2 + [LR] \left(-R_{ges} - L_{ges} - \frac{1}{K_A} \right) + R_{ges} \cdot L_{ges} = 0 \quad \text{Gl. 2.2.19}$$

Als Lösung dieser quadratischen Gleichung erhält man somit den in Gl. 2.2.20 dargestellten Term:

$$[LR] = \frac{\left(L_{ges} + R_{ges} + \frac{1}{K_A} \right) \pm \sqrt{\left(L_{ges} + R_{ges} + \frac{1}{K_A} \right)^2 - 4 \cdot L_{ges} \cdot R_{ges}}}{2} \quad \text{Gl. 2.2.20}$$

Theoretischer Teil

Um nun die Änderung der als Ligand-Rezeptor Komplex vorliegenden Moleküle in Abhängigkeit der gesamten zutitrierten Mengen an Ligand zu erhalten, differenziert man Gleichung Gl. 2.2.20 nach L_{ges} :

$$\frac{d[LR]}{dL_{ges}} = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} \cdot \frac{2 \cdot L_{ges} - 2 \cdot R_{ges} + \frac{2}{K_A}}{\sqrt{\left(L_{ges} + R_{ges} + \frac{1}{K_A}\right)^2 - 4 \cdot L_{ges} \cdot R_{ges}}} \quad \text{Gl. 2.2.21}$$

Um Gleichung Gl. 2.2.21 zu vereinfachen, werden folgende Substitutionen definiert, wobei c ihrer Wichtigkeit wegen auch als Wisemannkonstante bezeichnet wird:

$$r = \frac{1}{K_A \cdot R_{ges}} = \frac{1}{c} \quad \text{Gl. 2.2.22}$$

$$L_V = \frac{L_{ges}}{R_{ges}} \quad \text{Gl. 2.2.23}$$

Durch Einsetzen dieser Substitutionen in Gl. 2.2.21 erhält man folgenden Term:

$$\frac{d[LR]}{dL_{ges}} = \frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{1}{2}(1+r) - \frac{1}{2}L_V}{\sqrt{L_V^2 - 2L_V(1-r) + (1+r)^2}} \quad \text{Gl. 2.2.24}$$

Die im Kalorimeter gemessene Änderung der Wärmemenge dQ ist direkt proportional zur Änderung der Konzentration an Ligand-Rezeptor Komplex:

$$dQ = d[LR] \cdot \Delta H^0 \cdot V_0 \quad \text{Gl. 2.2.25}$$

Hierbei ist ΔH^0 die Standard Bindungsenthalpie und V_0 das Volumen der Messzelle. Die registrierte Wärmemenge pro Injektion (dQ/dL_{ges}) wird also sehr stark durch die Wisemannkonstante c und die Enthalpie der Reaktion beeinflusst. Dies wird in Abbildung 4 deutlich, hier ist dQ/dL_{ges} gegen das molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor zum jeweiligen Injektionszeitpunkt (L_V) für verschiedene Wisemannkonstanten und verschiedene Bindungsenthalpien aufgetragen.

Die Form der erhaltenen Titrationskurve wird stark vom c -Wert geprägt, die Enthalpie der Reaktion führt lediglich zu einer „Streckung“ der Kurve. Aus diesem Sachverhalt ergeben sich einige Limitierungen für die Bestimmungen von Stöchiometrie, Affinität und Enthalpie einer Ligand-Rezeptor Wechselwirkung mittels ITC.

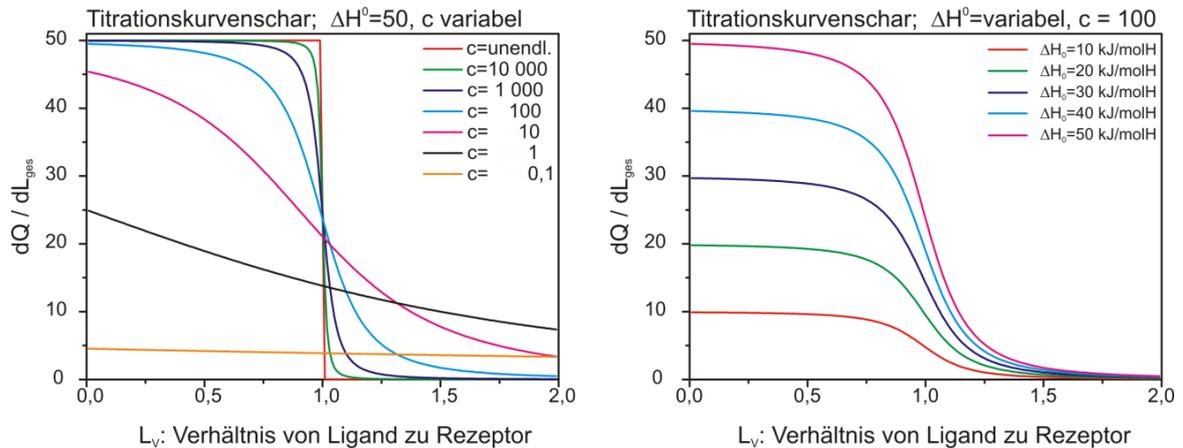


Abbildung 4: Simulierte Titrationskurvenscharen für eine äquimolare Ligand-Rezeptor Wechselwirkung. Links: Variation des c-Wertes (Produkt aus Affinitätskonstante und Konzentration des Rezeptors) bei fester Enthalpie, Rechts: Variation der Enthalpie bei festem c-Wert.

So sollte für die Bestimmung der Affinitätskonstante ein c -Wert zwischen 1 und 1000 gewählt werden. Dies wiederum hat als Konsequenz, dass mittels ITC die Bindungskonstante sehr hochaffiner und sehr niederaffiner Systeme nur bedingt ermittelt werden kann. Für sehr niederaffine Systeme benötigt man eine sehr hohe Konzentration an Rezeptor, wodurch man oftmals Probleme mit der Löslichkeit erhält bzw. sich diese Experimente aus Kostengründen nicht realisieren lassen. Für sehr hochaffine Systeme muss eine entsprechend niedere Konzentration des Rezeptors gewählt werden. Hierbei setzt wiederum die Messtechnik die Grenzen, da die Messzelle des Kalorimeters nur ein bestimmtes Volumen fasst und eine gewisse Mindestmenge an freigesetzter Wärme für eine Messung notwendig ist.

Falls nur die Enthalpie bzw. Stöchiometrie einer Wechselwirkung bestimmt werden sollen, so ist dies für hochaffine Systeme gut möglich. Für niederaffine Systeme hat man hier ebenfalls die oben genannten Limitierungen.

2.3 Zwischenmolekulare Wechselwirkungen

Für die dreidimensionale Anordnung einzelner Strukturelemente eines Moleküls als auch für Strukturen, die sich aus mehreren Molekülen ergeben, ist eine Reihe an intra- bzw. intermolekularen Wechselwirkungskräften verantwortlich. Diese Wechselwirkungskräfte sorgen zum Beispiel dafür, dass ein Protein seine aktive Form ausbilden kann oder Polymerketten so zusammengehalten werden, dass die Struktur des Polymers erhalten bleibt. Je nach Ursache und Stärke wird hierbei zwischen verschiedenen Arten der Wechselwirkung zwischen Teilchen differenziert.

2.3.1 Elektrostatische Wechselwirkungen

Die Basis für diese Wechselwirkungskräfte bildet hierbei die Coulombsche Kraft, die zwischen zwei geladenen Teilchen auftritt. Bei dieser elektrostatischen Wechselwirkung zwischen geladenen sphärischen Teilchen, wie z.B. in Salzen, kommt es zur Ausbildung eines reinen Coulombpotentials, welches proportional zur Ladung und zum reziproken Abstand der Teilchen ist. Bei der Wechselwirkung zwischen einem Ion und einem Dipol erhöht sich die Abstandsabhängigkeit, so dass eine Abhängigkeit zum Quadrat des reziproken Abstandes vorliegt.

Geht man nun zur Betrachtung der Wechselwirkung ungeladener, polarer Moleküle über, wird anstelle der Ladung lediglich ihre Teilladung über das Dipolmoment berücksichtigt. Bei ruhenden Dipolen erhält man hierbei eine Abstandsabhängigkeit der Dipol-Dipol Wechselwirkung, die proportional zur dritten Potenz des reziproken Abstandes ist und von der räumlichen Orientierung der Dipole zueinander abhängt. Mittelt man über alle Orientierungen unter Berücksichtigung der Wahrscheinlichkeit der Orientierungen, so erhält man die in Gl. 2.3.1 dargestellte Proportionalität des Potentials V zur sechsten Potenz des reziproken Abstandes [16].

$$V = -\frac{2}{3 \cdot kT} \cdot \frac{\mu_1^2 \cdot \mu_2^2}{(4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r)^2 \cdot r^6} \quad \text{Gl. 2.3.1}$$

k	Boltzmannkonstante
T	Temperatur
μ_i	Dipolmoment
ϵ_0	Elektrische Feldkonstante im Vakuum
ϵ_r	Elektrische Feldkonstante des Mediums
r	Abstand

2.3.2 Induktive Wechselwirkungen

Liegt in einem Wechselwirkungspartner kein permanenter Dipol vor, kann mittels induktiver Wechselwirkungen ein solcher erzeugt werden. In die Beschreibung eines solchen Wechselwirkungspotentials fließt die Polarisierbarkeit des Moleküls mit ein, so dass sich hierfür der in Gleichung Gl. 2.3.2 dargestellte Ausdruck ergibt. Eine Temperaturabhängigkeit tritt bei

diesem Potential nicht auf, da der induzierte Dipol stets der Richtung des induzierenden, permanenten Dipols folgt.

$$V = -\frac{\mu_1^2 \cdot \alpha_2}{2 \cdot (4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0 \cdot \epsilon_r)^2 \cdot r^6} \quad \text{Gl. 2.3.2}$$

α Polarisierbarkeit

2.3.3 Dispersionswechselwirkungen

Auch bei der Wechselwirkung zwischen Molekülen, bei der beide Wechselwirkungspartner kein permanentes Dipolmoment besitzen und nicht bzw. nur geringfügig polarisierbar sind, kann es durch kurzzeitige Fluktuationen in der Elektronendichteverteilung zu einer gegenseitigen Induktion und somit zu Dispersions- oder Londonschen Wechselwirkungen kommen. Nach Definition der IUPAC werden mit Ausnahme der elektrostatischen Wechselwirkung alle diesen Wechselwirkungen zugrunde liegenden Kräfte unter dem Begriff der Van-der-Waals Wechselwirkungen zusammengefasst [17].

2.3.4 Hydrophobe Wechselwirkungen

Einen Sonderfall zwischenmolekularer Interaktionen stellen hydrophobe Wechselwirkungen dar. Diesen liegt im Gegensatz zu den oben genannten Wechselwirkungen nicht direkt ein abstandsabhängiges Potential zugrunde. Hydrophobe Wechselwirkungen treten auf, wenn ein unpolare Stoff in einem polaren Stoff gelöst ist. An der Grenzfläche zwischen polarem und unpolarem Stoff sind die Teilchen des polaren Lösemittels relativ starr angeordnet, um die Grenzflächenenergie zu minimieren. Durch Aggregieren des unpolaren Stoffes wird dessen Grenzfläche zum polaren Stoff verringert und somit auch die Anzahl der hochgeordneten polaren Teilchen an der Grenzfläche. Hierdurch resultiert ein Gewinn an Entropie, der somit verantwortlich für diese Wechselwirkung ist.

2.3.5 Wasserstoffbrückenbindungen

Zwischen zwei elektronegativen Atomen A und B kann sich eine Wasserstoffbrückenbindung der Form A—H···B ausbilden. Hierbei kommt es zur Ausbildung eines delokalisierten Molekülorbitals, welches zu einer Absenkung der Gesamtenergie führt. Die Wechselwirkungsenergie ist hierbei recht hoch, sie beträgt für Wassermoleküle ca. 20 kJ/mol und kann für andere Systeme bis zu 100 kJ/mol betragen [18]. Eine Übersicht über die Stärke der verschiedenen zwischenmolekularen Wechselwirkungen bietet Tabelle 1 in Kapitel 2.5.1.

2.4 Wechselwirkungsprozesse an Oberflächen

Bei der Beobachtung von Wechselwirkungsprozessen an Oberflächen im Durchfluss muss neben der eigentlichen Reaktion zwischen den Wechselwirkungspartnern auch der Stofftransport hin zur Oberfläche mit berücksichtigt werden.

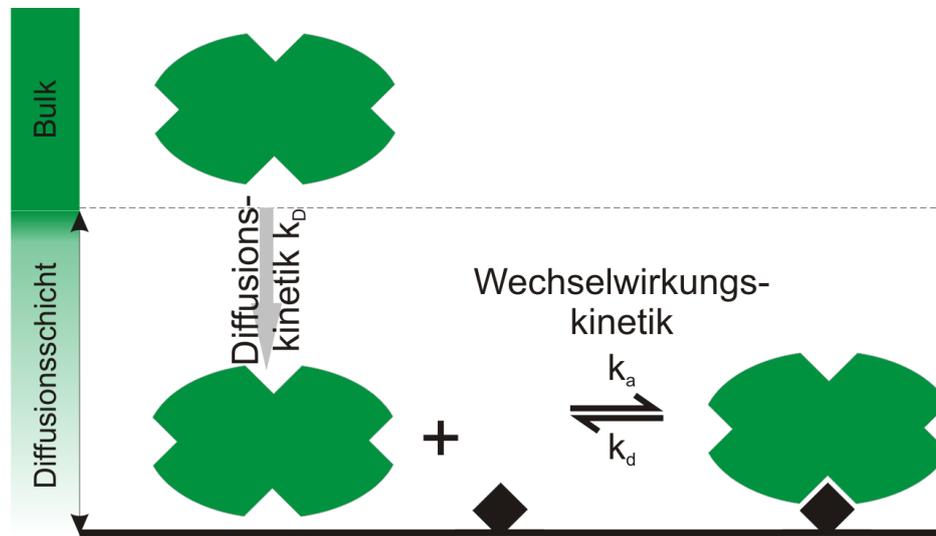


Abbildung 5: Wechselwirkungsprozesse an Oberflächen im Durchfluss

Die Konzentration des mobilen Bindungspartners im Bulk ist bei Messungen im Durchfluss konstant, da dieser stets nachgeliefert wird. Durch die Anbindung des mobilen Bindungspartners an die Oberfläche durch eine Affinitätsreaktion kommt es zu einer Verarmung des mobilen Bindungspartners nahe der Oberfläche, wodurch es nach dem 1. Fick'schen Gesetz zur Ausbildung eines linearen Konzentrationsgradienten hin zum Bulk kommt. Die Dicke dieser Diffusionsschicht wird bei solchen Oberflächenreaktionen durch die Wechselwirkungskinetik, die Diffusionskinetik und die Konzentration an mobilem Liganden im Bulk bestimmt. Formal gesehen handelt es sich bei diesem Prozess somit um eine Folgereaktion, bei dem der langsamere Prozess jeweils den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Um einen vernachlässigbar kleinen Einfluss der Diffusion auf die Wechselwirkungskinetik zu erhalten und somit anhand der aufgezeichneten Bindungskurven kinetische Daten ermitteln zu können, sollte die Diffusion an die Oberfläche ca. 10-mal schneller ablaufen als die Reaktion an der Oberfläche [19]. Für Systeme mit einer schnellen Wechselwirkungskinetik im Bereich von 10^5 mol/L·s wie z.B. Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen hat dies zur Konsequenz, dass eine Ausdünnung der Oberflächenbeladung erfolgen muss. Systeme mit weitaus kleineren Assoziationsratenkonstanten können ohne Ausdünnung der Oberfläche hinsichtlich ihrer Bindungskinetik charakterisiert werden.

Die Anbindung eines Liganden (L) an eine Wechselwirkungsstelle an der Oberfläche (R) kann bei Vernachlässigung der Diffusion somit durch Reaktionsgleichung Gl. 2.4.1 dargestellt werden.



Für diese Reaktion ergibt sich die Bindungsrate $d\Gamma(t)/dt$ aus der Anzahl der belegten Bindungsplätze $\Gamma(t)$, der Konzentration des Liganden c und der Zahl der freien Bindungsplätze an der Oberfläche nach Gl. 2.4.2. Die Zahl der freien Bindungsplätze lässt sich aus der Differenz der maximal belegten Bindungsplätzen Γ_{max} und der Zahl der belegten Bindungsplätze $\Gamma(t)$ errechnen.

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = k_a \cdot c \cdot \Gamma_{max} - (k_a \cdot c + k_d) \cdot \Gamma(t) = k_a \cdot c \cdot \Gamma_{max} - k_s \cdot \Gamma(t) \quad \text{Gl. 2.4.2}$$

Betrachtet man diese Reaktion im Durchfluss, so bleibt die Konzentration des Liganden konstant und man kann Gleichung Gl. 2.4.2 als Kinetik pseudo erster Ordnung auffassen und nach $\Gamma(t)$ auflösen.

$$\Gamma(t) = \Gamma_{GG} \cdot (1 - e^{-k_s \cdot t}) \quad \text{Gl. 2.4.3}$$

Die Gleichgewichtsbeladung Γ_{GG} beschreibt die erreichte Anzahl der belegten Bindungsplätze sobald sich das System im Gleichgewicht befindet. Bei Verwendung eines Langmuir Sorptionsmodells für die Assoziation erhält man für die Gleichgewichtsbeladung den in Gleichung Gl. 2.4.4 aufgezeigten Zusammenhang mit der Maximalbeladung Γ_{max} und der Assoziationskonstanten K_A :

$$\Gamma_{GG} = \Gamma_{max} \cdot \frac{K_A \cdot c}{1 + K_A \cdot c} \quad \text{Gl. 2.4.4}$$

Anhand der in Gleichung Gl. 2.4.3 und Gl. 2.4.4 dargelegten Zusammenhänge wird deutlich, dass man durch die Analyse von Bindungskurven Aussagen über Kinetik und Thermodynamik des Systems erhalten kann.

2.5 Molekular geprägte Polymere (MIPs)

2.5.1 Allgemeine Beschreibung von molekular geprägten Polymeren

Molekular geprägte Polymere (MIPs) sind künstliche Erkennungselemente, die über Bindungsstellen für ein bestimmtes Templatmolekül verfügen. Diese Bindungsstellen entstehen während des Polymerisationsprozesses durch die Wechselwirkung zwischen funktionellen Monomeren und einem Templatmolekül. Durch Extraktion des Templatmoleküls nach abgeschlossener Polymerisation verbleiben Bindungsstellen im Polymer, die eine spezifische Wechselwirkung und somit eine molekulare Erkennung ermöglichen (siehe Abbildung 6).

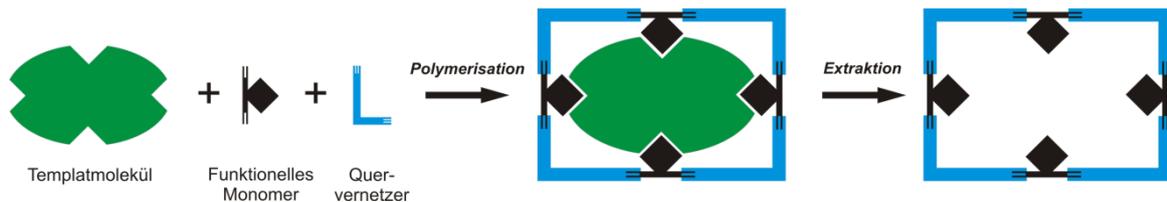


Abbildung 6: Schematische Darstellung des molekularen Prägens.

Als Gründerväter des molekularen Prägens sind Wulff [20] und Mosbach [21] bekannt, die erstmals molekular geprägte Polymere als spezifische Trennmaterialien verwendeten. Für die Herstellung molekular geprägter Polymere werden ein oder mehrere unterschiedliche funktionelle Monomere sowie ein Quervernetzer benötigt. Die funktionellen Monomere werden so ausgewählt, dass sie in ihrer chemischen Funktionalität gut dazu in der Lage sind mit dem Templatmolekül zu wechselwirken. So kommen je nach Templatmolekül unter anderem basische (z.B. Vinylpyridin), saure (z.B. Acrylsäure(derivate)), oder auch hydrophobe (z.B. Styrol) Monomere zum Einsatz, um nur ein paar Beispiele zu nennen [22]. Für die Auswahl des am besten geeigneten funktionellen Monomers existieren zahlreiche Ansätze, unter anderem wird hierfür auf molekulardynamische Modellierung [23] und kombinatorische Methoden [24] zurückgegriffen.

Je nach Art der Wechselwirkung zwischen Templatmolekül und funktionellem Monomer wird zwischen kovalentem und nichtkovalentem Prägen differenziert. Beim kovalenten Prägen kommt es – im Gegensatz zum nicht kovalenten Prägen - zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen funktionellem Monomer und Templatmolekül. Diese kovalente Bindung wird nach Abschluss der Polymerisation beim Extraktionsschritt wieder gebrochen. Dieses Prägeverfahren führt zu einer recht homogenen Verteilung der Bindungskavitäten hinsichtlich ihrer Form und Affinität. Allerdings kann es nicht für jedes Templatmolekül verwendet werden, da bestimmte chemische Funktionalitäten im Templatmolekül vorhanden sein müssen, die eine reversible und einfache kovalente Anbindung an das funktionelle Monomer ermöglichen (z.B. Hydroxylgruppen, Säurefunktionen,...). Für kovalent geprägte Polymere resultiert zudem eine recht langsame Bindungskinetik und eine aufwändige Regeneration, da bei der molekularen Erkennung die kovalenten Bindungen zwischen Templatmolekül und funktionellem Monomer erneut geknüpft werden [5].

Aus diesen Gründen wird in den meisten Publikationen, welche die Synthese von MIPs beschreiben, ein nichtkovalenter Prägeansatz verfolgt. Der Vorteil einer schnelleren

Bindungskinetik und einer Anwendbarkeit dieses Prägeverfahrens auf beliebige Moleküle muss jedoch durch eine breitere Verteilung der Bindungsstellen sowie eine hohe benötigte Menge an Templatmolekül erkauft werden [25]. Zur spezifischen molekularen Erkennung tragen hierbei nichtkovalente zwischenmolekulare Wechselwirkungskräfte (siehe Abschnitt 2.3) bei. Eine Übersicht der unterschiedlichen nichtkovalenten Wechselwirkungen, die bei der Wechselwirkung zwischen funktionellem Monomer und Templatmolekül auftreten können, sind mitsamt ihrer ungefähren Bindungsenergie in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Zwischenmolekulare Wechselwirkungen, die bei nichtkovalent geprägten Polymeren zur molekularen Erkennung beitragen. Bindungsenergie entnommen aus [26]

Wechselwirkung	Graphische Darstellung	Beispiel	Bindungsenergie [kJ/mol]
Ionische Wechselwirkung		—NH_3^+	80-300
Ion-Dipol Wechselwirkung			50-200
Dipol-Dipol Wechselwirkung			4-40
Wasserstoffbrücken Wechselwirkung			4-120
Dispersions- Wechselwirkung			0-6

Neben dem funktionellen Monomer ist ebenfalls der Crosslinker von Bedeutung für das optimale Bindeverhalten von molekular geprägten Polymeren. Der Crosslinker dient der Vernetzung der funktionellen Monomere und hält diese in ihrer Position, so dass die Struktur der Bindungskavität erhalten bleibt. Der Crosslinker soll dabei eine möglichst geringe Wechselwirkung mit dem Templatmolekül aufzeigen, um eine gute molekulare Erkennung im MIP zu gewährleisten [27]. Zudem darf das Gerüst, das durch den Crosslinker erzeugt wird, nicht zu flexibel oder zu starr sein. Ersteres würde die Struktur des MIPs nicht konstant halten, letzteres würde ein (schnelles) Eindringen des Templatmoleküls in das Polymer behindern.

Neben der chemischen Zusammensetzung des Polymers haben auch das konkrete Polymerisationsverfahren, das Solvens in der die Polymerisation durchgeführt wird, sowie Additive, die während des Polymerisationsprozesses zugesetzt werden, einen Einfluss auf das geprägte Polymer und dessen molekulare Erkennungseigenschaften [28].

Um die Leistungsfähigkeit und das spezifische Erkennungsvermögen von geprägten Polymeren zu evaluieren, wird zum einen deren Sorptionsverhalten gegenüber strukturell ähnlichen Molekülen untersucht. Zum anderen werden die geprägten Polymere mit einem nicht geprägten Polymer (NIP) verglichen, das mittels desselben Herstellungsprozesses erzeugt wurde, jedoch in Abwesenheit des Templatmoleküls.

2.5.2 Polymerisationsverfahren zur Synthese von MIPs

Für die Synthese von molekular geprägten Polymeren werden neben Sol-Gel Prozessen hauptsächlich radikalische Polymerisationsverfahren verwendet. Dabei stellt die Bulk-Polymerisation die klassische Synthesemethode dar, bei der ein Polymermonolith erzeugt wird. Diese Methode ist schnell und benötigt keine besondere Laborausstattung und wird daher oftmals verwendet. Für die weitere Charakterisierung und Verwendung des MIP muss dieses allerdings durch Mahlen zerkleinert werden, was zu einer polydispersen Mischung von Partikeln hinsichtlich ihrer Morphologie und Größe führt. Hierdurch ist die Ausbeute an den Partikeln der gewünschten Größe sehr gering, da für eine bestimmte Anwendung oftmals eine bestimmte Partikelgröße erforderlich ist. Alternative Polymerisationsmethoden wie die Fällungspolymerisation [29], die Suspensionspolymerisation [30], oder auch die Emulsionspolymerisation [31] wurden ebenfalls bereits erfolgreich für die Synthese von MIPs eingesetzt. Alle diese Verfahren ermöglichen die Synthese von sphärischen Polymerpartikeln, je nach Methode können teilweise sogar monodisperse Partikel erhalten werden. Bei der Wahl des optimalen Polymerisationsverfahrens kommt es jedoch sehr auf das Templatmolekül und auf den vorgesehenen Anwendungsbereich des geprägten Polymers an, so dass es nicht eine optimale Methode zur Herstellung von MIPs gibt.

In den letzten Jahren wurde der Fokus vermehrt auf eine Oberflächenprägung von Partikeln gelegt. Diese bietet den Vorteil, dass keine Extraktion des Templatmoleküls aus tieferliegenden Bindungsstellen erfolgen muss, was aufgrund des für gewöhnlich recht hohen Anteils an Crosslinker schwer ist. Zudem ergibt sich aus einer alleinigen Oberflächenprägung eine deutlich schnellere Bindungskinetik der MIPs. Insbesondere gilt dies für das Prägen auf größere Moleküle wie zum Beispiel Peptide oder Proteine. Für die Herstellung solcher oberflächengeprägter MIPs gibt es ebenfalls zahlreiche unterschiedliche Verfahren [32]. Hierzu können beispielsweise dünne MIP Filme auf geeigneten Substraten erzeugt werden [33], oder auch mittels eines zweistufigen Verfahrens eine MIP Hülle auf einen geeigneten Kern aufgebracht werden [34, 35]. Ein einstufiges Verfahren zur Herstellung von oberflächengeprägten Partikeln stellt die Miniemulsionspolymerisation dar, durch welches die in dieser Arbeit verwendeten MIPs erzeugt wurden [36]. Bei dieser Polymerisationsmethode wird durch Zugabe eines Stabilisators eine stabile Emulsion mit homogener Tröpfchengröße erzeugt, in welcher die Reaktion anschließend stattfindet. Bei Verwendung eines amphiphilen Templatmoleküls reichert sich dieses an der Phasengrenze an, so dass es zu einer Prägung der Oberfläche kommt. Bei Verwendung eines eher hydrophoben Templatmoleküls werden zum Teil auch im Inneren der Polymerpartikeln Bindungskavitäten erzeugt.

2.5.3 Molekulare Erkennung in molekular geprägten Polymeren

Die für die molekulare Erkennung verantwortlichen Wechselwirkungen bilden sich bereits vor der Polymerisation zwischen dem funktionellen Monomer und dem Templatmolekül aus. Der hierbei gebildete Komplex aus funktionellem Monomer und Templatmolekül (TM-Komplex) wird durch die Polymerisation mit dem Crosslinker in seiner Position fixiert. Eine anschließende Entfernung des Templatmoleküls führt somit zu einer Bindungstasche, in der die funktionellen Monomere bereits die passende räumliche Anordnung haben. Hierbei konnte mittels Molecular Modelling aufgezeigt werden, dass funktionelle Monomere, die eine energetisch sehr günstige Templat-Monomer Wechselwirkung eingehen, auch zu einem hohen Prägeeffekt und hoher Selektivität führen [37]. Je nach Templatmolekül und funktionellem Monomer werden hierbei die unterschiedlichsten zwischenmolekularen Wechselwirkungen (Van-der-Waals Wechselwirkungen, Dipol-Dipol Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen,...) realisiert. Kommen beim nichtkovalenten Prägen vor allem elektrostatische Wechselwirkungen zum Tragen, ist eine molekulare Erkennung in polaren Medien wie z.B. in Wasser oftmals nicht mehr möglich, da die Wechselwirkungen hier, bedingt durch die höhere Dielektrizitätskonstante, deutlich schwächer sind [4].

In der Regel kommt es in der Präpolymerisationsmischung zur Ausbildung strukturell unterschiedlicher TM-Komplexe, die auch in Bezug auf ihre stöchiometrische Zusammensetzung variieren (siehe Abbildung 7). TM-Komplexe mit Beteiligung mehrerer funktioneller Monomere führen demnach zu hochselektiven Bindungsstellen im MIP, die mehrere strukturelle Einheiten des Templatmoleküls erkennen können, wie mittels NMR Studien bewiesen werden konnte [38]. Entsprechend führen TM-Komplexe mit Beteiligung von nur einem oder wenigen funktionellen Monomeren zu eher weniger selektiven Bindungsstellen. Neben der Selektivität der wird durch diesen Prozess ebenfalls die Affinität der Bindungsstellen beeinflusst. Demnach liegt im geprägten Polymer ebenfalls eine Verteilung der Affinität der Bindungsstellen vor.

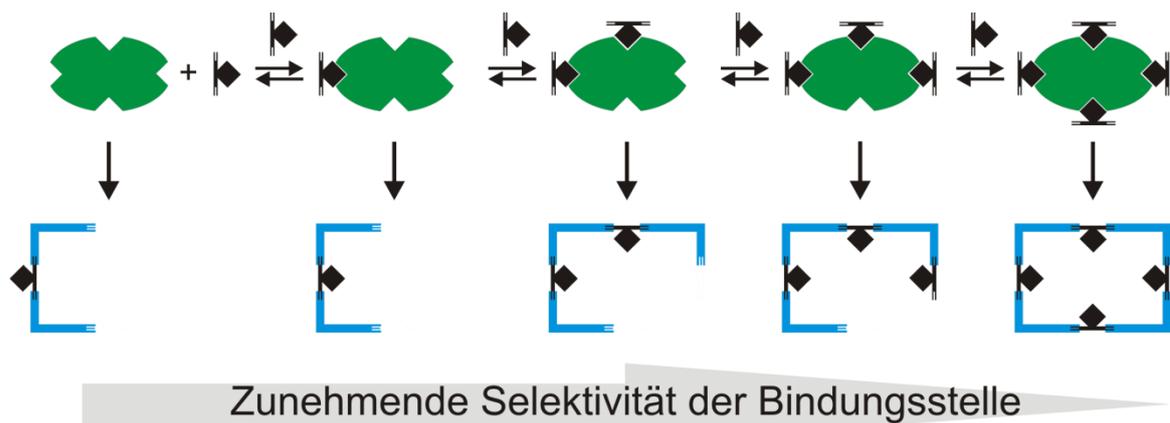


Abbildung 7: Schematische Darstellung des nichtkovalenten Prägemechanismus. Das Templatmolekül (grün) und das funktionelle Monomer (schwarz) formen TM-Komplexe unterschiedlicher Stöchiometrie. Durch Copolymerisation mit einem Crosslinker (blau) wird die räumliche Anordnung der funktionellen Monomere im TM-Komplex fixiert.

NIP und MIP enthalten dieselbe Anzahl an funktionellen Monomeren. Aus dem in Abbildung 7 dargestellten Mechanismus wird deutlich, dass die Bildung hochselektiver Bindungsstellen auf Kosten von Bindungsstellen geringer Selektivität von statten geht. Die überwiegende Anzahl

stellen Bindungsstellen mittlerer Selektivität dar, die Anzahl hochselektiver Bindungsstellen nimmt exponentiell ab. Insgesamt führt die höhere Anzahl an Bindungsstellen mit hoher Selektivität demnach zu einer Steigerung der Selektivität des geprägten Polymers im Vergleich zum nicht geprägten Polymer. Der reinen Logik dieses Modells folgend, muss die Anzahl an Bindungsstellen im MIP allerdings geringer sein als im NIP. Die strikte Verwendung dieses Modells lässt jedoch Wechselwirkungen mit dem Crosslinker außen vor und bezieht eine Besetzung der Bindungsstellen mit anderer räumlicher Anordnung des Liganden nicht mit ein.

Zudem konnte mittels Röntgenkristallographie aufgezeigt werden, dass es durch die Zusammenlagerung mehrerer Templatmoleküle während der Präpolymerisationsphase auch zur Ausbildung von Bindungstaschen kommt, die Komplexe aus mehreren Templatmolekülen enthalten können [39]. Die molekulare Erkennung in geprägten Polymeren wird somit durch mehrere unterschiedliche Mechanismen realisiert. Eine Beschreibung des Adsorptionsverhaltens geprägter Polymere stellt somit stets eine Mittelung über alle Bindungsstellen dar. Je nach Polymer und der sich hieraus ergebenden Verteilungsbreite der Bindungsstellen kommen unterschiedliche Sorptionsmodelle zum Tragen. Für die Beschreibung von MIPs mit einer engen, homogenen Verteilung der Bindungsstellen können Langmuir oder extended Langmuir Adsorptionsisothermen verwendet werden [40], bei breit verteilten Bindungsstellen Freundlich [41] oder auch Adsorptionsisothermen nach Langmuir-Freundlich [42].

2.5.4 Anwendungen von molekular geprägten Polymeren

Für molekular geprägte Polymere existiert eine Vielzahl an unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten, hauptsächlich im Bereich der Analytischen Chemie [43]. So werden sie für Affinitätstrennungen [44], als Erkennungselement in biomimetischen Assays [45], als Katalysator für chemische Reaktionen [46] und auch als Drug Delivery Systeme [47] eingesetzt. Ein weiteres breites Anwendungsfeld besteht in der Verwendung als selektives Erkennungselement in Sensoren, wobei die Anzahl dieser Anwendungen in den letzten 20 Jahren rapide zunahm (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8: Anzahl der Publikationen über die Verwendung von MIPs als Erkennungsstruktur in Sensoren. Suche in der Web of Science Datenbank Version 5.13, Suchstichwort: „molecularly imprinted polymer sensor“.

Der große Vorteil bei der Verwendung von MIPs in Sensoren liegt vor allem in ihrer deutlich höheren Robustheit und Langlebigkeit im Vergleich zu biologischen Erkennungselementen wie Antikörpern oder Proteinen [48]. Zudem erlauben MIPs ebenfalls eine Detektion in nichtwässrigen Medien oder in Gegenwart von Metallionen und sind schnell in großen Mengen ohne Tierversuche herstellbar. Allerdings ist die Affinität von MIPs im Gegensatz zu Antikörpern oftmals um mehrere Größenordnungen geringer, was eine Limitierung für manche Sensoranwendungen darstellt.

Eine Übersicht darüber, welche Transduktionsmethoden bereits mit MIPs als Erkennungselement kombiniert wurden, bietet der Artikel von Henry et al. [49]. Beschränkt man sich rein auf optische Transduktionsmethoden, so finden sich auch hierfür eine Vielzahl an Publikationen, der Artikel von Moreno-Bondi et al. [50] fasst hierbei die wichtigsten Fortschritte zusammen.

Für die Verwendung von RfS als Transduktionsmethode wurden in den ersten Arbeiten Polymerfilme genutzt, die direkt auf dem Transducer aufgebracht wurden [6]. Hierbei wurden auf den Analyten Phenyl- α -D-mannopyranosid kovalent geprägte Polymere untersucht. Die MIPs zeigten allerdings lange Ansprechzeiten von ca. 60 Minuten, teilweise irreversible Wechselwirkungen und waren durch die Instabilität des Systems nicht besonders gut als sensitive Schicht für RfS geeignet.

Mit nichtkovalent geprägten Polymeren konnten vielversprechendere Ergebnisse erzielt werden. Hier wurden auf den Analyt Di-*o*-Benzoylweinsäure geprägte Polymere untersucht. Die Ansprechzeit des Sensors war mit 30 Minuten nur noch halb so lang wie für das kovalent geprägte System. Zudem war eine lineare Kalibrierung im Bereich zwischen 0,5 und 5 mmol/L möglich und es konnte aufgezeigt werden, dass eine Unterscheidung von Enantiomeren mit diesem System möglich ist [51].

Um die relativ langen Ansprechzeiten von ca. 30 Minuten zu verkürzen, wurde in weiteren Arbeiten untersucht, inwiefern sich MIPs in partikulärer Form als sensitive Schicht eignen. Hierzu wurden auf Atrazin geprägte Partikel verwendet, die nichtkovalent durch elektrostatische Wechselwirkungen immobilisiert wurden. Mit diesem System konnte in Toluol mit einer Analytkonzentration von 1,7 ppm noch ein Bindungssignal erhalten werden. Allerdings zeigten auch diese MIPs recht lange Ansprechzeiten von ca. 30 Minuten und ein starkes Rauschen im Bereich von 100 pm. Zudem war die Oberflächenbelegung relativ gering und eine mehrfache Regeneration aufgrund der mangelnden Oberflächenstabilität nicht möglich. Die Arbeiten zeigten daher hauptsächlich die prinzipielle Realisierbarkeit der Verwendung von molekular geprägten Polymerpartikeln als sensitive Schicht auf [52].

2.6 Der M2-Protonenkanal

Neben molekular geprägten Polymeren wurde in dieser Arbeit auch die molekulare Erkennung innerhalb eines biologischen Systems untersucht. Hierbei wurden Untersuchungen zur Struktur – Aktivitäts-Beziehung verschiedener Inhibitoren des M2 Protonenkanals mittels ITC durchgeführt.

2.6.1 Funktion des M2-Protonenkanals

Der M2-Protonenkanal ist ein Membranprotein in der Virushülle von Influenza Typ A Viren. Dieser Protonenkanal ist für die Replikation der Viren essentiell. Zum einen ermöglicht er das Einschleusen von Protonen in das Virusinnere, was zum Ansäuern des Virions führt. Das Ansäuern führt hierbei zu einer Dissoziation des Ribonucleonproteins von einem umhüllenden Matrixprotein und stellt somit einen kritischen Schritt bei der Virusreplikation dar [53]. Für manche Subtypen ist der M2-Protonenkanal zusätzlich für die Regulierung des pH-Wertes im trans-Golgiapparat verantwortlich [54]. Durch die Regulation des pH-Wertes wird die native Konformation von Hemagglutinin A konserviert und ermöglicht die Freisetzung neu gebildeter Viren durch die Fusion mit der endosomalen Zellmembran.

2.6.2 Hemmung des M2-Protonenkanals

Durch die Schlüsselstellung des M2 Proteins in der Virusreplikation kann durch seine Inhibition eine antivirale Wirkung erzielt werden. Als solche Inhibitoren werden die Substanzen Rimantadin und Amantadin (siehe Abbildung 9) bereits kommerziell eingesetzt [55].

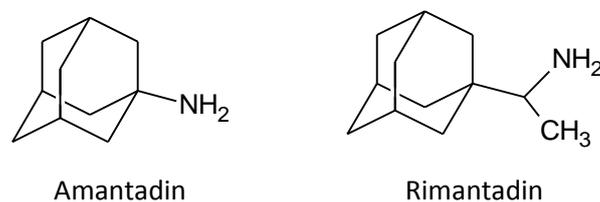


Abbildung 9: Strukturformeln der M2-Hemmstoffe Amantadin und Rimantadin.

Jedoch sind in den letzten Jahren vermehrt Resistenzen gegen diese Medikamente zu beobachten. So waren in den Jahren 2005-2006 96,4 % (bei einer Gesamtheit von n=761) der getesteten Influenza A Viren (H3N2) innerhalb der Vereinigten Staaten resistent gegen Amantadin, bei manchen isoliert in Asien vorkommenden Typen wurde sogar eine Resistenz von 100 % der Viren beobachtet [56]. Hierbei sind selektive Mutationen in der Transmembrandomäne des M2-Protonenkanals (M2TM) für die Resistenz verantwortlich. Um nun diesen Resistenzen effektiv begegnen zu können ist zum einen ein genaues Verständnis des Aufbaus des M2-Protonenkanals erforderlich, zum anderen ist jedoch auch eine gezielte Suche nach strukturell ähnlichen Verbindungen mit antiviraler Wirkung notwendig. Während der letzten Jahre wurden zahlreiche strukturelle Varianten auf Basis des Amantadin Grundgerüsts synthetisiert und auf ihre antivirale Wirkung hin untersucht [57-59].

2.6.3 Aufbau des M2-Protonenkanals und Wechselwirkung mit Hemmstoffen

Der genaue Aufbau der M2 Proteins und die Wechselwirkung mit Amantadin war bereits Gegenstand zahlreicher Studien. So wurden bereits Strukturmodelle auf Basis

molekulardynamischer Berechnungen [60], mittels Kristallstrukturanalyse [61] und NMR [62] entwickelt. Der für die Funktion des Proteins wichtige Teil stellt hierbei die Transmembrandomäne dar, welche aus einem Homotetramer aus helicalen Peptidsträngen besteht. Hierbei existieren verschiedene Subtypen des M2-Protonenkanals mit leicht anderer Aminosäuresequenz (siehe Tabelle 2). Allen unterschiedlichen Subtypen ist hierbei gemein, dass die vier Helices ein linkshändiges, paralleles Bündel ausbilden (siehe Abbildung 10).

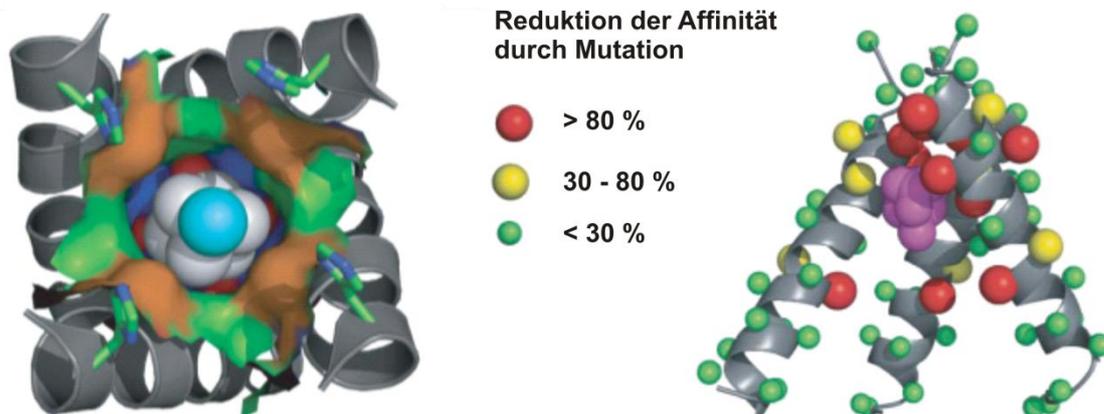


Abbildung 10: Links: Modell der M2 Pore mit gebundenem Amantadin basierend auf Kristallstrukturanalysen (entnommen aus [61] mit geringfügiger Überarbeitung). Stickstoff: Cyan, Kohlenstoff: Weiß. Die Oberfläche der Wechselwirkung mit Valin 27 ist in rot, für die Wechselwirkung mit Alanin 30 in grün, mit Serin 31 in blau und mit Glycin 34 in orange dargestellt. Rechts: Seitliche Darstellung des M2 Tetramers sowie Einfluss von Mutationen an verschiedenen Positionen auf die Bindungsaffinität. Rot: Reduktion der Affinität um über 80 %, gelb: Reduktion der Affinität um 30-80 %, grün: Reduktion um kleiner 30 %.

Die Pore hat am innerhalb des Virus liegenden Ende den geringsten Durchmesser und öffnet sich zur Membranzmitte hin. In der Mitte der Membran besitzt sie eine wassergefüllte Kavität und erreicht dabei ihren maximalen Durchmesser von 9 Å. Bei der Bindung von Amantadin kommt es zur Aufnahme von einem Amantadinmolekül pro tetramerem Bündel. Im gebundenen Zustand befindet sich Amantadin in der Kavität in der Mitte des Protonenkanals und ist von den Aminosäuren Val 27, Ala 30, Ser 31 und Gly 34 umgeben. Genau diese Aminosäuren sind in Amantadinresistenten H1 Viren durch andere Aminosäuren ausgetauscht. Mutationen an Stellen, die zu einer teilweisen Reduktion der Wirkung von Amantadin führen, liegen hierbei abseits der Bindungstasche und näher am „äußeren Ende“ (sprich das außerhalb des Virus befindliche Ende) der Pore. Der Eintritt von Amantadin in die Pore kann hierbei durch konformative Änderungen der Aminosäurereste oder aber auch durch eine laterale Diffusion in die Pore vonstattengehen.

Im gebundenen Zustand zeigt die Aminogruppe von Amantadin den Kristallstrukturen zufolge höchstwahrscheinlich in Richtung des Virusinneren, wo sie durch His 37 stabilisiert werden kann. Durch die Kristallstrukturanalyse konnte dies nicht zweifelsfrei geklärt werden, jedoch ist durch diese Orientierung mehr Platz für den relativ großen und unpolaren Adamantanrest vorhanden. Diese Ausrichtung des Liganden in der Bindungstasche wird zusätzlich unter anderem durch molekulardynamische Berechnungen [63] und Festkörper-NMR Studien gestützt [64]. Wahrscheinlich ist allerdings, dass Amantadin durch eine geringfügig laterale Verschiebung in der Lage ist sich zu drehen, so dass beide Bindungskonformationen eingenommen werden können [65]. In einer NMR Studie im Jahr 2008 [66] wurde aufgezeigt, dass für Rimantadin noch

eine weitere, zusätzliche Bindungsstelle außerhalb der Pore existiert. Die Wirkung von Amantadin beruht hierbei nicht auf einem schlichten Blockieren des Protonenkanals ähnlich einem Korke, der einen Flaschenhals verschließt. Vielmehr kommt es zu einer elektrostatischen Blockierung des Kanals. Bei der Bindung von Amantadin und Rimantadin wird effektiv eine protonierte Aminofunktion in die Bindungspore eingebracht. Hierdurch wird eine Potentialbarriere für Protonen aufgebaut, so dass ein Protonentransport durch das Membranprotein behindert wird [65].

Bei gegen Amantadin und Rimantadin resistenten Virenstämmen gibt es hierbei zwei unterschiedliche Typen der Resistenz. Allen Resistenzen gemeinsam ist, dass nur wenige Aminosäuren der Transmembrandomäne ausgetauscht wurden (siehe Tabelle 2). Bei manchen Mutationen (z.B.S31N, A30T) kommt es zu einer Verengung des Porendurchmessers, so dass Amantadin nicht mehr in die Pore eindringen kann und somit keine Blockade mehr möglich ist. Resistente Stämme wie z.B. V27A zeigen noch eine Anbindung von Amantadin, jedoch wird hierdurch der Protonentransport nicht behindert und somit ist keine antivirale Wirkung erzielbar [67]. Bei diesen Mutationen ist die Position von Amantadin in der Bindungstasche leicht verschoben, so dass die Ladungsdichte der protonierten Aminogruppe an einer anderen Stelle liegt. Zudem hat die Bindungstasche ein größeres Volumen, so dass die Position von Amantadin nicht stark fixiert ist. Es kann somit kein ausreichend großes elektrostatisches Potential aufgebaut werden, um den Protonenfluss ins Virusinnere zu behindern [65]. Um dennoch eine Medikation gegen diese resistenten Virenstämme zu haben, ist eine Strategie das Design neuer amantadinanaloger Verbindungen [57], aber auch die Untersuchung ihrer Wechselwirkungsmechanismen. Bisher existiert nur eine begrenzte Anzahl an Studien, die die Wechselwirkung der M2TM Domäne mit Liganden untersuchen, welche eine strukturelle Ähnlichkeit zu Amantadin aufweisen, wobei hierbei meist nur die Affinitätskonstante bestimmt wurde.

Für solche Studien wird für gewöhnlich nur die Transmembrandomäne des M2 Proteins verwendet (Aminosäuresequenz siehe Tabelle 2). So wurde bereits in mehreren Studien [61, 68] gezeigt, dass sich die isolierten Peptidstränge der Transmembrandomäne (siehe Tabelle 2) in Micellen aus Dodecylphosphocholin (DPC) zu Tetrameren zusammenlagern und sich zur Untersuchung der Wechselwirkung mit Amantadin eignen. Für die Formierung des Tetramers ist hierbei sowohl der pH-Wert, als auch das molare Verhältnis aus Peptid zu Detergenz entscheidend. So erhält man eine stabile Tetramerbildung bei einem pH-Wert von 8 und einem molaren Verhältnis das nicht größer sein sollte als 1:100 (Peptid : Detergenz).

Tabelle 2: Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne des M2-Protonenkanals für verschiedene Virenstämme. Udorn, Rostock und Weybridge sind nicht Amantadinresistente Wildtypen. V27A und S31N sind resistent gegen Amantadin und Rimantadin.

<i>Typ</i>	<i>Sequenz</i>
Udorn	SSDPLVVAASIIGILHLILWILDRL
Rostock	SSDPLIIAASIIGILHLILWILNRL
Weybridge	SSDPLVIAASIIGILHFILWILDRL
V27A	SSDPLA ^A VVAASIIGILHLILWILDRL
S31N	SSDPLVVAAN ^N IIGILHLILWILDRL

3. Material und Methoden

3.1 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

3.1.1 Grundlagen

Die Rasterkraftmikroskopie, auch Atomic Force Microscopy (AFM) genannt, ist eine Rastersondentechnik zur detaillierten Untersuchung der Morphologie von Oberflächen. Das Messprinzip beruht auf der Wechselwirkung einer Spitze mit der Probenoberfläche. Die Spitze besteht hierbei meist aus einem sehr harten Material wie Silizium oder Siliziumnitrit und ist im Idealfall an ihrem vordersten Punkt auf nur wenige Atome verjüngt. Bei Annäherung dieser atomaren Spitze an eine Oberfläche treten bei sehr geringem Abstand zwischenmolekulare Wechselwirkungen zwischen der Spitze und der Probenoberfläche auf. In erster Näherung können diese zwischenmolekularen Wechselwirkungen in ihrer Gesamtheit durch ein Lennard-Jones-Potential (Gl. 3.1.1) beschrieben werden.

$$V = 4\varepsilon \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right] \quad \text{Gl. 3.1.1}$$

Dieses Potential stellt eine Näherung dar, welche die bei einem großen Abstand dominierenden attraktiven Wechselwirkungen (Van-der-Waals und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) und die repulsiven Wechselwirkungen (Pauli Abstoßung) bei einem kleinen Abstand zwischen Spitze und Probenoberfläche vereint. Durch Differenzieren erhält man die Kraft-Abstands-Kurve, welche die zwischen der Spitze und der Oberfläche auftretenden Kräfte in Abhängigkeit des Abstandes beschreibt (siehe Abbildung 11 rechts). Durch diese Kraft-Abstands-Kurve werden die verschiedenen im Folgenden erläuterten Betriebsmodi des AFM näher eingegrenzt.

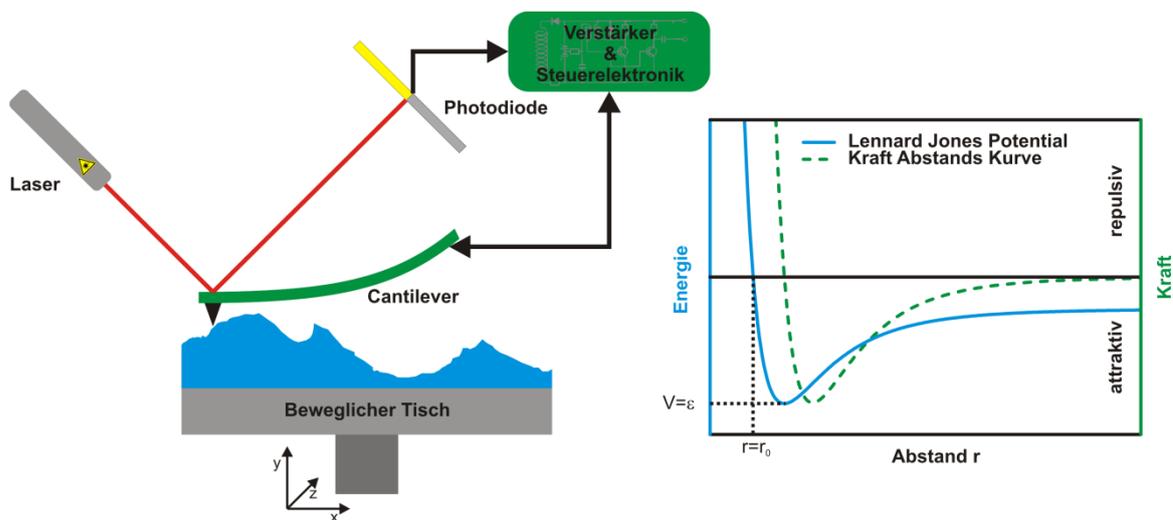


Abbildung 11: Links: Schematische Darstellung des AFM Funktionsprinzips; Rechts: Lennard-Jones-Potential (blau, durchgezogen) und Kraft-Abstands-Kurve (grün, gestrichelt).

Die atomare Spitze ist im AFM an einem biegbaren Balken (Cantilever) befestigt, auf dessen Oberfläche ein Laserstrahl gerichtet ist. Der Laserstrahl wird auf der Balkenoberfläche reflektiert,

wobei der reflektierte Strahl auf eine Photodiode trifft. Durch Montage der Probe auf einem beweglichen Tisch kann somit über eine Feedbackschleife der Abstand von Spitze zur Probenoberfläche geregelt werden.

3.1.2 Betriebsmodi in der Rasterkraftmikroskopie

Für das AFM können verschiedene Betriebsmodi gewählt werden. Im contact-mode wird die Spitze soweit angenähert, dass man sich im repulsiven Teil der Kraft-Abstands-Kurve befindet (siehe Abbildung 11 rechts). Durch die starke Krümmung der Kraft-Abstands-Kurve kann in diesem Bereich die höchste Auflösung erzielt werden. Jedoch lässt sich dieser Betriebsmodus nur für sehr glatte Oberflächen realisieren. Beim non-contact-mode wird der Abstand zwischen Spitze und Probe etwas erhöht, so dass anziehende Kräfte vorliegen. Da diese in der Regel relativ schwach sind und die Krümmung der Kraft-Abstands-Kurve in diesem Bereich gering ist, wird mit einem oszillierenden Balken gemessen. Durch eine Änderung der Kraft zwischen Oberfläche und Spitze wird die Schwingung des Balkens beeinflusst, was somit als Feedbackparameter benutzt werden kann. Im tapping-mode wird analog dem non-contact-mode verfahren, wobei die Oszillationen hier so gewählt werden, dass die Spitze auch in den repulsiven Teil der Kraft-Abstands-Kurve bewegt wird.

3.1.3 Verwendetes Gerät

Sämtliche in dieser Arbeit gezeigten AFM-Messungen wurden im tapping-mode aufgenommen. Hierzu wurde ein Multimode™ SPM Gerät der Firma Digital Instruments, Santa Barbara, California, USA verwendet. Die Auswertung der AFM-Aufnahmen wurde mit dem Programm NanoScope 6.13R1 (R) der Firma Digital Instruments/Veeco durchgeführt.

3.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

3.2.1 Grundlagen

Die REM ist eine Methode, um sehr detaillierte Bilder von Oberflächen zu erzeugen. Das Funktionsprinzip ist hierbei ähnlich dem eines Lichtbildmikroskops, nur dass hier ein Elektronenstrahl auf die zu untersuchende Probe fokussiert wird und nicht Licht. Das Bild wird dabei, durch die Detektion der von der Probe emittierten Elektronen bzw. der charakteristischen Röntgenstrahlung erzeugt [69]. Durch die geringere Wellenlänge des Elektronenstrahls im Vergleich zum sichtbaren Licht in der Lichtbildmikroskopie erhält man hier eine Höchstaufklärung von bis zu 1000000 : 1.

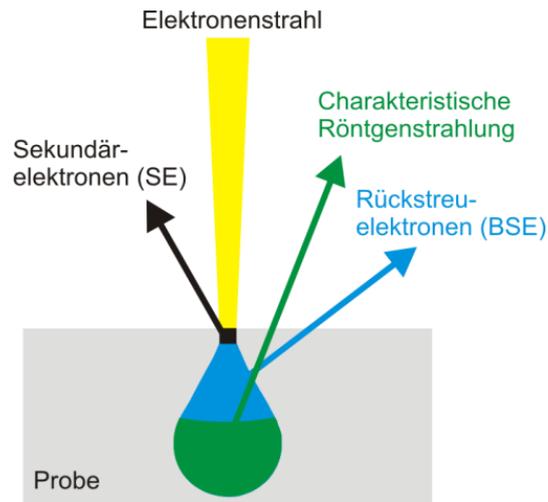


Abbildung 12: Streubirne beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf der Probe und charakteristische Emissionsbereiche für Sekundärelektronen, rückgestreute Elektronen und charakteristische Röntgenstrahlung.

Zur technischen Realisierung wird die Probe im Vakuum vermessen, um Streuverluste zu vermeiden. Der Elektronenstrahl wird hierbei über Magnetspulen auf die Probe fokussiert, wobei es zur Ausbildung einer sogenannten Streubirne (siehe Abbildung 12) auf der Probenoberfläche kommt. Je nach Art der Fragestellung werden über verschiedene Detektoren die verschiedenen von der Probe emittierten Elektronen detektiert. Sekundärelektronen (SE) werden nur aus der obersten Schicht der Probe gelöst, man erhält somit Informationen zur Topographie der Oberfläche. In tieferliegenden Bereichen kommt es zur Rückstreuung des Elektronenstrahls, sogenannte Rückstreu-elektronen (BSE) werden freigesetzt. Die Intensität der Rückstreuung ist dabei umgekehrt proportional zur Ordnungszahl wodurch sich ein zusätzlicher Materialkontrast ergibt. Zudem erlaubt die emittierte charakteristische Röntgenstrahlung über einen geeigneten Detektor Rückschlüsse auf die Materialzusammensetzung.

3.2.2 Verwendetes Gerät

Die für diese Arbeit verwendeten REM Aufnahmen wurden mit einem Hitachi SU8030 Rasterelektronenmikroskop aufgenommen. Die Beschleunigungsspannung betrug dabei 15 kV, detektiert wurden die Sekundärelektronen.

3.3 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

3.3.1 Grundlagen

Unter der Kalorimetrie versteht man ganz allgemein die Messung von Wärmeänderungen, die in einem zu untersuchenden System ablaufen. Im Folgenden wird hierbei zwischen Probe und Umgebung differenziert, wobei unter Umgebung die direkte Probenumgebung, sprich das Wärmebad, zu verstehen ist.

Als fundamentale Bauart von Kalorimetern wird zwischen adiabatischen Kalorimetern und Zwillingskalorimetern unterschieden [70]. Bei Kalorimetern adiabatischer Bauart wird keine Wärme zwischen Probe und Umgebung ausgetauscht, was bedeutet, dass zu jedem Zeitpunkt die Temperatur der Umgebung gleich der Temperatur der Probe ist. Bei in der Probe ablaufenden exothermen Prozessen muss die Umgebung entsprechend beheizt, bei

endothermen Prozessen gekühlt werden. Bei einem Zwillingskalorimeter befindet sich in der Umgebung zusätzlich zur Probe noch eine möglichst identische Referenz, wobei als Messwert der Differenzwärmestrom zwischen Probe und Referenz erfasst wird.

Die Unterscheidung zwischen Probe und Umgebung führt dabei je nach Wärmewiderstand (R_w), Probentemperatur T_p und Umgebungstemperatur T_U zu verschiedenen möglichen Betriebsarten des Kalorimeters:

- Isothermer Betrieb: $T_p=T_U$ =konstant, R_w sehr klein
- Adiabatischer Betrieb: $T_p=T_U$, R_w sehr groß
- Isoperiboler Betrieb: T_p veränderlich im Lauf der Messung, T_U =konstant, R_w beliebig aber definiert

Die begriffliche Beschreibung der isothermen bzw. adiabatischen Betriebsart darf jedoch nicht mit den strikten Begrifflichkeiten gleichgesetzt werden, die in der Thermodynamik Verwendung finden. Vielmehr handelt es sich um einen quasiisothermen bzw. quasiadiabatischen Betrieb, da nur dies technisch realisierbar ist.

Die messtechnische Erfassung der auftretenden Wärmeänderungen kann hierbei entweder durch eine Messung der Temperaturdifferenz oder durch Kompensationsmessung der Wärmeänderung erfolgen. Für Kompensationsmessungen ist heutzutage die thermoelektrische Kompensation die gängigste und genaueste Methode. In der Probe ablaufende exotherme Effekte werden durch Peltier-Elemente kompensiert, endotherme durch einen Heizwiderstand. In beiden Fällen ist die notwendige elektrische Leistung, die zur Kompensation aufgebracht wird, gleich der auftretenden Wärmeänderung:

$$\Delta Q = \int_{t_1}^{t_2} I(t) \cdot U(t) dt \quad \text{Gl. 3.3.1}$$

3.3.2 Kalibrieren des Kalorimeters

Um verlässliche Werte für die auftretenden Wärmeänderungen zu erhalten, ist eine regelmäßige Kalibrierung des Kalorimeters erforderlich. Hierbei wird zwischen der dynamischen und der statischen Kalibrierung differenziert. Für die statische Kalibrierung wird die Messzelle mit einer bestimmte Wärmeleistung beheizt, auf welche die im Detektor registrierte Wärmeleistung abgestimmt wird.

Eine dynamische Kalibrierung ist notwendig, um die Zeitkonstante des Kalorimeters zu erfassen. Die registrierte Wärmeleistung hinkt der tatsächlich in der Messzelle produzierten Wärmeleistung wegen des Wärmetransportprozesses durch die Messzelle hin zum Detektor zeitlich hinterher. Um die Zeitkonstante der Einheit aus Kalorimeter und Probe zu ermitteln, wird die Messzelle sukzessive mit zwei Pulsen konstanter Wärmeleistung beheizt. Der erhaltene Signalverlauf wird durch eine Exponentialfunktion angenähert, wodurch die Zeitkonstante τ bestimmt werden kann. Die dynamisch korrigierte Wärmeleistung wird mittels der Tians-Gleichung Gl. 3.3.2 errechnet. Hierbei bezeichnet ϕ die registrierte, nicht korrigierte Wärmeleistung.

$$P_{\text{Dyn kor}} = \phi + \tau \frac{d\phi}{dt} \quad \text{Gl. 3.3.2}$$

Das für diese Arbeit verwendete Kalorimeter (TAM 2277) verwendet für die interne dynamische Korrektur zwei Zeitkonstanten, um eine bessere Präzision zu erzielen. Der zweiten Zeitkonstante kann allerdings keine physikalische Bedeutung beigemessen werden. Sie muss eher analog einer Taylor Reihenentwicklung betrachtet werden. In diesem Fall errechnet sich die dynamisch korrigierte Wärmeleistung folgendermaßen:

$$P_{\text{Dyn korr_TAM2277}} = \phi + (\tau_1 + \tau_2) \frac{d\phi}{dt} + \tau_1 \cdot \tau_2 \frac{d^2\phi}{dt^2} \quad \text{Gl. 3.3.3}$$

Durch dynamische Korrektur ist es somit möglich, in einer schnelleren Abfolge zu injizieren und hierdurch die Gesamtdauer eines Experiments signifikant zu reduzieren (siehe Abbildung 13). Ohne eine dynamische Korrektur bedarf es ungefähr der doppelten Zeit, bis das Signal wieder auf seinen Ursprungswert abgeklungen ist.

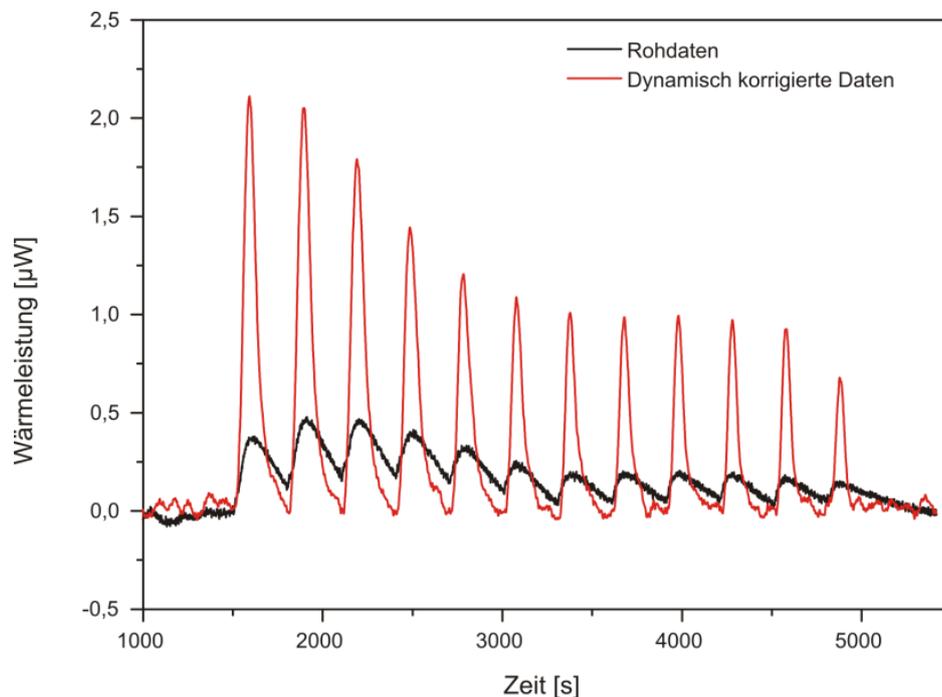


Abbildung 13: Darstellung der Rohdaten (schwarz) und der dynamisch korrigierten Messdaten (rot) einer ITC-Messung. Die dynamische Korrektur erlaubt es bereits erneut zu injizieren, obwohl das Signal der Rohdaten noch nicht ganz abgeklungen ist.

3.3.3 Bestimmung von Affinitätskonstanten mittels ITC

Wie bereits dargelegt wird während eines ITC Experiments die Wärmeleistung registriert, die während der Reaktion in der Messzelle erzeugt wird. Für eine exotherme Reaktion bedeutet dies, dass man eine positive Wärmeleistung erhält, bei einer endothermen Reaktion wird dementsprechend eine negative Wärmeleistung registriert. Durch den Einbau der Messzelle erhält man jedoch zunächst ein sehr großes Störsignal. Bis wieder eine Basislinie ohne Drift erreicht wird kann es bis zu 10 Stunden dauern. Aus zeitlichen Gründen wird daher mit den Messdaten eine Basislinienkorrektur durchgeführt, um das abfallende Störsignal zu eliminieren.

Material und Methoden

Um nun aus der basislinienkorrigierten Wärmeleistung $P(t)$ einer Injektion die zugehörige Wärmemenge ΔQ zu erhalten, werden die Messdaten integriert (Gl. 3.3.4). Hierbei wurden stets die dynamisch korrigierten Daten zur Integration verwendet. Prinzipiell erhält man bei Verwendung der Rohdaten dasselbe Ergebnis, nur erlaubt die Verwendung der dynamisch korrigierten Daten eine schnellere Injektionsfolge und somit kürzere Messzeiten.

$$\int_{t_1}^{t_2} P(t) dt = \Delta Q \quad \text{Gl. 3.3.4}$$

Zur Bestimmung der thermodynamischen Konstanten muss nach Integration der Peaks zunächst der Untergrund abgezogen werden, welcher aus dem Mittelwert der letzten Injektionen erhältlich ist. Nach Abzug des Untergrundes werden die so erhaltenen Wärmemengen auf die pro Injektion injizierte Stoffmenge bezogen. Diese Größe wiederum wird schließlich gegen das jeweilig vorliegende molare Verhältnis von Ligand zu Rezeptor aufgetragen. Aus diesem Schaubild kann nun die Affinitätskonstante und die Bindungsenthalpie durch eine nichtlineare Kurvenanpassung ermittelt werden. Für die nichtlineare Kurvenanpassung wird hierbei die im Theorieteil dieser Arbeit (siehe Kapitel 2.2.6) hergeleitete Gleichung (Gl. 2.2.24) verwendet.

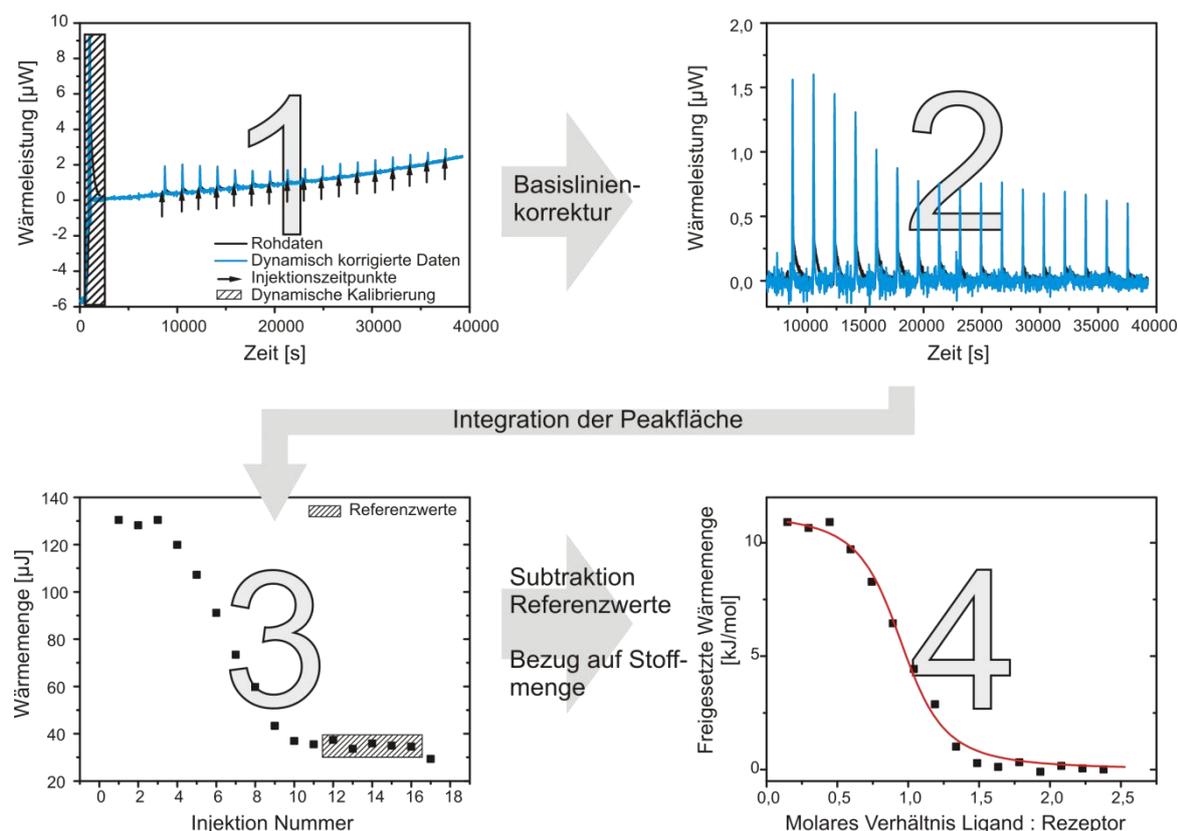


Abbildung 14: Auswerteverfahren zur Ermittlung thermodynamischer Konstanten aus einer ITC-Messung. Oben links: Darstellung der Rohdaten (schwarz) und dynamisch korrigierten Daten (rot). Schraffiert unterlegt ist die dynamische Korrektur vor der eigentlichen Messung. Die schwarzen Pfeile markieren die Injektionszeitpunkte. Oben rechts: ITC Daten nach Durchführen der Basislinienkorrektur. Unten links: Aus der Integration ermittelte Wärmemenge zu den entsprechenden Injektionszeitpunkten. Die Werte im grau schraffierten Bereich wurden als Referenzwert für den Untergrund verwendet. Unten rechts: Auftragung der auf die injizierte Stoffmenge bezogenen Wärmemenge gegen das molare Verhältnis Ligand / Rezeptor.

3.3.4 Verwendetes Gerät

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kalorimeter handelt es sich das Titrationskalorimeter „Thermal Activity Monitor TAM2277“ der Firma TA Instruments (ehemals Thermometric AB, Schweden). Dieses Kalorimeter ist in der Bauart eines Zwillingskalorimeters ausgeführt und wird isotherm betrieben, wobei das Messprinzip auf der thermoelektrischen Kompensation beruht.

Die Messungen wurden in einem Mikroreaktionssystem mit einer 4 mL Titrationseinheit der Baureihe 2251-310 durchgeführt. Zur Injektion der Proben wurde eine Spritzenpumpe der Baureihe „6120 Lund Syringe Pump“ der Firma Thermometric AB, Schweden, verwendet. Als Injektionsspritze wurden mit einer Goldkanüle 100 μL bzw. mit einer Edelstahlkanülen modifizierte 250 μL Spritze der Firma Hamilton, Schweiz verwendet.

3.4 Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RfS)

3.4.1 Grundlagen

Die detaillierten Grundlagen von RfS wurden bereits ausführlich in Kapitel 2.1.3 und 2.1.4 dieser Arbeit abgehandelt.

3.4.2 Durchführung von RfS-Messungen

Für die in dieser Arbeit dargestellten RfS-Messungen wurde eine automatisierte Fluidik verwendet. Der prinzipielle Aufbau der Fluidik ist hierbei in Abbildung 15 links dargestellt. Die Spritzenpumpe kann definierte Volumina durch einen der vier Ports im 4-Wege Ventil pumpen bzw. aufsaugen. Durch die Verwendung von zwei gegenläufig arbeitenden Spritzen kann hierbei ein gleichmäßiger Fluss erzeugt werden. Allein an den Umkehrpunkten der Spritzen kommt es zu einer kurzen Unterbrechung (ca. 0,5 s) des Flusses. Der prinzipielle Ablauf einer RfS-Messung ist in Abbildung 15 rechts dargestellt. Sie besteht hierbei aus den im Folgenden aufgeführten Blöcken. Die hierbei angegebenen Flussraten sind Werte die standardmäßig verwendet wurden. Falls davon abgewichen wurde, so ist dies explizit im experimentellen Teil dieser Arbeit vermerkt.

- BL: Basislinie; Spülen der Flusszelle (0,5 $\mu\text{L/s}$)
- P: Pause, Aufsaugen der Probenlösung in die Probenschleife
- Ass: Assoziationsphase; Überleiten der Probenlösung über den Transducer (0,5 $\mu\text{L/s}$)
- P: Pause; Reinigung der Probenschleife
- Diss: Dissoziationsphase; Spülen der Flusszelle (8 $\mu\text{L/s}$)
- P: Pause; Aufsaugen der Regenerationslösung
- Reg: Überleiten der Regenerationslösung (2 $\mu\text{L/s}$)
- BL: Spülen der Flusszelle (0,5 $\mu\text{L/s}$)

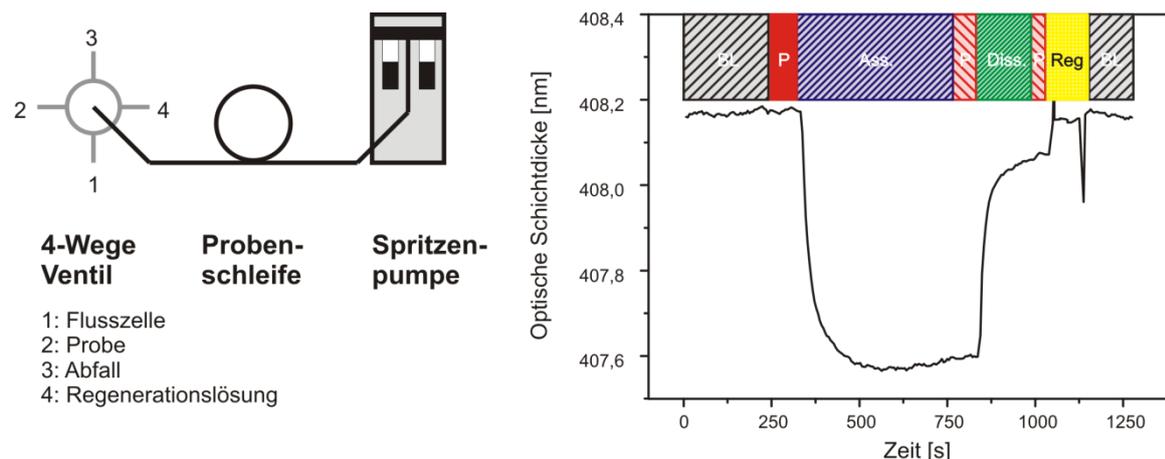


Abbildung 15: Links: Schematische Darstellung des verwendeten Fluidikkonzeptes. Rechts: Ablauf einer RfS-Messung: BL = Basislinie; P: Pause, Ass.: Assoziationsphase, Diss: Dissoziationsphase, Reg: Regenerationsphase.

Zur Auswertung der RfS-Messungen wurde der Mittelwert der Messpunkte, die während der ersten Basislinie aufgenommen wurden, vom aktuellen Messwert abgezogen. Zur Berechnung der relativen Signaländerung (z.B. bei einer $1-\lambda$ -Auswertung) wurden die Messdaten auf den ersten Datenpunkt bezogen (siehe Gl. 3.4.1). Um die Basislinie der Messungen auf den Wert 0 zu skalieren wurde des Weiteren noch 1 subtrahiert.

$$S_{rel} = 100\% \cdot \frac{S(t)}{S(0)} - 1 \quad \text{Gl. 3.4.1}$$

Bei der standardmäßig durchgeführten spektralen Auswertung wurden als Messdaten die im Programm IFZ ermittelte optische Schichtdicke in Abhängigkeit der Zeit verwendet. Für eine $1-\lambda$ -Auswertung wurden die aufgenommenen Interferenzspektren direkt ausgewertet, wobei hierfür die Wellenlänge mit der größten relativen Signaländerung verwendet wurde.

3.4.3 Referenzieren von RfS-Messungen

Für RfS-Messungen müssen die Reflektionsspektren (S) zur Auswertung mit dem Programm IFZ auf ein zuvor aufgenommenes Referenzspektrum (R), (Reflektionsspektrum eines Referenzplättchens) und ein Dunkelspektrum D (Lichtleiter abgedeckt) mittels Gleichung Gl. 3.4.2 referenziert werden.

$$S_{ref} = \frac{S - R}{R - D} \quad \text{Gl. 3.4.2}$$

Die Änderung der optischen Schichtdicke wird aus der Verschiebung dieses referenzierten Spektrums S_{ref} durch das Programm IFZ berechnet.

3.4.4 Bestimmung von kinetischen und thermodynamischen Parametern mittels RfS

Für die praktische Durchführung werden die Bindungskurven bei verschiedenen Konzentrationen an Ligand bestimmt. Aus den Bindungskurven kann man im Sättigungsbereich die Gleichgewichtsbeladung Γ_{GG} ermitteln. Für eine Analyse nach Scatchard trägt man diese gegen

die Gleichgewichtsbeladung geteilt durch die Konzentration auf und kann aus der negativen Steigung die Assoziationskonstante bestimmen.

Über eine nichtlineare Kurvenanpassung von Gleichung Gl. 2.4.3 an die einzelnen Bindungskurven kann jeweils die scheinbare Ratenkonstante k_s ermittelt werden. Aus der Auftragung der jeweiligen Konzentration des Liganden gegen die scheinbare Ratenkonstante erhält man durch einen linearen Fit die Assoziationsratenkonstante k_a aus der Steigung, die Dissoziationsratenkonstante k_d aus dem Ordinatenabschnitt.

Setzt man die Konzentration des Liganden auf 0, so kommt es zur Dissoziation der bereits an der Oberfläche angebotenen Liganden. Die Dissoziation folgt der Reaktionsgleichung in Gleichung Gl. 2.4.1 zufolge einer Kinetik erster Ordnung. Man kann demnach die Dissoziationsratenkonstante ebenfalls durch eine nichtlineare Kurvenanpassung der Dissoziationsphase erhalten, was eine genauere Methode darstellt als die Ermittlung aus dem Ordinatenabschnitt.

3.4.5 Bestimmung analytischer Parameter

Neben der Möglichkeit zur Bestimmung kinetischer und thermodynamischer Parameter kann RfS auch schlichtweg als Transduktionsmethode zur Quantifizierung von Analyten verwendet werden. Hierzu wird das erhaltene Signal (z.B. das Signal im Gleichgewicht oder die Steigung des Signals bei diffusionskontrollierter Anbindung) gegen die verwendete Konzentration aufgetragen. Der funktionale Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration stellt die Kalibrierfunktion dar. Hierfür wird oftmals eine empirische Funktion verwendet, wie zum Beispiel eine 4-Parameter oder eine 5-Parameter logistische Funktion [71]. Verwendet man lediglich das Gleichgewichtsbindungssignal für eine Kalibrierung, so kann auch eine physikalisch sinnvolle Funktion verwendet werden, die die Adsorptionseigenschaften des betrachteten Systems beschreibt. Bei MIPs stellt dies zum Beispiel eine Langmuir-Freundlich Adsorptionsisotherme dar. Diese beschreibt die bei der Wechselwirkung zwischen MIP und Templatomolekül ablaufenden Prozesse am generellsten:

$$f(x) = \frac{abx^{1-c}}{1+bx^{1-c}} \quad \text{Gl. 3.4.3}$$

Auf Basis einer solchen Kurvenanpassung können analytische Parameter wie die Nachweisgrenze (limit of detection, LOD) oder die Quantifizierungsgrenze (limit of quantification, LOQ), bestimmt werden. Zur Ermittlung dieser beider Parameter muss zunächst die Standardabweichung des Signals bei Messung mit einer Analytkonzentration von 0 ermittelt werden. Die Standardabweichung wurde in dieser Arbeit auf Basis einer 3-fach Messung bestimmt. Der LOD ist nun gleich der Konzentration, die auf der Kalibrierfunktion ein Signal erzeugt, das gleich dem Nullwert zuzüglich 3-mal seiner Standardabweichung ist. Die Berechnung des LOQ erfolgt analog, nur dass hier der Nullwert zuzüglich 10-mal seiner Standardabweichung verwendet wurde.

3.4.6 Verwendete Komponenten

Für RfS-Messungen wurden Interferenzglastransducer verwendet. Dieses Mehrschichtsystem besteht aus einem Glassubstrat D 263, auf das 10 nm Ta₂O₅ und 330 nm SiO₂ aufgebracht sind. Die zur Referenzierung verwendeten Referenztransducer weisen den identischen Schichtaufbau auf, nur fehlt die Auflage von 330 nm SiO₂.

Die restlichen Komponenten die für den RfS Messaufbau verwendet wurden sind im Folgenden aufgelistet.

Autosampler	Ismatec Remote mit ASIA Probenarm, Ismatec, Zürich
Flusszelle	Eigenkonstruktion des AK Gauglitz, gefertigt aus POM mit einem Flusskanal von 100 µm Tiefe.
Lichtleiter	Polymer-Lichtleiter (PMAA) 1 mm Durchmesser mit 1 auf 2 Faserkoppler von Laser Components GmbH, Olching
Linsen und Positionieroptik	Spindler & Hoyer, Göttingen
Schläuche	Teflonschläuche Innendurchmesser 1,5 mm, Ismatec, Zürich
Spektrometer	Umgebautes Küvettenspektrometer SPEKOL 1100 von Analytik Jena
Spritzenpumpe	Microlab 540B Zweispritzen-Dispensor (2·100 µL Spritzen), Hamilton, Bonaduz
Ventil	Microlab MVP mit 4-Wege-Ventil Aufsatz, Hamilton, Bonaduz
Weißlichtquelle	20 W/12V Halostar® Starlite 64425 S, Osram, Augsburg

3.5 Oberflächenpräparation

3.5.1 Oberflächenpräparation

Zur Modifikation der Sensoroberflächen wird diese zunächst gereinigt und aktiviert. Anschließend erfolgt die Silanisierung. Je nach Ausführung des Transducers wird im Anschluss an die Silanisierung noch eine Polymerschicht aufgebracht. Die sensitive Schicht, bestehend aus nanoMIPs bzw. nanoNIPs, wird im finalen Schritt auf der Polymerschicht bzw. auf dem Silan immobilisiert.

3.5.2 Oberflächenreinigung und -aktivierung

Vor der Aktivierung der Transducer werden diese zunächst zur Reinigung 1 min lang in KOH-Lösung eingelegt. Nach mehrfachem Spülen mit Wasser werden die Transducer zur Aktivierung 15 min lang im Ultraschallbad mit einer frisch präparierten Piranha Lösung behandelt. Nach erneutem gründlichem Spülen mit Wasser werden die Transducer im Stickstoffstrom getrocknet und können anschließend zur Silanisierung verwendet werden.

3.5.3 Silanisierung mit GOPTS

Die Silanisierung mit GOPTS wird im Sandwich-Verfahren durchgeführt. Hierzu werden zunächst 10 µL GOPTS auf die zu silanisierende Seite eines Transducers gegeben. Ein zweiter Transducer wird mit der zu silanisierenden Seite nach unten auf den ersten Transducer gelegt. Die Transducer werden so auf den Deckel eines Schnappdeckelglases gelegt und für eine Stunde in einer trockenen Atmosphäre in einem Wägeglas inkubiert. Nach einer Stunde werden die Transducer mit wasserfreiem Aceton abgespült und direkt im Anschluss weiter umgesetzt.

3.5.4 Silanisierung mit APTES

Die Silanisierung mit APTES wird auf Basis der von Asenath-Smith et al. [72] beschriebenen Methode durchgeführt. Die frisch aktivierten Transducer werden nach Trocknen im Stickstoffstrom in einer APTES Silanisierlösung 4 h bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre silanisiert. Nach Abschluss der Reaktion werden die Transducer mit Toluol, Ethanol und Wasser gewaschen.

3.5.5 Modifikation mit PEG

Auf frisch mit GOPTS silanisierten Transducer werden jeweils 15 µL DA-PEG Lösung auf die zu modifizierende Oberfläche gegeben. Direkt im Anschluss werden die Transducer bei 70 °C 24 h lang inkubiert. Zum Abspülen des nicht kovalent angebondenen PEG werden die Transducer in 60 °C warmem Wasser geschwenkt und mehrfach mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Bei der Modifikation der Oberfläche mit Alkin-PEG und Azid-PEG wird jeweils anstelle von DA-PEG entsprechend Alkin- bzw. Azid-PEG verwendet.

3.5.6 Modifikation mit AMD

Die Umsetzung mit AMD wird im Sandwich-Verfahren durchgeführt. Hierzu werden 10 µL einer AMD-Lösung auf einen frisch mit GOPTS silanisierten Transducer gegeben. Ein zweiter, frisch silanisierte Transducer wird mit der zu modifizierenden Seite nach unten auf den Ersten gelegt. Zur Inkubation werden die Transducer 24 h lang in einem Wägeglas mit einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre aufbewahrt. Nach Abschluss der Reaktion werden die Transducer mehrfach mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

3.5.7 Nichtkovalente Anbindung der nanoMIPs/nanoNIPs

Zur nichtkovalenten Anbindung werden 40 µL nanoMIP/nanoNIP-Suspension auf die Transduceroberfläche gegeben. Die Transducer werden in einer mit Methanoldampf gesättigten Kammer 72 h lang inkubiert. Nicht angebundene Partikel werden im Anschluss durch mehrfaches Spülen mit Methanol abgewaschen. Die Unterseite der Transducer wird zusätzlich mit einem feuchten Tuch gereinigt.

3.5.8 Kovalente Anbindung modifizierter nanoMIPs/nanoNIPs

Die kovalente Anbindung modifizierter Polymerpartikel auf Sensoroberflächen wird in Anlehnung an die von Morawietz [73] beschriebene Methode durchgeführt. Hierzu wird zur Modifikation von drei Transducern in einem Wägeglas 5 mL der Huisgen-Reaktionsmischung

verwendet. Nach 24 h Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch werden die Transducer mit Wasser und DMSO gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Anbindung von Alkin-Polymerpartikeln werden mit Azid-PEG modifizierte Transducer verwendet, zur Anbindung von Azid-Polymerpartikeln werden Alkin-PEG modifizierte Transducer verwendet.

3.6 Sonstige Methoden

3.6.1 Batch Bindungsexperimente

Zur Bestimmung der adsorbierten Stoffmenge in homogener Phase wird wie folgt vorgegangen. Es wird für jedes untersuchte Lösemittelgemisch dasselbe Verhältnis von Partikelkonzentration und L-BFA Stoffmenge in Lösung von jeweils $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ hergestellt. Die Polymerpartikel werden in den entsprechenden Lösemittelgemischen für 2 min mit dem Ultraschallstab suspendiert. Anschließend wird die erhaltene Suspension 1 h lang auf dem Schütteltisch bei Raumtemperatur inkubiert. Die adsorbierte Stoffmenge wird nach Entfernen der Polymerpartikel durch UV/Vis Messungen bestimmt.

3.6.2 Entfernung der Polymerpartikel aus Suspensionen

Zum Entfernen von Polymerpartikeln aus Polymerpartikel-Suspensionen werden 1,5 mL der Suspension 35 min bei 13000 RPM zentrifugiert und anschließend mit einem Teflon Spritzenfilter (Whatman Syringe Filter 13 mm, PTFE, Porengröße $1 \mu\text{m}$) gereinigt.

3.6.3 Bestimmung der adsorbierten Stoffmenge durch UV/Vis Messungen

Sowohl für Batch Bindungsexperimente als auch für ITC-Messungen wird die von den Partikeln adsorbierte Stoffmenge bestimmt. Zur Ermittlung der Extinktion werden Differenzspektren ermittelt. Die Referenz stellt hierbei eine Partikellösung ohne L-BFA dar, aus der die Polymerpartikel nach der o.g. Methodik entfernt wurden.

3.6.4 Bestimmung der maximalen Löslichkeit von L-BFA

Die maximale Löslichkeit von L-BFA wird in Lösemittelgemischen der Zusammensetzung 20-50 % Methanolgehalt (in 10 % Schritten) bestimmt. Hierzu werden zunächst übersättigte Lösungen hergestellt durch das Mischen einer hochkonzentrierten methanolischen L-BFA Lösung mit der entsprechenden Menge Wasser. Die Proben wurden anschließend 3 Monate im Dunkeln bei Raumtemperatur zur Kristallisation aufbewahrt. Durch UV/Vis Messungen des Überstandes wird die Konzentration in Lösung bestimmt, welche der maximalen Löslichkeit im jeweiligen Lösemittelgemisch entspricht. Hierzu wurden drei voneinander unabhängige Ansätze durchgeführt.

3.6.5 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von L-BFA

Zur Ermittlung des Extinktionskoeffizienten wurden sechs Kalibrierlösungen unterschiedlicher Konzentration vermessen. Hierbei wurde im Extinktionsbereich von 0,15 bis 0,8 kalibriert. Der Extinktionskoeffizient wurde für Wasser-Methanol-Gemische mit 20, 30 40 und 50 % Methanolgehalt bestimmt.

3.6.6 Durchführung von ITC-Messungen mit Polymerpartikeln

Zur Durchführung von ITC-Messungen mit Polymerpartikeln wurde zunächst eine Suspension der Polymerpartikel im entsprechenden Lösemittelgemisch hergestellt (für die entsprechenden Konzentrationen siehe Tabelle 3). Es wurde jeweils mindestens ein Volumen von 2 mL verwendet und 1 min mit dem Ultraschallstab aufsuspendiert. Sofort nach der Behandlung mit dem Ultraschallstab wurde die Suspension zu je 200 μ L in kleine Eppendorf Cups aliquotiert. Unmittelbar vor dem Start der ITC-Messungen wurden die Aliquots für 10 min im Ultraschallbad erneut aufsuspendiert.

Tabelle 3: Versuchsparameter für die ITC-Messungen mit geprägten und nicht geprägten Polymerpartikeln

<i>Methanol- gehalt in %</i>	<i>Konzentration an L-BFA</i>	<i>Konzentration der Partikel</i>	<i>Injektionsvolumen pro Injektion</i>	<i>Zahl der Injektionen</i>
50	1,284 mM	50 mg/mL	20 μ L	4
40	350,0 μ M	50 mg/mL	20 μ L	4
30	81,1 μ M	50 mg/mL	20 μ L	4
20	50,0 μ M	25 mg/mL	20 μ L	4

Zur Herstellung des Titranden wird exakt dieselbe Stammlösung des Lösemittelgemisches verwendet wie sie auch zur Aufsuspendierung der Polymerpartikel verwendet wurde.

Die Messung wurde jeweils sofort nach Einbau der Probe ins Kalorimeter gestartet. Die Sequenz des Messprogramms bestand aus 1 h Basislinie mit anschließend 4 Injektionen zu je 20 μ L im Abstand von je 15 min.

3.6.7 Durchführung von ITC-Messungen mit Peptiden

Die Messungen wurden, sofern im Ergebnisteil nicht explizit anders dargestellt, in ITC Puffer (genaue Zusammensetzung siehe Abschnitt 3.9) durchgeführt. Zum Lösen der Peptide und des Liganden wurde stets eine frisch zubereitete DPC Lösung verwendet, wobei Peptid und Ligand jeweils in derselben Charge der frisch zubereiteten DPC Lösung gelöst wurden. Die Peptidlösung wurde hierbei im Ultraschallbad mehrfach geschwenkt bis eine klare Lösung erhalten wurde. Standardmäßig wurde hierbei für die Messungen ein Titrandvolumen von 2 mL verwendet mit einer Konzentration des Peptidtetramers von 28,2 μ mol/L (d.h. es wurde eine Konzentration von 125 μ mol/L des monomeren Peptides eingestellt). Die Titrantlösung wurde hierbei auf eine Konzentration von 1,1 mmol/L eingestellt, es wurden pro Injektion jeweils 7,6 μ L mit entsprechend 8,4 nmol injiziert.

Da sich, basierend auf diesen Standardwerten, nicht für alle Messungen ein gutes Ergebnis erzielen ließ, (bedingt durch die unterschiedlichen Affinitäten und Bindungsenthalpien) musste für manche Liganden von diesen Standardwerten abgewichen werden. Für die im Ergebnisteil dargestellten Messungen wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Konzentrationen und Injektionsvolumina verwendet.

Material und Methoden

Für die ITC-Messungen wurde vor Beginn der ersten Injektion eine Basislinie einer Mindestdauer von 1 h aufgenommen. Die Injektionen erfolgten mit einem zeitlichen Mindestabstand von 6 min.

Tabelle 4: Messbedingungen der ITC-Messungen für Udorn und Weybridge. Für nicht aufgelistete Liganden wurden die Standardeinstellungen zur Messung verwendet.

<i>Peptid</i>	<i>Ligand</i>	<i>Volumen Vorlage [mL]</i>	<i>Konzentration Peptid Tetramer [$\mu\text{mol/L}$]</i>	<i>Konzentration Ligand [mmol/L]</i>	<i>Volumen pro Injektion [μL]</i>	<i>Stoffmenge pro Injektion [nmol]</i>
Udorn	Am	2	21,9	1,1	9	9,9
Udorn	Rim	2	21,9	1,1	9	9,9
Udorn	24	2	62,5	2,2	7,6	16,7
Weybridge	10	2	62,5	2,2	7,6	16,7
Weybridge	11	2	62,5	2,5	7,6	19
Weybridge	13	3,2	28,2	1,4	7,6	10,6
Weybridge	16	3,2	35,6	2,2	7	15,4
Weybridge	27	2	62,5	2,2	7,6	16,7
Weybridge	26	2	62,5	2,2	7,6	16,7
Weybridge	24	2	62,5	2,2	7,6	16,7

3.7 Software

ChemSketch	ACD/Labs Version 12.01
CorelDRAW X3	Corel Corporation, Version 13.0.0.576
Digitam	SciTech Software AB & Thermometric AB, Version 4.1
EndNote X7	Thomas Reuters, Version X7.0.2
IFZ	Andreas Brecht & Gerolf Kraus, Version 3.0
ImageJ	ImageJ, National Institutes of Health, Version 1.47
Lambda-SPX/PScan	Ascanis, Version 1.7
Measure	Gerolf Kraus, Version 8.0
Nanoscope	Digital Instruments/Veeco Version 6.13R1
Origin 8.1	OriginLab, Version 8.1.13.88
Scientist 3.0	Micromath Research, Version 3.0.0.215
Web of Science	Thomas Reuters, Version 5.13

3.8 Chemikalien

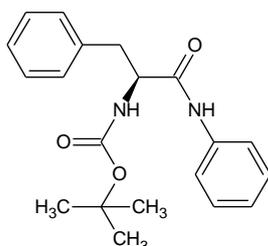
Chemikalien, die nicht näher spezifiziert aufgelistet sind wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Alkin-PEG	Alkin-PEG-NH ₂ ; 2 kDa mittlere Molmasse, Rapp Polymere, Tübingen
AMD	Aminodextran, 50 % Aminierung, Innovent e.V., Jena
Azid-PEG	Azid-PEG-NH ₂ ; 2 kDa mittlere Molmasse, Rapp Polymere, Tübingen
DA-PEG	NH ₂ -PEG-NH ₂ ; 2 kDa mittlere Molmasse, Rapp Polymere, Tübingen
D-BFA	L-Boc-Leucin-Anilid, Bereitgestellt durch die Arbeitsgruppe Tovar, Universität Stuttgart
DPC	Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, USA
L-BFA	L-Boc-Phenylalanin-Anilid, Bereitgestellt durch die Arbeitsgruppe Tovar, Universität Stuttgart
L-BLA	D-Boc-Phenylalanin-Anilid, SOHENA GmbH, Tübingen
L-BYA	L-Boc-Tyrosin-Anilid, SOHENA GmbH, Tübingen
Ligand 8-27, Rim, Am	Bereitgestellt durch die Arbeitsgruppe Kolocouris, Universität Athen
Udorn	AS-Sequenz: SSDPLVVAASIIGILHLILWILDRL, C Amidierung, TFA Salz, Centic Biotech, Reinheit >98 %, Centic Biotech, Heidelberg
Weybridge	AS-Sequenz: SSDPLVIAASIIGILHFILWILDRL, C Amidierung, TFA Salz, Centic Biotech, Reinheit >98 %, Centic Biotech, Heidelberg

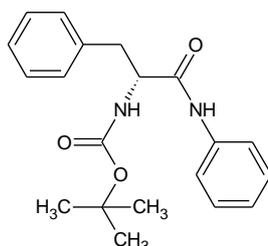
3.8.1 Strukturformeln für Kapitel 4.1 und Kapitel 4.2 relevante Moleküle

Die im Folgenden dargestellten Moleküle wurden zur Untersuchung der molekular geprägten Polymere verwendet.

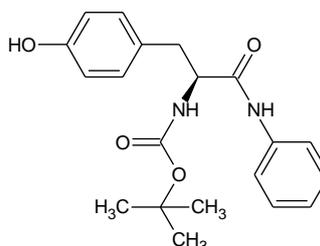
L-BFA
M = 340,4 g/mol



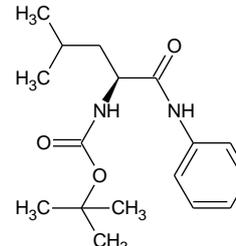
D-BFA
M = 340,4 g/mol



L-BYA
M = 356,4 g/mol



L-BLA
M = 306,4 g/mol

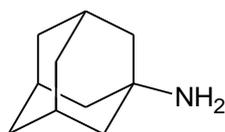


3.8.2 Strukturformeln für Kapitel 4.3 relevante Moleküle

Für die im Folgenden dargestellten Moleküle wurde die Wechselwirkung mit dem M2 Protein mittels ITC untersucht.

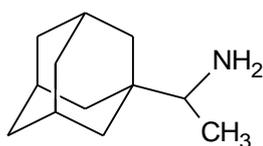
Amantadin

M = 151,2 g/mol



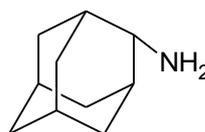
Rimantadin

M = 179,3 g/mol



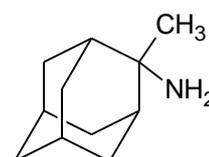
Ligand 8

M = 151,2 g/mol



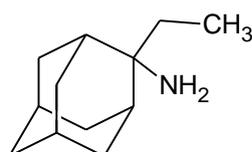
Ligand 9

M = 165,3 g/mol



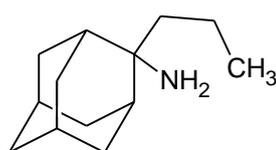
Ligand 10

M = 179,3 g/mol



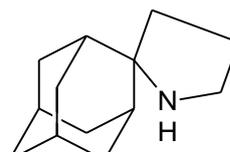
Ligand 11

M = 193,3 g/mol



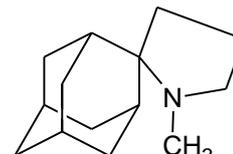
Ligand 13

M = 191,3 g/mol



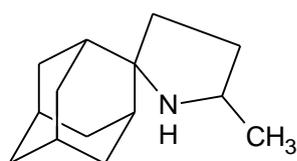
Ligand 14

M = 205,3 g/mol



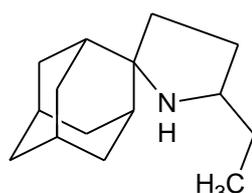
Ligand 16

M = 205,3 g/mol



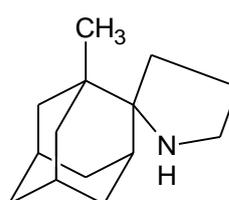
Ligand 17

M = 219,4 g/mol



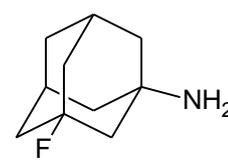
Ligand 18

M = 205,3 g/mol



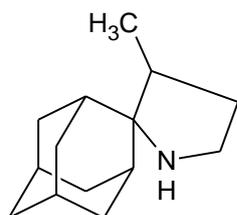
Ligand 24

M = 169,2 g/mol



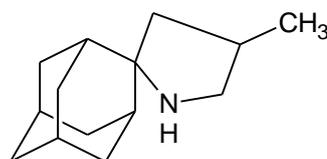
Ligand 26

M = 205,3 g/mol



Ligand 27

M = 205,3 g/mol



3.9 Lösungen, Suspensionen, Puffer

20 % MeOH	Mischung aus Methanol und Wasser im Volumenverhältnis von 1:4
30 % MeOH	Mischung aus Methanol und Wasser im Volumenverhältnis von 3:7
40 % MeOH	Mischung aus Methanol und Wasser im Volumenverhältnis von 2:3
50 % MeOH	Mischung aus Methanol und Wasser im Volumenverhältnis von 1:1
AMD-Lösung	0,15 mg/ml AMD gelöst in bidestilliertem Wasser
APTES Silanisierlösung	0,5 mL APTES gelöst in 20 mL wasserfreiem Toluol
Bidestilliertes Wasser	Herstellung über die Filtrationsanlage Purelab classic, ELGA LabWater, Celle, Deutschland
DPC Lösung	13 mmol/L DPC gelöst in ITC Puffer
Huisgen- Reaktionslösung	20 g/L Ascorbinsäure, 10 g/L Cu(II)sulfat Pentahydrat gelöst in einer 4:1 Mischung aus DMSO und bidestilliertem Wasser. Nach Erhalt einer klaren Lösung Zugabe von 5 g/L nanoMIPs/nanoNIPs, Suspendierung für 1 min 30 s mit dem Ultraschallstab
ITC Puffer	100 mmol/L NaCl und 50 mmol/L Na ₂ HPO ₄ gelöst in bidestilliertem Wasser. Durch Titration mit NaOH auf pH 8 eingestellt
KOH Lösung	6 mol/L KOH gelöst in bidestilliertem Wasser
nanoMIP- Suspension	1 g/L nanoMIPs in Methanol suspendiert. Suspendierung durch Behandlung im Ultraschallbad (10 min) und anschließend 1 min mit dem Ultraschallstab
nanoNIP- Suspension	1 g/L nanoNIPs in Methanol suspendiert. Suspendierung durch Behandlung im Ultraschallbad (10 min) und anschließend 1 min mit dem Ultraschallstab
PEG-Lösung	4 mg/mL DA-PEG in wasserfreiem DCM
Piranha	Frisch hergestellte Mischung aus 96 %iger H ₂ SO ₄ und 30 %iger H ₂ O ₂ , gemischt im Verhältnis 3:2 (V/V)

3.10 Geräte

Im Folgenden sind nur die bisher noch nicht näher genannten bzw. spezifizierten Geräte aufgelistet.

Ellipsometer	Spectroscopie Ellipsometer ES4G, Sopra, Paris
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P, Bandelin, Berlin
Ultraschallstab	UW70 Ultraschallstab mit GM70 Sonopulse Steuerungseinheit, Bandelin, Berlin
UV/Vis Spektrometer	UV/Vis/NIR Spektrometer Lambda-9, Perkin Elmer, Überlingen

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Molekular geprägte Nanopartikel als sensitive Schicht

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, besteht vermehrtes Interesse an stabilen Erkennungselementen, die in optischen Sensoren eingesetzt werden können. Im Folgenden sind zu diesem Thema Ergebnisse von Untersuchungen dargestellt, die die Verwendung von nanoMIPs als Erkennungselement in optischen Sensoren evaluieren. Neben der Untersuchung effektiver Möglichkeiten zur Immobilisierung der Erkennungselemente und Auswirkungen auf die erhaltene Signaldynamik werden auch Ergebnisse zur Bewertung der Stabilität der sensitiven Schichten dargestellt.

4.1.1 Elektrostatische Immobilisierung

Eine elektrostatische Immobilisierung beruht darauf, dass sich die Ladungen der Partikel und Oberfläche unterscheiden und diese somit durch Coulomb-Wechselwirkungen immobilisiert werden. Eine solche Immobilisierung geprägter Polymerpartikel bietet gegenüber anderen Immobilisierungsmethoden mehrere Vorteile. So ist diese Methode mit einem geringen präparativen Aufwand verbunden, sie ist schnell und liefert hierbei eine relativ hohe Belegung der Oberfläche. Da für die meisten geprägten Polymere Methacrylsäure als funktionelles Monomer verwendet wird [4], lässt sich diese Methode somit auch leicht auf andere geprägte Polymere übertragen.

Bei dieser Methode wird die partiell negative Ladung der Polymerpartikel zur Anbindung genutzt. Über eine Funktionalisierung von Oberflächen mit Aminofunktionen kann diese als Protonenakzeptor für die in den Polymerpartikeln als funktionelles Monomer verwendete Methacrylsäure dienen. Durch die Protonierung der Oberfläche wird diese positiv aufgeladen, auf den Partikeln verbleibt die entsprechende negative Ladung. Durch das daraus resultierende elektrostatische Potential kommt es zu einer stabilen Adsorption der Partikel auf aminofunktionalisierten Oberflächen.

Bei der Entwicklung markierungsfreier Detektionsmethoden ist eine Verminderung/Vermeidung unspezifischer Adsorption von Matrixbestandteilen an die Sensoroberfläche häufig ein essentieller Bestandteil. Um nur eine geringe unspezifische Adsorption eventueller Matrixbestandteile an die Sensoroberfläche zu erhalten, werden daher oftmals Polymere wie PEG oder AMD als Basisschicht zur weiteren Oberflächenfunktionalisierung verwendet. Im Folgenden wurden daher drei unterschiedliche Systeme zur elektrostatischen Anbindung der Partikel näher untersucht:

- Anbindung auf Aminopropylsilan (APTES)
- Anbindung auf Diaminopeg (DA-PEG)
- Anbindung auf Aminodextran (AMD)

Es ist davon auszugehen, dass die Dichte an Aminofunktionen bei den Polymerschichten DA-PEG und AMD gegenüber APTES-Oberflächen reduziert sind. APTES bildet Multilagennetze aus [72], wodurch eine hohe dreidimensionale Dichte an Aminofunktionen resultiert. Die DA-PEG

Ergebnisse und Diskussion

Moleküle bilden eine gleichmäßige, ebene Schicht aus, wodurch die Aminofunktionen nur direkt an der Oberfläche vorhanden sind. Auf der Oberfläche immobilisiertes AMD hingegen führt zu einer knäuelartigen Struktur mit einer dreidimensionalen Verteilung der Aminofunktionen. Man hat also auch hier eine dreidimensionale Verteilung von Aminofunktionen, im direkten Vergleich zu APTES hat man jedoch eine geringere räumliche Dichte an Aminofunktionen.

Um die Oberflächenbelegung bei den unterschiedlichen Ansätzen bewerten zu können, wurden die Oberflächen mittels AFM und REM untersucht. Wie die Aufnahmen in Abbildung 16 zeigen, wurde bei allen Ansätzen eine dichte Belegung der Oberfläche mit nanoMIPs erhalten.

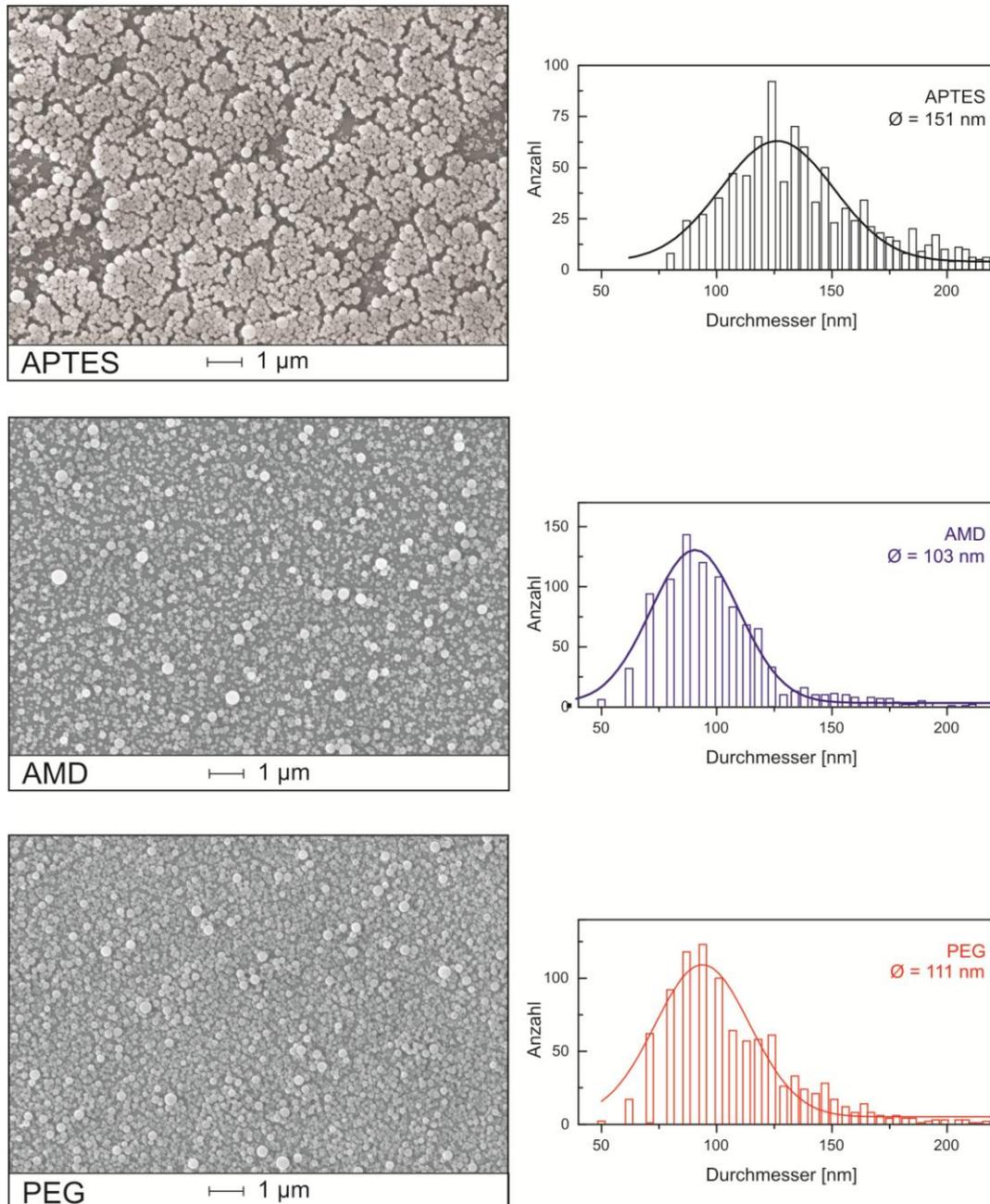


Abbildung 16: REM Aufnahmen von mit nanoMIPs belegten Oberflächen (oben APTES, mittig AMD, unten DA-PEG) und deren Größenverteilung. Als Stichprobengröße wurden jeweils 1000 Partikel ausgewertet.

Die AMD-Oberfläche weist im direkten Vergleich die geringste Oberflächenbelegung auf. Zudem ist die Partikelgröße der adsorbierten Partikel von allen drei untersuchten Oberflächen am geringsten. Bei PEG-Oberflächen ist eine geschlossene Monolage erkennbar, auf der sich vereinzelt weitere Partikel befinden. APTES-Oberflächen zeigen die höchste Oberflächenbelegung. Hierbei kommt es zur Multilagenadsorption mit einer dicht gepackten obersten Schicht. Die Größe der adsorbierten Partikel wird hierbei vermutlich durch die Raumladungsdichte der Schicht, auf der die Partikel angebunden werden, verursacht.

Um ein detaillierteres Bild der Oberflächen zu erhalten, wurden AFM-Aufnahmen angefertigt (siehe Abbildung 17). Bereits die visuelle Betrachtung der AFM-Aufnahmen liefert Hinweise auf eine unterschiedliche Charakteristik der Oberflächen.

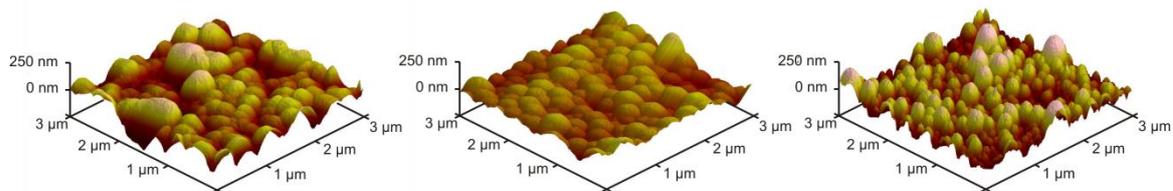


Abbildung 17: AFM-Aufnahmen von Glastransducern, die mit L-BFA nanoMIPs modifiziert sind. Links: Anbindung der nanoMIPs auf APTES. Mitte: Anbindung der nanoMIPs auf AMD. Rechts: Anbindung der nanoMIPs auf DA-PEG.

Eine detailliertere Auswertung der Oberflächenrauigkeit (siehe Tabelle 5) zeigt hierbei, dass diese in der Reihe AMD < APTES < DA-PEG zunimmt. AMD-Oberflächen zeigen im Vergleich die kleinste Rauigkeit. Wie auch auf den REM-Aufnahmen zu erkennen, hat man hier eine bevorzugte Adsorption kleinerer Partikel, bei einer nicht vollständigen Bedeckung der Oberfläche. Da AMD ein flexibles Hydrogel ist, können die Partikel auch teilweise in das Polymer einsinken. Beide Effekte zusammengenommen erklären die im Vergleich zu PEG und APTES geringe Oberflächenrauigkeit. Bei APTES-Oberflächen wird eine sehr dichte Multilagenadsorption erhalten, bei PEG-Oberflächen sind nur an manchen Stellen mehrere Partikel übereinander adsorbiert, was zu der höheren Oberflächenrauigkeit der DA-PEG-Oberflächen führt.

Tabelle 5: Oberflächenrauigkeit (RMS-Wert und arithmetisches Mittel) von verschiedenen nanoMIP Oberflächen.

Wert /Oberfläche	AMD	APTES	DA-PEG
RMS-Wert [nm]	39,6	54,0	66,1
Arithmet. Mittel [nm]	32,0	42,1	52,6

Wenn allein die Anzahl der adsorbierten Partikel entscheidend ist, eignen sich APTES-Oberflächen am besten zur elektrostatischen Anbindung der nanoMIPs. Für Sensoranwendungen, bei denen eine kleine Nachweisgrenze und hohe Signaldynamik angestrebt wird, ist demnach eine Immobilisierung auf APTES die beste Wahl. Ist hingegen eine dichte Belegung von möglichst einer Monolage erstrebenswert, so liefern hierbei DA-PEG-Oberflächen diesbezüglich die besseren Resultate. Eventuell kann dies von Belang sein bei Messungen in komplexen Matrices, um so unspezifische Adsorption an die Sensoroberfläche zu mindern.

4.1.1.1 RfS-Messungen mit elektrostatisch immobilisierten nanoMIPs

Unspezifische Wechselwirkung mit der Oberfläche

Zunächst wurden die drei verschiedenen Oberflächen ohne nanoMIPs auf ihre Wechselwirkung mit dem Templatmolekül untersucht. Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, nimmt die unspezifische Wechselwirkung in der Reihenfolge APTES < DA-PEG < AMD zu. Die starke Wechselwirkung mit AMD lässt sich durch eine Sorption von L-BFA in das Polymer AMD erklären. Auch bei PEG kommt es vermutlich zu einer geringfügigen Sorption ins Polymer. Bei APTES handelt es sich um ein Silan mit einer dichten Packung, eine Einlagerung des Analyten in diese Schicht ist nicht möglich. Für die reine Messung der Wechselwirkung von nanoMIPs mit dem Templatmolekül ist demnach diese Oberflächenmodifikation am ehesten geeignet. Allerdings ist es sinnvoll auch die beiden weiteren Oberflächenmodifikationen näher zu untersuchen, da sich diese bei Messungen in komplexen Matrices als sehr geeignet zur Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen erwiesen haben.

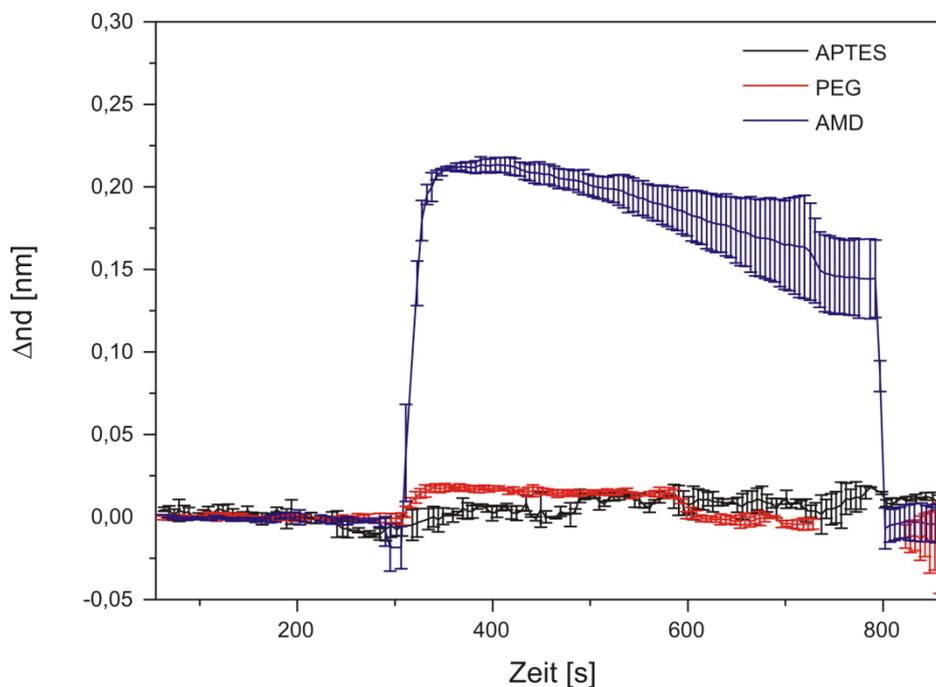


Abbildung 18: Unspezifische Wechselwirkung von APTES, DA-PEG und AMD-Oberflächen mit L-BFA. Messung in 50 % Methanol bei einer Konzentration von 2 mM L-BFA.

Charakteristik der Bindungskurven

Bei Betrachtung der Bindungskurven gibt es diverse Abweichungen von der für gewöhnlich bei Antigen-Antikörper Wechselwirkungen erhaltenen Bindungskurven, wie sie auch im theoretischen Teil dieser Arbeit abgehandelt wurden. So werden bei der Auswertung mittels IFZ prinzipiell negative Bindungssignale erhalten. Zudem kann es sein, dass bei einer ungünstigen Kombination aus Brechungsindex des Puffersystems sowie einer recht dicht belegten Oberfläche während des Anbindevorgangs ein Maximum durchlaufen wird. Dies tritt hierbei bei ca. 20-30 % aller präparierten Transducer auf. Die Ursache für diesen Effekt liegt allerdings nicht an einem Abdiffundieren der Substanz bzw. an einer unsauber eingestellten Fluidik, sondern sie ist den optischen Eigenschaften des Schichtaufbaus zuzurechnen. Betrachtet man die $1-\lambda$ -Auswertung

derselben Bindungskurve so zeigt sich, dass ein streng monoton steigendes Bindungssignal erhalten wird, wie es klassischerweise zu erwarten ist (siehe Abbildung 19 rechts).

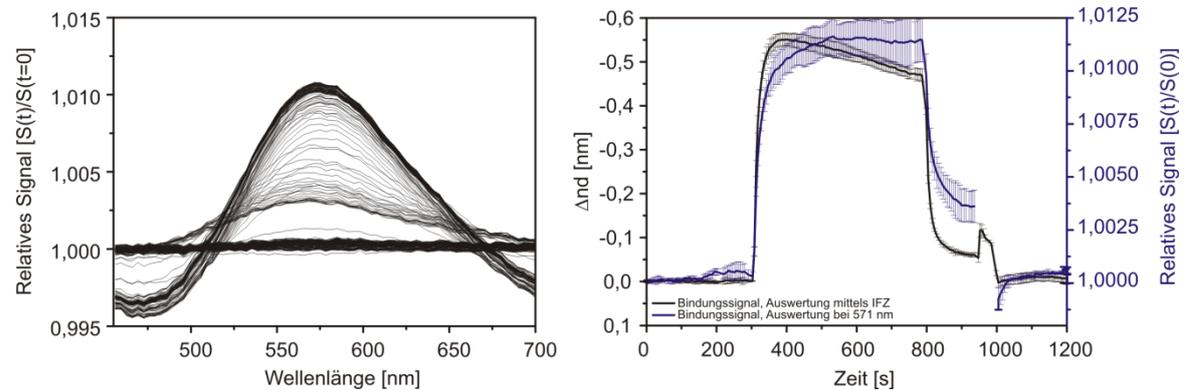


Abbildung 19: Links: Auf das erste Spektrum referenzierte Reflektionsspektren einer Messung der Wechselwirkung zwischen einer APTES MIP modifizierten Oberfläche mit L-BFA. Rechts: Bindungssignal der Anbindung von L-BFA an eine APTES MIP modifizierte Oberfläche. Schwarz: Spektrale Auswertung mittels IFZ; Blau: 1- λ -Auswertung bei 571 nm.

Wie in Abbildung 19 zu sehen ist unterscheidet sich die Form der Bindungskurven bei spektraler bzw. 1- λ -Auswertung recht stark. Eine Auswertung, welche die Krümmung der Bindungskurve mit einbezieht, kann somit nicht für Bindungskurven, die ein Maximum durchlaufen, durchgeführt werden. Die in Kapitel 4.2.3 dargestellten kinetischen Auswertungen wurden daher für Transducer, bei denen die im IFZ dargestellten Bindungskurven ein deutlich ausgeprägtes Maximum durchliefen, bei einer Wellenlänge durchgeführt. Im Konkreten war dies nur bei der dort dargestellten Messreihe in 30 % Methanol der Fall. Bei alleiniger Betrachtung der Kurvenmaxima als Auswerteparameter hingegen erhält man, bis auf die Größenordnung, keinen unterschiedlichen Verlauf der Kalibrierkurven beim Vergleich von spektraler Auswertung mittels IFZ und einer 1- λ -Auswertung (siehe Abbildung 20). Somit kann gefolgert werden, dass das Kurvenmaximum dem Gleichgewichtssignal entspricht und durch Auswertung dieses Parameters ebenfalls eine Bestimmung der Gleichgewichtskonstante möglich ist.

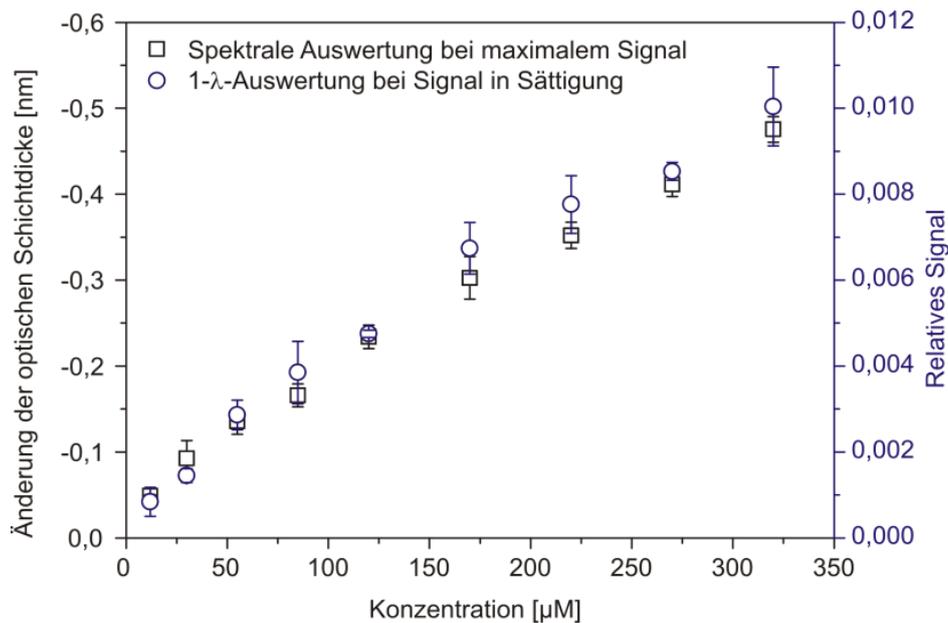


Abbildung 20: Kalibrierkurven bei spektraler Auswertung sowie bei 1- λ -Auswertung der Messkurven. Für die spektrale Auswertung wurde jeweils das Maximum der Kurve verwendet (siehe Abbildung 19, bei $t=390$ s), bei der 1- λ -Auswertung die Gleichgewichtsbeladung bei $t=650$ s verwendet.

Die auf einer Auswertung der Gleichgewichtsanzbindung beruhende Scatchard Analyse liefert hierbei analog für beide Auswertungen ebenfalls Werte in derselben Größenordnung, so dass beide Verfahren zur Auswertung der Messdaten gleichermaßen verwendet werden können.

4.1.1.2 Vergleich verschiedener Oberflächenmodifikationen

Mit allen drei Oberflächenmodifikationen, die als Basis zur Immobilisierung von nanoMIPs verwendet wurden, konnte eine Anbindung von L-BFA an die nanoMIPs mittels RfS beobachtet werden. Es unterscheidet sich hierbei bei den verschiedenen Oberflächen lediglich die Signalhöhe, die Signalform ist weitestgehend gleich. Die entsprechenden Kalibrierkurven (jeweils mit geprägten und mit nicht geprägten Partikeln) sind in Abbildung 21 dargestellt. Die einzelnen Messpunkte in Abbildung 21 stellen jeweils den Mittelwert des Signals in der Sättigung von Dreifachmessungen dar. Für AMD sind nur die Ergebnisse von Einfachmessungen dargestellt, da die Oberfläche nicht die notwendige Stabilität aufwies und nach ca. 20 Messungen abnehmende Signale zeigte.

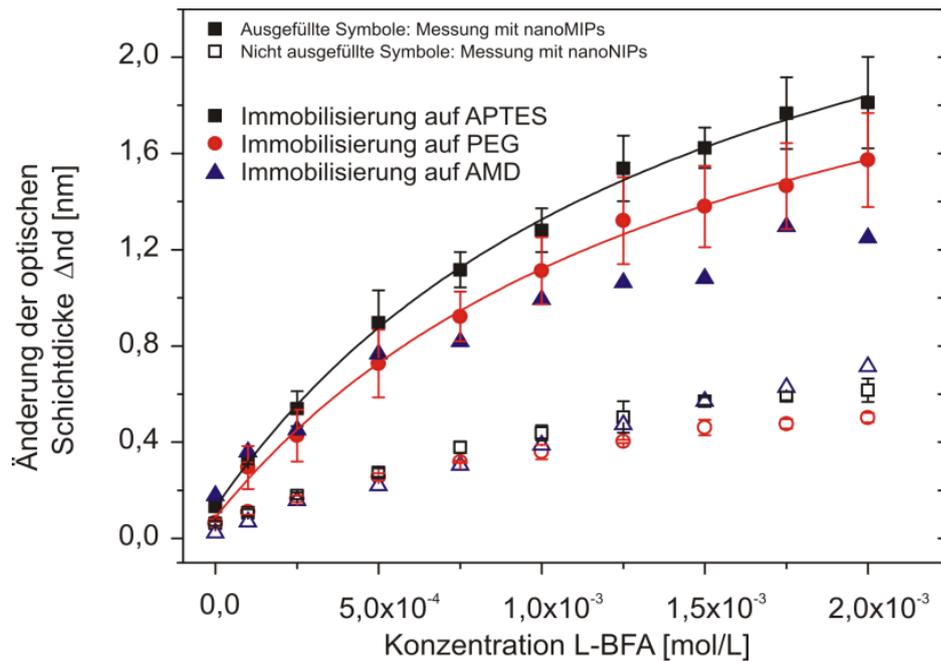


Abbildung 21: Kalibrierkurven der Wechselwirkung von nanoMIPs bzw. nanoNIPs mit L-BFA. Ausgefüllte Symbole: Messungen mit nanoMIPs. Nicht ausgefüllte Symbole: Messungen mit nanoNIPs. Schwarze Quadrate: Immobilisierung auf APTES. Rote Kreise: Immobilisierung auf PEG, Blaue Dreiecke: Immobilisierung auf AMD. Dargestellt ist jeweils die Änderung der optischen Schichtdicke, resultierend aus Dreifachmessungen für PEG und APTES.

Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, erhält man bei der Verwendung von APTES modifizierten Oberflächen zur Immobilisierung die höchsten Signale für die Wechselwirkung mit dem MIP, gefolgt von PEG und AMD. Auffällig ist, dass es sich für das NIP leicht anders verhält. Hier zeigen sich bei der Verwendung von AMD-Oberflächen zur Immobilisierung höhere Signale als bei der Verwendung von PEG oder APTES. Vermutlich ist für letzteres die unspezifische Wechselwirkung von AMD-Oberflächen mit dem Templatmolekül ausschlaggebend, die bei den geringen Signalhöhen einen deutlich höheren relativen Anteil am Gesamtsignal hat, als dass es für das geprägte Polymer der Fall ist.

Die erzielten Signalhöhen bei den RfS-Messungen korrelieren somit sehr gut mit den jeweiligen Belegungen der Oberflächen. PEG und APTES sind somit geeignet, um die Wechselwirkung zwischen nanoMIPs und dem Templatmolekül mittels RfS zu untersuchen. Auf AMD-Oberflächen sind die Partikel zu schwach angebunden, so dass diese mit der Zeit im Fluss abgelöst werden, was zu abnehmenden Signalen führt.

4.1.1.3 Chip zu Chip Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der elektrostatischen Immobilisierung zu untersuchen, wurden für jedes der Systeme (AMD, PEG und APTES) jeweils drei Transducer mit nanoMIPs beschichtet und untersucht. Hierbei wurden auf jedem Transducer bei drei Konzentrationen (0,5 mM, 1,0 mM und 1,5 mM) jeweils drei Messungen durchgeführt und für die jeweilige Konzentration der Mittelwert gebildet. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Absolutwerte mitsamt den Fehlern in Abbildung 22 auf das jeweilige Signal bei 1,5 mM L-BFA normiert.

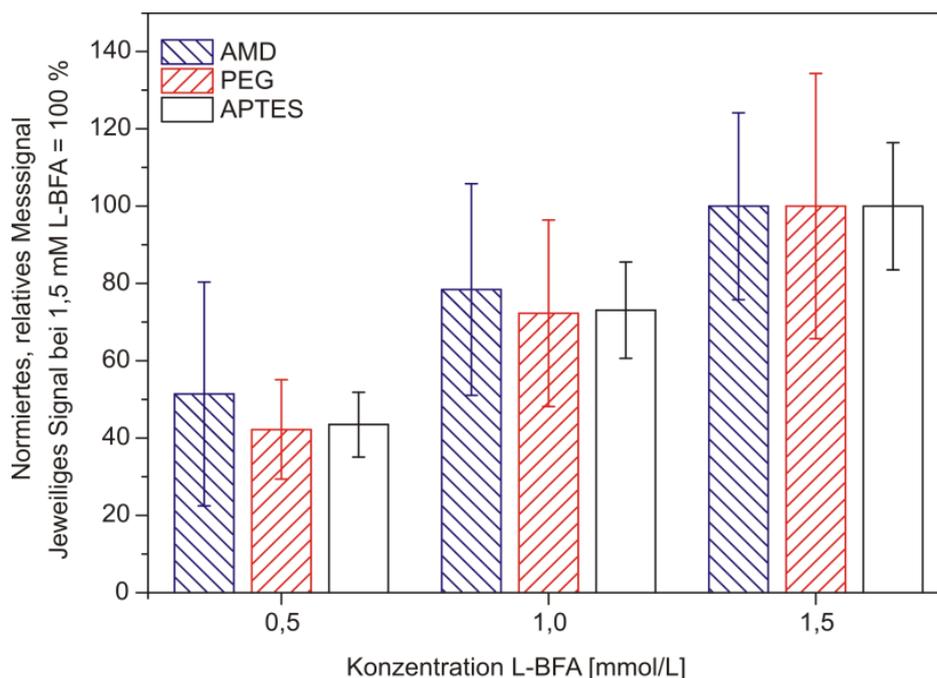


Abbildung 22: Chip zu Chip Reproduzierbarkeit bei elektrostatischer Immobilisierung von nanoMIPs. Die Abbildung zeigt den Mittelwert jeweils von Dreifachmessungen auf drei verschiedenen Transducern mit relativer Standardabweichung. Die Werte wurden jeweils auf den Wert bei 1,5 mM L-BFA normiert.

Wie zu erkennen ist, zeigen APTES-Oberflächen als Grundlage zur Immobilisierung von nanoMIPs die höchste Reproduzierbarkeit, AMD-Oberflächen hingegen die geringste Reproduzierbarkeit. Als Zahlenmaß für die Chip zu Chip Reproduzierbarkeit kann die jeweilige relative Standardabweichung herangezogen werden (siehe Tabelle 6). Die starke Abnahme der relativen Standardabweichung für AMD-Oberflächen bei größer werdenden Konzentrationen kommt durch relativ kleine Messsignale (und dem damit verbundenen hohen relativen Fehler) bei geringen Konzentrationen zustande.

Tabelle 6: Relative Standardabweichungen des Messsignals jeweils von Dreifachmessungen auf drei unterschiedlichen Transducern bei verschiedenen Konzentrationen.

<i>Relative Standardabweichung bei jeweiliger Konzentration /Oberfläche</i>	<i>AMD</i>	<i>DA-PEG</i>	<i>APTES</i>
0,5 mM	56,4	30,5	19,3
1,0 mM	34,9	33,4	17,0
1,5 mM	24,2	34,3	16,4
Mittelwert	39±16,4	33±2,0	18±1,5

Aufgrund der vergleichsweise hohen Chip zu Chip Reproduzierbarkeit von ungefähr 18 %, wurde als Oberflächenmodifikation zur elektrostatischen Immobilisierung für weitergehende Untersuchungen APTES ausgewählt.

4.1.1.4 Bewertung analytischer Rahmenparameter der MIPs

Die vollständige Charakterisierung der nanoMIPs als Erkennungselement in optischen Sensoren beinhaltet ebenso eine Bewertung ihrer analytischen Leistungsfähigkeit. Insbesondere ist hierbei

von Interesse, bis zu welcher Konzentration sich Analyten mit dieser Technik nachweisen lassen. Wie in den späteren Kapiteln gezeigt wird, hängt die Gleichgewichtskonstante der Templat-MIP Wechselwirkung hierbei sehr stark vom verwendeten Solvens ab und folglich auch die resultierenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Da zudem die Löslichkeit des Templatmoleküls ebenfalls stark lösemittelabhängig ist, mussten die Kalibrierungen jeweils in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen durchgeführt werden. Zur Bestimmung des Signals wurde der Mittelwert im Kurvenmaximum aus jeweils 3 Messungen gebildet. Der Nullwert wurde am selben Ablesepunkt ebenfalls aus einer Dreifachmessung ermittelt.

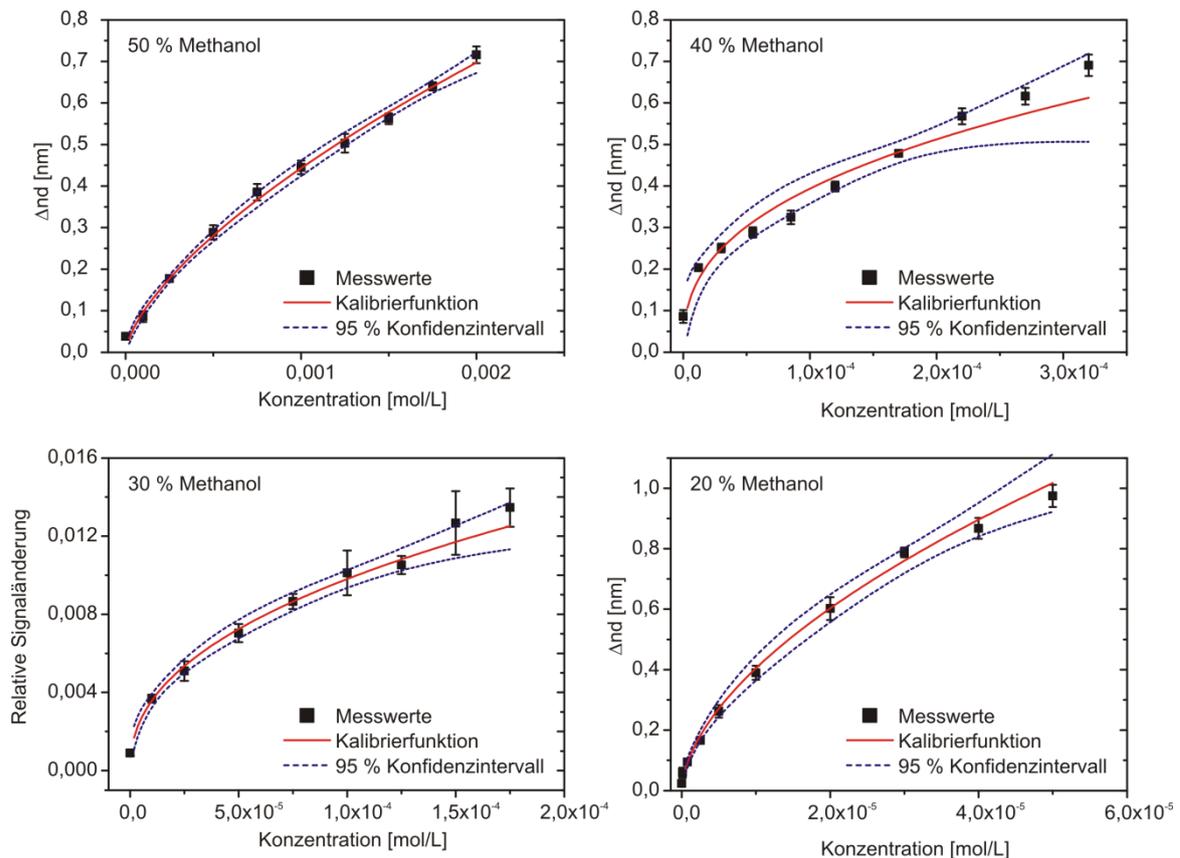


Abbildung 23: Kalibrierkurven der Messung von L-BFA mit nanoMIPs als Erkennungselement bei verschiedenen Zusammensetzungen des Solvens.

Als Fitfunktion wurde hierbei, eine Langmuir-Freundlich Adsorptionsisotherme (Gl. 3.4.3) gewählt, da diese die bei der Wechselwirkung zwischen MIP und Templatmolekül ablaufenden Prozesse am generellsten beschreibt und somit auch eine physikalisch sinnvolle Fitfunktion darstellt (siehe Kapitel 3.4.5). Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, erhält man bei der Wahl dieser Funktion allerdings bei der Messung in 40 % Methanol erhebliche Abweichungen vom tatsächlichen Kurvenverlauf. Für kleine Konzentrationen sind die Abweichungen allerdings gering, so dass die Funktion dennoch zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze herangezogen werden konnte. Für eine Beschreibung des gesamten Konzentrationsbereiches ist für diese Messreihe allerdings wohl eine abschnittsweise definierte Funktion besser geeignet.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Messung von L-BFA mit nanoMIPs in Lösemittelgemischen unterschiedlicher Zusammensetzung.

	Nachweisgrenze		Bestimmungsgrenze	
	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{mol/L}$	$\mu\text{g/L}$
50 % Methanol	37	13000	70	24000
40 % Methanol	5,7	1900	27	9200
30 % Methanol	1	340	37	13000
20 % Methanol	0,09	30	0,17	60

Die besseren Nachweisgrenzen bei kleinerem Methanolgehalt sind den höheren Gleichgewichtskonstanten in diesem Lösemittel zuzurechnen. Jedoch ist zu beachten, dass (wie in Kapitel 4.2.2 gezeigt wird) sich die Gleichgewichtskonstanten von MIP und NIP bei steigendem Wassergehalt immer mehr annähern und so eine Reduktion der Spezifität der Bindung resultiert. Abseits davon ist eine Nachweisgrenze von 30 $\mu\text{g/L}$ mit einer markierungsfreien Detektionstechnik für ein Molekül mit einer molaren Masse von ca. 340 g/mol sehr gut. Von daher ist die prinzipielle Eignung der Kombination von nanoMIPs und RIFS zum markierungsfreien Nachweis von kleinen Molekülen in geringen Konzentrationen erbracht.

4.1.1.5 Stabilität der Oberflächen

Im Gegensatz zu biologischen Erkennungselementen besitzen molekular geprägte Polymere eine sehr hohe Stabilität, wie bereits in der Einleitung dargelegt. Um zu überprüfen, ob diese Stabilität auch bei der Verwendung als Erkennungselement in optischen Sensoren gegeben ist, wurden die sensitiven Schichten hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität, Temperaturstabilität sowie der Stabilität gegenüber Variation des pH-Wertes hin getestet. Wie im vorhergehenden Abschnitt bereits gezeigt wurde, erhält man bei der Verwendung von APTES zur Immobilisierung der Partikel die höchste Chip zu Chip Reproduzierbarkeit, weshalb diese Oberflächenmodifikation für die im Folgenden dargestellten Experimente verwendet wird. Hierbei liegt der Fokus alleinig auf der Untersuchung der Schichtstabilität, weshalb die Experimente lediglich mit MIP funktionalisierten Oberflächen durchgeführt wurden.

Langzeitstabilität

Die APTES-MIP modifizierten Transducer wurden über den Versuchszeitraum hinweg in einem Exsikkator bei Raumtemperatur unter einer Stickstoffatmosphäre gelagert, um einer eventuellen Veränderung der Silanschicht (Hydrolyse) vorzubeugen. Es wurde für das Experiment nach ca. einer Woche, einem halben Jahr und einem Jahr Lagerung jeweils das Signal bei einer Messung mit 1 mM L-BFA in 50 % Methanol bestimmt (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Messsignal von APTES MIP modifizierten Transducern bei Messung mit 1 mM L-BFA in 50 % Methanol nach unterschiedlicher Lagerungsdauer.

Lagerungsdauer vor der Messung [Tage]	Messsignal [nm]
8	1,19 \pm 0,05
174	0,76 \pm 0,03
364	0,98 \pm 0,17

Wie aus Tabelle 8 ersichtlich wird, erhält man nach längerer Lagerungsdauer zwar leicht geringere Signale, allerdings liegen diese nur knapp außerhalb des Bereiches der Chip zu Chip Reproduzierbarkeit. Dies bedeutet, dass APTES MIP Schichten bei Lagerung unter einer Stickstoffatmosphäre über ein Jahr hinweg stabil sind.

Stabilität bei verschiedenen pH-Werten

Zur Untersuchung der Stabilität bei verschiedenen pH-Werten wurden jeweils Messungen mit einer Konzentration von 1 mM L-BFA in 50 % Methanol durchgeführt. Da der pH-Wert in nicht wässrigen Systemen nicht definiert ist, wurde der pH-Wert des wässrigen Anteils wie gewünscht mit NaOH bzw. HCl eingestellt und anschließend mit demselben Volumen an Methanol aufgefüllt. Die Messungen wurden hierbei zunächst von niedrigem pH-Wert hin zu hohem pH-Wert durchgeführt, anschließend wurden sämtliche Messungen in der umgekehrten Reihenfolge wiederholt.

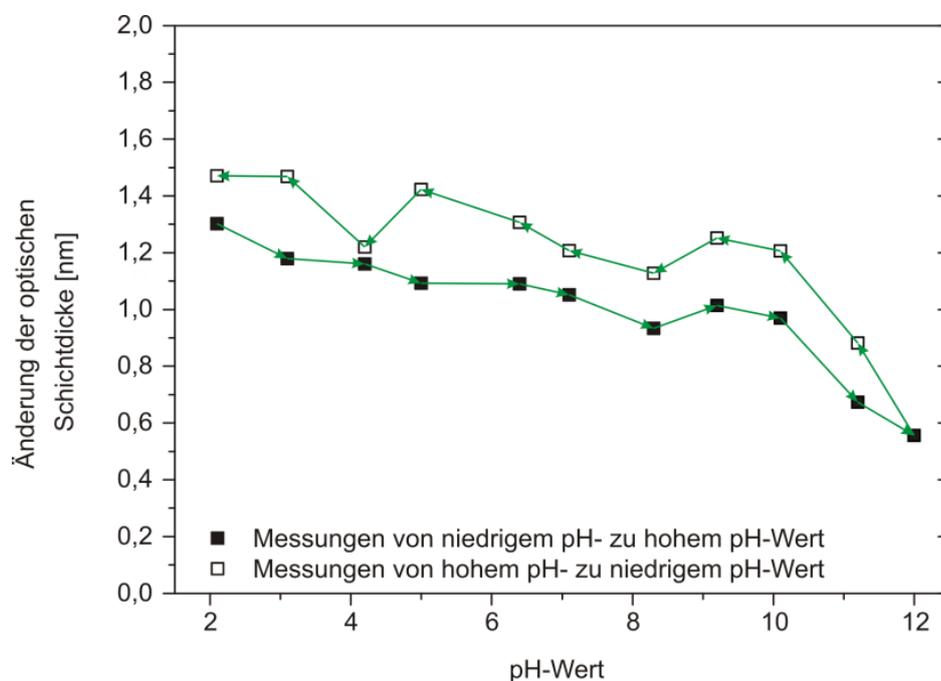


Abbildung 24: Abhängigkeit des Messsignals (Messungen in jeweils 50 % Methanol-Wasser Gemischen mit 1 mM L-BFA) vom pH-Wert. Die Pfeile stellen hierbei die Reihenfolge der Messungen dar.

Wie die in Abbildung 24 dargestellten Messungen zeigen, erhält man bei niedrigem pH-Wert leicht höhere Signale als im neutralen Bereich. Bei hohen pH-Werten ab pH 11 erhält man einen deutlichen Rückgang des Signals. Bei erneuter Reduktion des pH-Wertes werden systematisch höhere Werte erhalten als beim ersten Messzyklus.

Aus den Messungen lässt sich somit folgern, dass die elektrostatische Anbindung der Partikel in einem sehr breiten pH-Bereich stabil ist und MIPs als Erkennungselement ebenfalls in einem breiten pH-Bereich einsetzbar sind. Die höheren Signale bei niederem pH-Wert verhalten sich analog der in Kapitel 4.2 diskutierten Lösemittelabhängigkeit, die auch eine verstärkte Anbindung ins Polymer bei einem hohen Wassergehalt aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass für die Steigerung der Signalintensität die mit dem sinkenden pH-Wert ebenfalls zunehmende Ausbildung von Wasserstoffbrücken verantwortlich ist.

Ergebnisse und Diskussion

Der zweite Messzyklus (von hohem pH-Wert hin zu niederem pH-Wert) wurde nicht am selben Tag gemessen wie der erste, was somit die prinzipiell höheren Messsignale beim zweiten Messzyklus erklären könnte. Die letzte Messung im ersten Messzyklus wurde bei niedrigem pH-Wert durchgeführt. Verbleibt ein Rest dieses Solvens über Nacht in der Flusszelle, kommt es zu einer langsamen Quellung des Polymers, da sich die bei diesem pH-Wert deprotonierten und somit negativ geladenen Säurefunktionen des funktionellen Monomers abstoßen. Am nächsten Tag ist demnach die Porosität leicht erhöht und es sind mehr Bindungsstellen zugänglich, was die höheren Signale erklärt. Es ist allerdings nicht restlos auszuschließen, dass auch durch die Messapparatur bedingte Schwankungen hierfür verantwortlich sind.

Temperaturstabilität

Zur Evaluierung der Temperaturstabilität wurde der gesamte Messaufbau in einem temperierbaren Schrank aufgebaut. Allerdings wurden die Messungen hierfür mittels einer Peristaltikpumpe durchgeführt, da der zulässige Temperaturbereich, in dem der Hersteller für die Funktionsfähigkeit und Präzision der Spritzenpumpe garantiert, auf 40 °C limitiert war. Die Messungen bei höheren Temperaturen waren generell mit sehr vielen Widrigkeiten verbunden. Der Dampfdruck des Methanol / Wasser Gemisches ist bei über 40 °C sehr hoch, so dass es vermehrt zur Bildung von Dampfblasen innerhalb des fluidischen Systems kommt. Aufgrund dieser Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung wurden zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit bei verschiedenen Temperaturen nur Einfachmessungen durchgeführt.

In Abbildung 25 sind Messreihen bei verschiedenen Temperaturen zu sehen, sowie die dazugehörige Linearisierung nach Scatchard zur Bestimmung der Affinitätskonstanten. Die Messreihen wurden auf demselben Transducer aufgenommen, wobei zuerst die Messungen bei 22 °C, anschließend die Messungen bei 60 °C durchgeführt wurden.

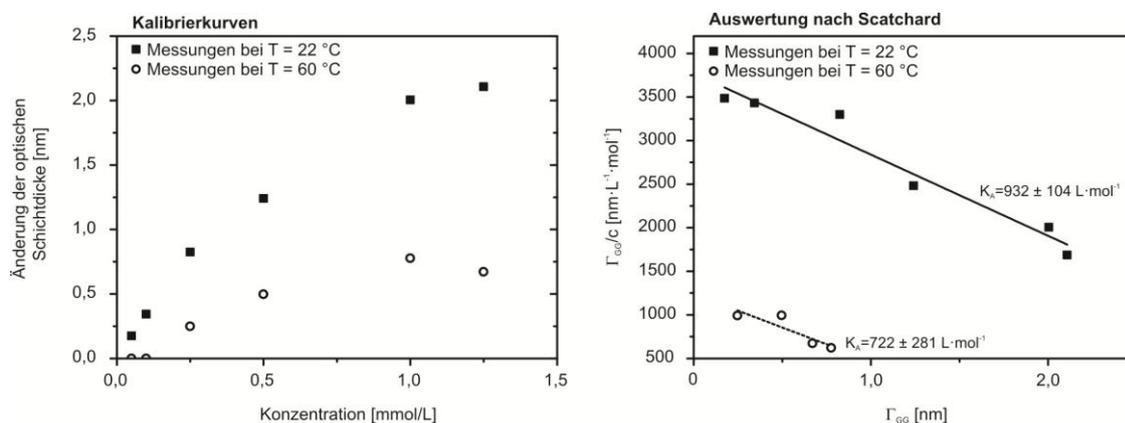


Abbildung 25: Messung der Anbindung von L-BFA an APTES MIP modifizierte Transducer bei verschiedenen Temperaturen.

Hierbei ist zu sehen, dass eine Messung auch bei höheren Temperaturen möglich ist und man konzentrationsabhängige Signale erhalten kann. Diese sind jedoch deutlich niedriger als bei Raumtemperatur. Ursächlich hierfür ist einerseits die geringfügig kleinere Affinität von L-BFA zu den MIPs bei höheren Temperaturen. Des Weiteren spielt allerdings auch der Umstand eine Rolle, dass das Messsignal in der RfS, das bei der Anbindung von L-BFA an die MIPs verursacht wird, hauptsächlich durch Änderungen im Brechungsindex resultiert. Der hohe

Quervernetzeranteil in den Polymerpartikeln führt nur zu einer relativ geringen Quellung bei der Anbindung des Analyten. Da der Brechungsindex mit steigender Temperatur fällt, wird somit auch das in der RfS erhaltene Signal kleiner. Jedoch ist es auch möglich, dass es durch die höhere Temperatur schlichtweg zu einer Ablösung der nanoMIPs von der Sensoroberfläche kommt, was die kleineren Signale bei höherer Temperatur erklärt.

Daher wurde die Stabilität der sensitiven Schicht bei höheren Temperaturen genauer untersucht. Hierzu wurden jeweils Dreifachmessungen mit 1,5 mM L-BFA bei sukzessiv höheren Temperaturen durchgeführt. Nach den Messungen bei 50 °C wurde wieder auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut bei 20 °C gemessen. Anschließend wurde der Transducer mittels AFM untersucht.

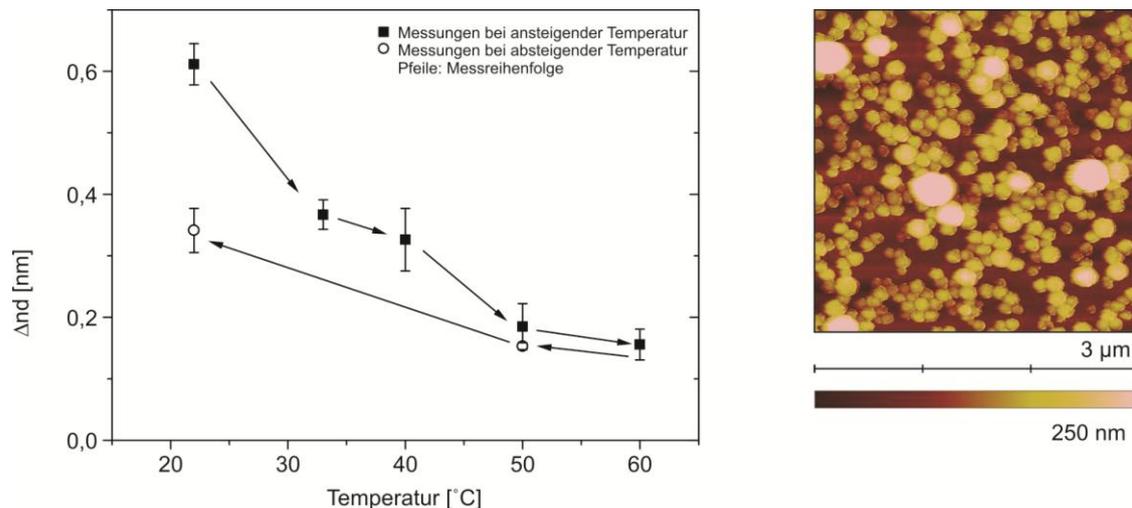


Abbildung 26: Links: RfS-Messungen mit APTES-MIP modifizierten Transducern bei verschiedenen Temperaturen. Alle Messungen wurden mit 1,5 mM L-BFA durchgeführt. Rechts: AFM-Aufnahme der Sensoroberfläche nach Abschluss der temperaturabhängigen Messreihe.

Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, erhält man nach Wiederabkühlen auf Raumtemperatur nicht wieder das ursprüngliche Signal. Zudem zeigt die in Abbildung 26 dargestellte Untersuchung mittels AFM, dass die Oberflächenbelegung mit nanoMIPs nach der Messung geringer ist, als dass sie üblicherweise bei der elektrostatischen Immobilisierung auf APTES erzielt wurde (zum Vergleich siehe Abbildung 17). Zur Verringerung der Signalintensität bei höherer Temperatur trägt demnach nicht nur die Verringerung der Affinitätskonstante, sondern auch eine Reduktion der angebondenen Erkennungselemente bei.

4.1.1.6 Kurzzusammenfassung Kapitel 4.1.1

- Eine elektrostatische Immobilisierung der nanoMIPs ist gut möglich, wobei die dichteste Belegung der Oberfläche bei einer Anbindung auf APTES erzielt wird.
- Die unspezifische Wechselwirkung mit dem Analyten ist für APTES und DA-PEG recht gering, AMD zeigt eine signifikante unspezifische Wechselwirkung.
- Konzentrationsabhängige RfS-Messungen mit nanoMIPs als Erkennungsstruktur sind gut möglich, eine Immobilisierung auf APTES liefert die höchsten Signalintensitäten.
- Die Chip-zu-Chip Reproduzierbarkeit ist bei einer Immobilisierung auf APTES am größten (ca. 18 % relative Standardabweichung).

- RfS-Messungen mit auf APTES immobilisierten nanoMIPs zeigen die höchsten Signale.
- Mit nanoMIPs modifizierte APTES Transducer sind über ein Jahr lagerbar und zeigen dabei keine signifikante Signalreduktion.
- Das Bindungssignal und damit ebenso die Nachweis- und Quantifizierungsgrenze der nanoMIPs ist stark lösemittelabhängig; die kleinste erreichte Nachweisgrenze lag bei 30 mg/L.
- NanoMIPs als Erkennungselement sind in einem breiten pH-Bereich (pH 2 bis pH 10) einsetzbar.
- NanoMIPs erlauben auch eine Detektion bei einer Temperatur von 60°C, jedoch sind die Affinität sowie die Signalhöhe deutlich geringer als bei Raumtemperatur. Die elektrostatische Immobilisierung ist nicht stark genug, um eine Ablösung der Partikel bei höherer Temperatur zu verhindern.

Eine elektrostatische Immobilisierung der Partikel auf APTES ist aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit und Robustheit sowie der erzielten hohen Signalintensitäten eine gute Wahl für weitergehende Untersuchungen der Erkennungselemente.

4.1.2 Kovalente Immobilisierung von nanoMIPs

4.1.2.1 Möglichkeiten und Voruntersuchungen

Um für Sensoren mit nanoMIPs als Erkennungsstruktur auch eine Anwendung unter harschen Bedingungen zu ermöglichen, ist eine elektrostatische Immobilisierung der nanoMIPs nicht immer vollständig ausreichend, wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde. Um eine noch stabilere Anbindung der Partikel an die Oberfläche zu realisieren wurde daher untersucht, inwiefern sich eine kovalente Anbindung realisieren lässt. Ohne weitergehende Modifikation der Partikel können für eine kovalente Immobilisierung zwei unterschiedliche Angriffspunkte der Partikel verwendet werden:

- Immobilisierung über einen Angriff der Säurefunktionen der Polymerpartikel:
Eine Immobilisierung mittels Aktivesterchemie über die Säurefunktionen der Polymerpartikel an eine Oberfläche mit terminalen Aminofunktionen ist jedoch nicht zielführend und führt nur zu einer unzureichenden Oberflächenbelegung, wie bereits in vorhergehenden Arbeiten [74] aufgezeigt werden konnte.
- Immobilisierung über einen Angriff nicht abreagierter Doppelbindungen:
Da die Polymerisation nicht quantitativ abläuft, liegen nach Polymerisation noch immer ca. 16 % der ursprünglich vorhandenen Doppelbindungen im Polymer [36] vor. Über eine Thiol-En Reaktion können diese verwendet werden, um eine Immobilisierung auf einem Glassubstrat zu erreichen [73]. In gealterten Polymerpartikeln stehen diese allerdings nicht mehr der Reaktion zur Verfügung (Reaktion mit Luftsauerstoff, Umlagerung von Polymerketten), so dass auch diese Methode Nachteile aufweist.

Eine alternative Möglichkeit besteht darin Partikel zu verwenden, die über eine Modifikation mit einem entsprechenden Linker eine kovalente Immobilisierung ermöglichen. Konkret wurden hierfür Partikel verwendet, die über Azid bzw. Alkinfunktionen verfügen und somit durch eine Huisgenreaktion [75] an Oberflächen angebunden werden können. Die Modifikation der Partikel wurde von der Arbeitsgruppe Tovar etabliert [73], so dass im Folgenden nur auf die Eignung

dieser modifizierten Partikel zur Herstellung sensitiver Schichten für RfS-Messungen eingegangen wird.

Zur Anbindung der mit den Linkergruppen versehenen Partikeln werden jeweils die komplementären Funktionalitäten auf der Oberfläche benötigt. Hierfür wurden entsprechend modifizierte Azid- bzw. Alkin-PEGs verwendet, da hierfür etablierte und bewährte Konzepte der Oberflächenmodifikation nur geringfügig angepasst werden mussten. Auch Azid- und Alkin-PEGs wurden analog den in Abschnitt 4.1.1 dargestellten Experimenten auf unspezifische Wechselwirkung mit L-BFA untersucht, wobei auch diese PEGs ähnlich DA-PEG kaum eine unspezifische Wechselwirkung mit L-BFA zeigten (Daten nicht gezeigt).

4.1.2.2 Oberflächenbelegung und RfS-Messungen

Für die Anbindung der Partikel wurde die in Kapitel 3.5.8 beschriebene Methodik verwendet. Um sicherzugehen, dass tatsächlich eine kovalente Anbindung der Partikel vorliegt, wurde eine Anbindung der Partikel auch in Abwesenheit von Kupfer durchgeführt, welches als Katalysator für die Huisgenreaktion erforderlich ist. Hier zeigte sich bei der Untersuchung der Transducer mittels AFM, dass keine Partikel auf der Oberfläche angebunden waren (exemplarisch für den Versuch mit alkin-modifizierten MIPs ohne Katalysator in Abbildung 27 rechts dargestellt). Auch RfS-Messungen mit diesen Transducern zeigten dementsprechend kein Bindungssignal beim Überleiten von L-BFA. Ein weiteres eindeutiges Indiz, das auf das Vorliegen einer kovalenten Anbindung schließen lässt, sind die Ergebnisse von Experimenten zur Entfernung der Partikel nach Anbindung auf die Oberfläche des Transducers. So sind auf Transducern, auf denen MIPs elektrostatisch auf APTES aufgebracht wurden, nach Behandlung im Ultraschallbad bei AFM-Messungen keine MIPs mehr zu sehen (Daten nicht gezeigt). Bei einer Anbindung über die Huisgenreaktion ist nach Beschallung jedoch noch immer eine dichte Oberflächenbelegung erkennbar, wie in Abbildung 27 zu erkennen ist.

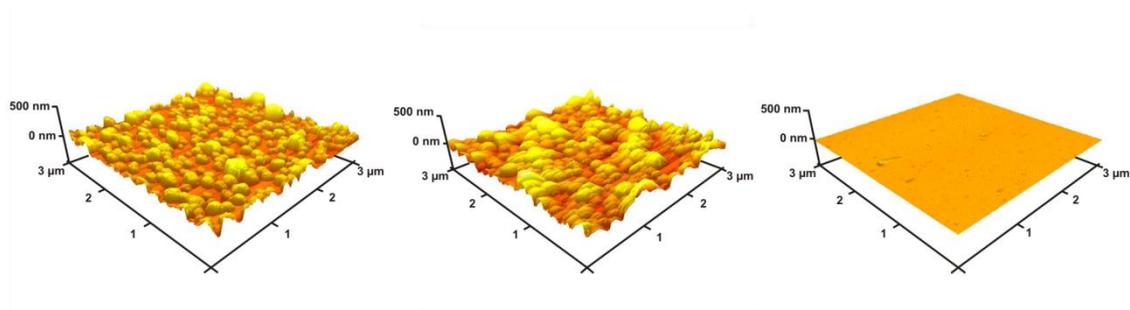


Abbildung 27: Links: Azid-PEG-Oberfläche mit kovalent angebundenen Alkin-modifizierten MIPs. Mitte: Alkin-PEG-Oberfläche mit kovalent angebundenen Azid-modifizierten MIPs; Rechts: Azid-PEG-Oberfläche nach Reaktion mit Alkin-modifizierten MIPs in Abwesenheit von Cu(I) als Katalysator.

Bei den AFM-Messungen ist zudem auffällig, dass die Oberflächenbelegung der Alkin-MIPs geringer ist als es für die Azid-MIPs der Fall ist. Diese geringere Oberflächenbelegung konnte auch beobachtet werden, ohne dass zuvor eine Behandlung der Oberflächen im Ultraschallbad erfolgte, was darauf schließen lässt, dass die Reaktivität der Alkin-MIPs bei der Immobilisierung auf Oberflächen geringer ist als für Azid-MIPs. Dies spiegelt sich ebenfalls in den bei RfS-Messungen erzielten Signalhöhen wider, die für Alkin-MIPs geringer sind als für Azid-MIPs (siehe

Abbildung 28). Für das Alkin-NIP konnte selbst bei den höchsten gemessenen Konzentrationen kein Signal detektiert werden, das sich signifikant vom Untergrund abhob.

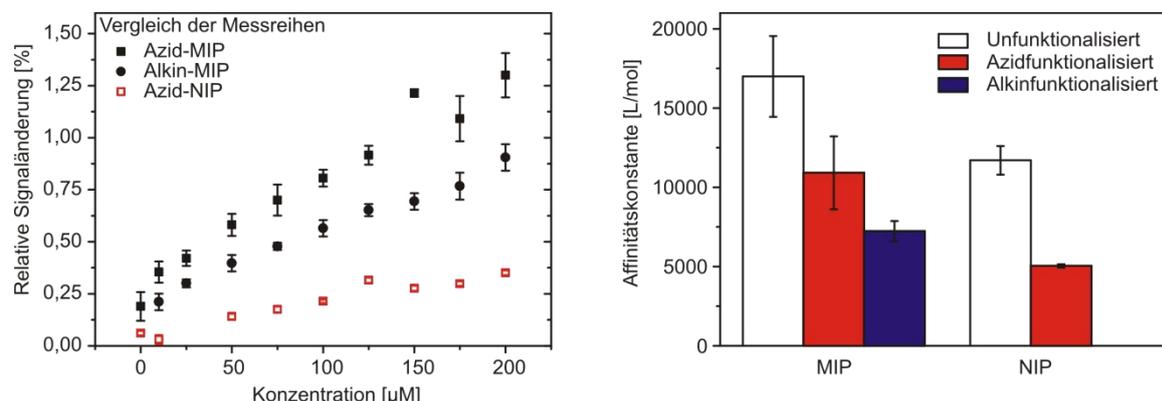


Abbildung 28: Konzentrationsabhängigkeit des Bindungssignals bei Alkin-MIPs, Azid-MIPs und Azid-NIPs. Die Messungen wurden bei einem Methanolgehalt von 30 % durchgeführt. Für die Bestimmung der relativen Signaländerung wurde eine $1-\lambda$ -Auswertung durchgeführt.

Für eine detailliertere Auswertung wurden die gemessenen Bindungskurven zur Ermittlung der Affinitätskonstante nach Scatchard ausgewertet (Auftragung nicht gezeigt). Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, verursacht eine Modifikation der Partikel mit Azid- oder Alkinlinkern einen Rückgang der Affinität, worauf es auch bereits in Batch Adsorptionsexperimenten Hinweise gab [73]. Die Affinitätsreduktion ist dabei bei den Azid-Partikeln für das MIP und NIP feststellbar, was bedeutet, dass es zu einer generellen Verschlechterung der Sorptionseigenschaften durch die Modifikation mit einem Azidlinker kommt. Für das Alkin ist eine noch deutlichere Absenkung der Affinität feststellbar. Vermutlich liegt dies in der unterschiedlichen Befestigung des Alkin- bzw.-Azidlinkers an den Partikeln. Für die Azidfunktionalisierung wurde der Linker mittels einer radikalischen Thiol-En Reaktion an nicht abreagierten Doppelbindungen der Polymerpartikel befestigt, die Alkinfunktionalisierung wurde über ein Säureanhydrid an der Methacrylsäure realisiert. Da Methacrylsäure das funktionelle Monomer darstellt und somit hauptsächlich zur Wechselwirkung mit dem Templatmolekül beiträgt, beeinträchtigt deren Modifikation folglich auch die Affinität des Polymers.

Auch für die kovalente Immobilisierung wurde die Chip-zu-Chip Reproduzierbarkeit untersucht. Im Gegensatz zu den Untersuchungen bei einer elektrostatischen Immobilisierung der MIPs wurde hier die Reproduzierbarkeit jedoch nur mit einer Konzentration (175 µmol/L in 30 % Methanol) charakterisiert. Es ergab sich für die Azid-MIPs eine Chip zu-Chip Reproduzierbarkeit von 13,3 %, für die Alkin-MIPs wurde ein Wert von 30,8 % erhalten. Die hohe Reproduzierbarkeit der Azid-MIPs geht mit der hohen Oberflächenbelegung einher, es kommt zur Ausbildung einer stabilen Monolage auf der Sensoroberfläche. Da die Belegung mit den Alkin-MIPs entsprechend geringer ist, ist die mögliche Schwankungsbreite von Chip-zu-Chip dementsprechend größer.

4.1.2.3 Kurzzusammenfassung Kapitel 4.1.2

- Für eine kovalente Immobilisierung der Partikel ist eine Huisgenreaktion die beste Wahl.
- Azid- und Alkin-PEG modifizierte Oberflächen zeigen keine nennenswerte unspezifische Wechselwirkung mit dem Analyten.

- Azid-modifizierte Partikel lassen sich reproduzierbar immobilisieren und führen zur Ausbildung einer homogenen und dichten Oberflächenbelegung (Monolage).
- Die kovalente Immobilisierung führt zu einer deutlich stärkeren Anbindung als die elektrostatische Immobilisierung. Zudem wird bei der kovalenten Immobilisierung keine signifikante Ablösung der Partikel durch eine Behandlung im Ultraschallbad beobachtet.
- Alkin-modifizierte Partikel lassen sich mit der Huisgenreaktion immobilisieren, die Oberflächenbelegung ist allerdings weniger dicht als für Azid-modifizierte Partikel und weniger gut reproduzierbar.
- Konzentrationsabhängige RfS-Messungen sind mit kovalent immobilisierten Alkin-MIPs und kovalent immobilisierten Azid-MIPs möglich, wobei Azid-MIPs höhere Bindungssignale liefern.
- Die Affinität der MIPs wird durch die Modifikation mit Alkin- bzw. Azid- Gruppen beeinträchtigt, der Prägeeffekt geht dabei nicht verloren. Die Affinität der Azid-MIPs ist dabei deutlich höher als der Alkin-MIPs.

Alles in allem ist daher für eine kovalente Immobilisierung der MIPs eine Azid-Modifikation der Partikel die beste Wahl. Leider standen diese entsprechend modifizierten Partikel erst zu einem späten Stadium der Arbeit zur Verfügung, so dass sich weitere Untersuchungen diesbezüglich aus zeitlichen Gründen nicht realisieren ließen.

4.2 Untersuchungen des Prägeeffekts

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse bezüglich des Unterschiedes zwischen geprägtem und nicht geprägtem Polymer dargestellt. Ziel der Untersuchungen war es hierbei, einen tieferen Einblick in die Wechselwirkungsprozesse, die zwischen den Partikeln und dem Analyten ablaufen, zu erhalten. Insbesondere die Veränderung der Sorptionseigenschaften durch das molekulare Prägen stand hierbei im Fokus der Untersuchungen, sowie deren Veränderung durch Variation des zur Detektion verwendeten Solvens. Die Untersuchung mittels RfS-Messungen in Lösemittelgemischen unterschiedlicher Zusammensetzung ermöglicht hierbei die Bestimmung kinetischer Parameter sowie die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten. Zudem wurde durch kalorimetrische Messungen die Wechselwirkungsenthalpie in den verschiedenen Lösemittelgemischen bestimmt. Die Kombination beider Daten erlaubt es somit auch, den entropischen Anteil der Wechselwirkung zu bestimmen und aufbauend auf der Gesamtheit der Daten somit ein Bindungsmodell der molekularen Wechselwirkungen zwischen MIP und Templatmolekül zu postulieren.

4.2.1 Lösemittelabhängigkeit des RfS Bindungssignals und des Prägeeffektes

Für die Untersuchung des lösemittelabhängigen Bindungssignals wurden jeweils zwei mit NIPs bzw. MIPs modifizierte Transducer untersucht. Hierzu wurden jeweils Dreifachmessungen in den entsprechenden Wasser-Methanol-Gemischen mit 0,2 mM L-BFA durchgeführt und die Gleichgewichtsbeladung als Messsignal bestimmt (siehe Abbildung 29). Die Solvenszusammensetzung wurde dabei schrittweise um 10 % nach jeder Einzelmessung variiert. Für MIP und NIP wurde die Messreihe jeweils für einen Transducer bei hohem Wassergehalt, für den anderen jeweils bei niederem Wassergehalt begonnen, um der Messung von Artefakten vorzubeugen. Ein kleinerer Methanolanteil als 30 % ließ sich in dieser Messreihe allerdings nicht realisieren, da bei einem Methanolgehalt kleiner 30 % eine Konzentration von 0,2 mM die maximale Löslichkeit von L-BFA in diesem Solvensgemisch überschreitet.

Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, steigt das detektierte Gleichgewichtsbindungssignal mit zunehmendem Wasseranteil im Gemisch sowohl für das geprägte, als auch für das nicht geprägte Polymer an. Bei einem Methanolanteil größer 50 % erhält man nur sehr kleine Signale und es ist kein Unterschied mehr zwischen geprägtem und nicht geprägtem Polymer auszumachen. Bei steigendem Wasseranteil im Lösemittelgemisch steigt das Signal des geprägten Polymers überproportional stark im Vergleich zum Bindungssignal des nicht geprägten Polymers an. Dies spricht zunächst für einen höheren Prägeeffekt bei einem höheren Wassergehalt. Dieses Verhalten ist allerdings auf den ersten Blick ungewöhnlich, da mit steigendem Wassergehalt in der Regel auch hydrophobe Wechselwirkungen zunehmen, welche zu einer vermehrt unspezifischen Anbindung führen [76].

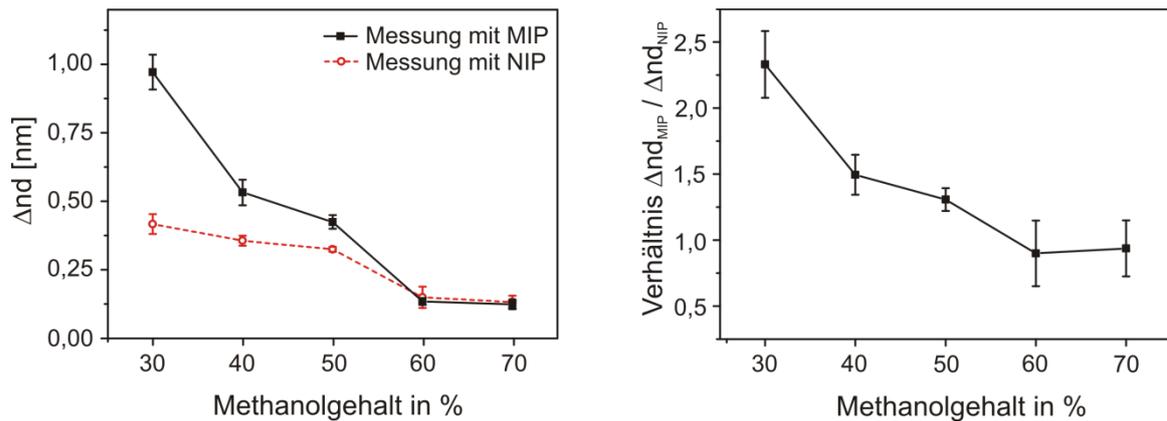


Abbildung 29: Links: Maximales Bindungssignal in Abhängigkeit der Lösemittelzusammensetzung. Vermessen wurden insgesamt 4 Transducer: 2 Transducer mit MIPs, 2 Transducer mit NIPs modifiziert. Die Konzentration der L-BFA Lösung betrug für alle Messungen 0,2 mmol/L. Jede Lösemittelzusammensetzung wurde pro Transducer je drei Mal vermessen. Rechts: Verhältnis des Bindungssignals der Messung mit MIPs modifizierten Oberflächen in Relation zum Bindungssignal mit NIPs modifizierten Oberflächen.

Aufgrund dieses nicht erwarteten Verhaltens, wurde ebenfalls das lösemittelabhängige Bindungsverhalten in homogener Phase mittels Batch Bindungsexperimenten untersucht. Für diesen Versuch wurde für jedes Lösemittelgemisch dasselbe Verhältnis von Partikelkonzentration und L-BFA Stoffmenge in Lösung von $15 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$ gewählt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Für die Auswertung wurde jeweils der Anteil der adsorbierten Stoffmenge ermittelt und gegen die Methanolkonzentration aufgetragen. Der Quotient aus der adsorbierten Stoffmenge des geprägten Polymers in Relation zur adsorbierten Stoffmenge des nicht geprägten Polymers entspricht hierbei dem Quotienten der Affinitätskonstanten und kann somit als ein Maß für den Prägeeffekt in homogener Phase herangezogen werden.

Wie in Abbildung 30 (rechts) zu sehen ist, nimmt die relative adsorbierte Stoffmenge hierbei mit steigendem Wassergehalt für das geprägte wie auch für das nicht geprägte Polymer zu. Der absolute Unterschied zwischen MIP und NIP bleibt dabei in erster Näherung nahezu gleich bzw. nimmt bei steigendem Wassergehalt sogar leicht zu. Dies bedeutet, dass die Affinitätskonstante für die Wechselwirkung zwischen Polymerpartikeln und Templatmolekül bei steigendem Wassergehalt stark zunimmt. Gleichzeitig verringert sich jedoch das Verhältnis der adsorbierten Stoffmenge von geprägtem Polymer zu nicht geprägtem Polymer (siehe Abbildung 30 links). Der Prägeeffekt wird also geringer, je höher der Wassergehalt ist, obwohl das MIP stets ungefähr die gleiche absolute Stoffmenge mehr an Analyt anbindet als das NIP.

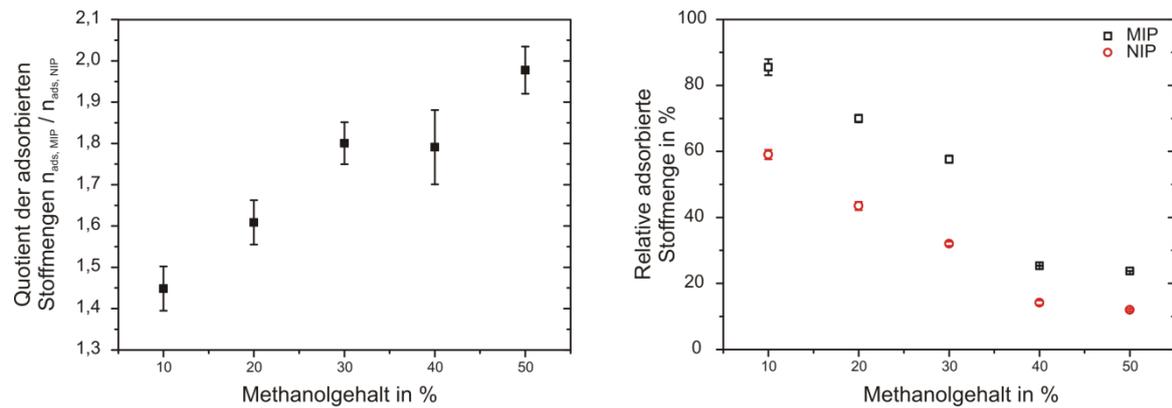


Abbildung 30: Links: Relative adsorbierte Stoffmenge bei unterschiedlichem Methanolgehalt. Schwarze Quadrate: MIP, rote Kreise: NIP. Rechts: Quotient der relativen adsorbierten Stoffmengen bei unterschiedlichem Methanolgehalt.

Auf den ersten Blick widersprechen sich somit die Ergebnisse der Messungen in homogener Phase und die Ergebnisse der RfS-Messungen. Als eine mögliche Erklärung lässt sich nun anführen, dass sich das Adsorptionsverhalten an der heterogenen Phase vom Adsorptionsverhalten in homogener Phase unterscheidet. Bei biologischen Erkennungselementen kann dies durchaus vorkommen, beispielsweise durch Agglomeration der Bindungsstellen auf der Oberfläche. Hierbei kommt es allerdings logischerweise zu einer Verminderung von Affinität bzw. Selektivität. Die molekularen Erkennungsprozesse, die den Unterschied zwischen geprägtem und nicht geprägtem Polymer ausmachen, sind zwar anders als in biologischen Erkennungselementen, jedoch ist auch hier eine Selektivitätserhöhung durch die Immobilisierung der Polymerpartikel, wie sie die höheren Bindungssignale für das MIP suggerieren, eher unwahrscheinlich. Zudem entsprechen an der heterogenen Phase ermittelten Assoziationskonstanten (siehe Kapitel 4.2.2, Abbildung 36) ebenfalls dem hier beobachteten Trend der Verringerung des Prägefaktors bei höherem Wassergehalt. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Bindungsexperimente in Lösung und den Messungen der optischen Schichtdicke mittels RfS lässt demnach nicht auf ein geändertes Bindungsverhalten durch die Immobilisierung rückschließen.

Eine weitaus wahrscheinlichere Erklärung für das beobachtete Verhalten ist, dass für geprägtes und nicht geprägtes Polymer ein unterschiedlicher Proportionalitätsfaktor zwischen adsorbierter Stoffmenge und der resultierenden Änderung der optischen Schichtdicke besteht. Geprägte und nicht geprägte Polymerpartikel sind identisch in Bezug auf ihre chemische Zusammensetzung, ihr Zetapotential und ihre Größe nach der Synthese [36]. Jedoch unterscheiden sie sich in der räumlichen Anordnung der funktionellen Gruppen sowie in ihrer Porosität, was durch Gas-Adsorptionsexperimente bestätigt werden konnte. Die nicht geprägten Polymere haben hierbei eine deutlich geringere frei zugängliche Oberfläche, sie sind demnach deutlich weniger porös und somit auch kompakter als die geprägten Polymerpartikel. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die MIPs über ein höheres Quellungspotential verfügen und zudem wahrscheinlich auch einen leicht unterschiedlichen Brechungsindex aufweisen. Das höhere Quellungspotential führt daher zu einer größeren Änderung der physikalischen Schichtdicke des MIP bei der Anbindung des Analyten und somit auch zu höheren Bindungssignalen bei RfS-Messungen.

Um diese These zu untermauern wurde untersucht, inwiefern sich die optischen Eigenschaften von MIP und NIP mittels Ellipsometrie genauer charakterisieren lassen. Eine genaue Auswertung konnte aber nicht durchgeführt werden, da eine sinnvolle Anpassung der ellipsometrischen Messdaten, basierend auf den zur Verfügung stehenden Schichtmodellen, nicht möglich war. Ursache hierfür waren die an den Partikeln auftretenden starken Streueffekte, die zwangsweise bei der Analyse dieser Schicht auftreten.

Die unterschiedliche Proportionalität zwischen der adsorbierten Stoffmenge und gemessenem Signal von MIP und NIP hat allerdings als Konsequenz, dass unter Bezugnahme auf die Differenz der Signalhöhen zwischen MIP und NIP keine Aussage über die Selektivität oder auch den Prägefaktor getroffen werden sollte. Demnach ist eine genauere Analyse der Messdaten zwingend. Eine Vergleichbarkeit innerhalb einer Reihe kann hierbei beispielweise durch internes Referenzieren hergestellt werden.

4.2.1.1 Untersuchung der lösemittelabhängigen Selektivität

Um zu untersuchen, inwiefern das lösemittelabhängige Bindeverhalten mit der Selektivität der Polymerpartikel korreliert, wurde die Wechselwirkung zwischen NIP bzw. MIP und Referenzmolekülen, die dem Prägemolekül strukturell und funktionell ähnlich sind (siehe Abbildung 31), mittels RfS untersucht. Für den Vergleich mit strukturell ähnlichen Molekülen ist es hierbei sehr wichtig, ebenfalls die Selektivität des nicht geprägten Polymers zu betrachten, um den Einfluss des molekularen Prägens auf die Selektivität beurteilen zu können.

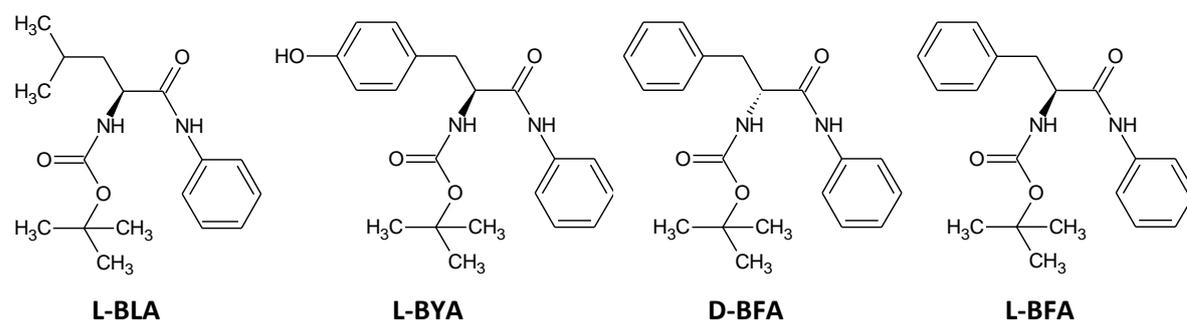


Abbildung 31: Strukturformeln der Moleküle, die für Selektivitätsmessungen verwendet wurden. Von links nach rechts: L-Boc-Leucin-anilid (L-BLA); L-Boc-Tyrosin-anilid (L-BYA); D-Boc-Phenylalanin-anilid (D-BFA); L-Boc-Phenylalanin-anilid (L-BFA).

Für die Untersuchungen wurden pro Referenzmolekül je drei Messungen durchgeführt, wobei für eine Lösemittelzusammensetzung für alle Messungen stets dieselbe Konzentration verwendet wurde (30 %: 180 μ M; 40 %: 0,5 mM; 50%: 1,5 mM). Das Gleichgewichtsbindungssignal für das Templatmolekül L-BFA wurde sowohl für das MIP als auch für das NIP als interner Standard verwendet und auf jeweils 100 % festgesetzt, wobei die Gleichgewichtsbindungssignale der anderen Verbindungen auf dieses Bindungssignal referenziert wurden, um eine Vergleichbarkeit zwischen MIP und NIP bei der Betrachtung des Bindungssignals herzustellen (siehe Abbildung 32).

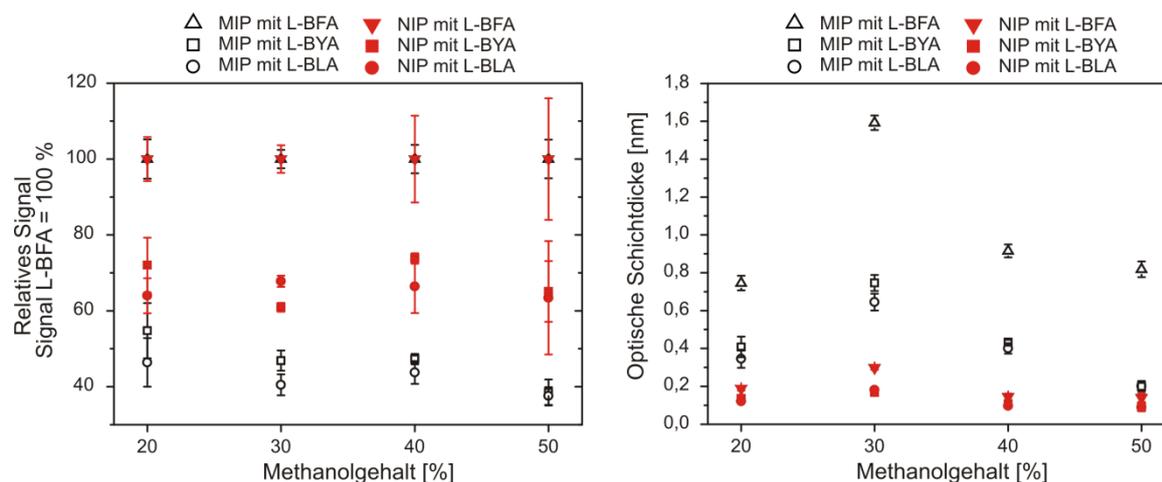


Abbildung 32: Selektivität des geprägten und des nicht geprägten Polymers gegenüber Strukturanalogen Verbindungen. Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse von Dreifachmessungen. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 20 %: 30 μ M; 30 %: 180 μ M; 40 %: 0,5 mM; 50 %: 1,5 mM. Links: Das Bindungssignal von L-BFA wurde auf 100 % gesetzt, die restlichen Verbindungen wurden hierauf referenziert. Rechts: Absolute Werte der entsprechenden Messungen.

Der Vergleich der relativen Bindungssignale zeigt auf, dass für das geprägte Polymer für L-BYA und L-BLA in allen Lösemittelgemischen jeweils knapp 40-55 % der Signalhöhe von L-BFA, für das nicht geprägte Polymer ca. 60-80 % der Signalhöhe von L-BFA erhalten wird. Die Ergebnisse zeigen somit auf, dass durch das molekulare Prägen ein moderater Gewinn an Selektivität erzielt wird.

Die Trendbetrachtung innerhalb dieser Messreihen zeigt, dass mit zunehmendem Wassergehalt die relative Signalhöhe der strukturell ähnlichen Moleküle für das geprägte Polymer leicht zunimmt. Für das nicht geprägte Polymer kann kein klarer Trend festgestellt werden. Auffällig ist zudem, dass bei 30 % Methanol das absolute Bindungssignal der Wechselwirkung zwischen L-BFA und geprägtem wie auch mit dem nicht geprägten Polymer überproportional hoch ist und die relativen Bindungssignale für die L-BLA und L-BYA (insbesondere beim geprägten Polymer) leicht geringer sind, als dass man es, dem Trend folgend, erwarten würde – die Selektivität scheint daher bei einem Methanolgehalt von 30 % gegenüber dem Trend leicht erhöht zu sein.

4.2.1.2 Untersuchung der Enantioselektivität

Die im vorhergehenden Abschnitt dargestellten Untersuchungen wurden ebenfalls mit dem D-Enantiomer des Prägемoleküls durchgeführt. Abbildung 33 zeigt die entsprechenden Messkurven der Wechselwirkung zwischen L-BFA bzw. D-BFA und den APTES-MIP modifizierten Oberflächen.

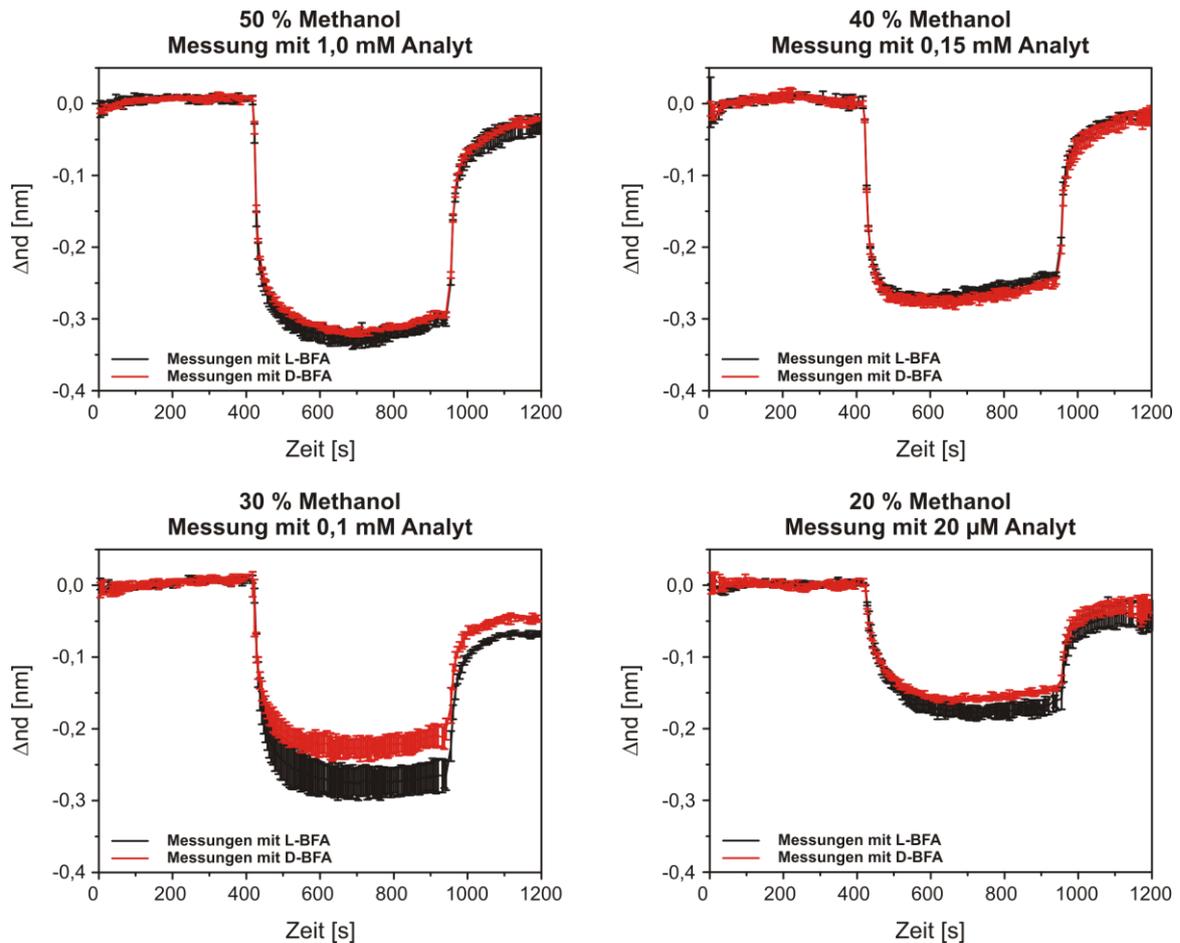


Abbildung 33: Bindungskurven der Messung mit L-BFA und D-BFA in den unterschiedlichen Lösemittelgemischen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei Messungen (oben links: 20 %, oben rechts 30 %, unten links 40 % unten rechts 50 % Methanol). Rote Kurve: Messungen mit D-BFA; schwarze Kurve: Messungen mit L-BFA.

Für die Untersuchung wurde in jedem Lösemittelgemisch jeweils für L-BFA und D-BFA dreimal die Bindungskurve in randomisierter Abfolge gemessen. Alle Messungen wurden auf demselben Transducer durchgeführt. Wie in Abbildung 33 dargestellt, kann bei einem Methanolgehalt von 20 % und von 30 % eine abweichende Bindungskurve für die beiden Enantiomere beobachtet werden. Für 40 % und 50 % Methanol ist nahezu kein Unterschied zwischen den Enantiomeren zu sehen. Eine analoge Untersuchung für das nicht geprägte Polymer zeigte für kein Lösemittelgemisch einen Unterschied zwischen den Enantiomeren (Messungen nicht gezeigt).

Zur Auswertung dieser Messungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aller Einzelmessungen mit einem Enantiomer im Bereich zwischen 700 und 800 s berechnet. Für die bessere Vergleichbarkeit der Werte sind die Werte auf das jeweilige Bindungssignal von L-BFA bezogen, welches auf 100 % gesetzt wurde. Für alle Messungen wurde eine Konzentration gewählt, die ungefähr der halbmaximalen messbaren Konzentration (bedingt durch die Löslichkeit) entsprach.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9: Bindungssignal der Wechselwirkung von L-BFA und D-BFA mit geprägtem Polymer, relatives Bindungssignal sowie Verhältnis aus der verwendeten Konzentration zur Messung und der Affinitätskonstante.

Methanolgehalt in %	Relatives Bindungssignal L-BFA in %		Relatives Bindungssignal D-BFA in %		Quotient der Bindungssignale $\Delta n_L / \Delta n_D$		Verhältnis aus C_{L-BFA} / K_{MIP} multipliziert mit 10^8	
	Wert	SdV	Wert	SdV	Wert	SdV	Wert	SdV
20	100,0	1,7	88,9	4,1	1,13	0,05	2,4	0,14
30	100,0	4,3	82,1	6,2	1,22	0,09	2,7	0,26
40	100,0	2,1	103,2	2,4	0,97	0,03	0,9	0,13
50	100,0	1,2	97,1	2,7	1,03	0,03	3,2	0,36

Der Quotient der jeweiligen Messsignale entspricht dem Enantioselektivitätsfaktor α , welcher zur Charakterisierung der Enantioselektivität verwendet wird. Der für einen Methanolgehalt von 30 % erzielte Wert von $1,22 \pm 0,09$ liegt hierbei gleichauf mit einem Wert von 1,23, der mit RfS bereits für andere geprägte Polymere bestimmt wurde [6].

Im Vergleich zu Enantioselektivitätsfaktoren von bis zu 10, die bei chiralen Trennungen in der Chromatographie erzielt werden [77], sind diese Werte natürlich vergleichsweise klein. Man muss sich bei diesem Vergleich allerdings vor Augen halten, dass bei chromatographischen Trennungen meist eine sehr geringe Konzentration an Analyt vorliegt und somit das Verhältnis aus Analyt zu hochaffinen, enantioselektiven Bindungsstellen entsprechend klein ist. Bei den RfS-Messungen ist die Konzentration an Analyt hoch, da ansonsten das detektierte Signal gering ist. Zudem ist die Zahl an enantioselektiven Wechselwirkungsplätzen durch die Oberflächenbeladung begrenzt und somit vergleichsweise gering. Dies führt dazu, dass auch weniger selektive Bindungsplätze in größerem Maße belegt werden. Durch diesen Prozess wird somit die Enantioselektivität, welche eine relative Größe ist, verringert. Dies erklärt auch, weshalb der hier bestimmte Enantioselektivitätsfaktor geringer ist, als er für die verwendeten nanoMIPs bereits in homogener Phase ermittelt wurde. So wurde bei Adsorptionsmessungen in homogener Phase eine ca. 2,5-mal höhere Anbindung von L-BFA im Vergleich zu D-BFA publiziert [36]. Bei diesem Experiment standen einer Konzentration von 1 mM Analyt jedoch 50 mg Partikel gegenüber und nicht wie bei den Messungen einer Konzentration von 0,1 mM Analyt nur eine Oberfläche kleiner 1 cm^2 , die mit einer Monolage an Partikeln belegt ist. Dieser Theorie zufolge muss man demnach eine konzentrationsabhängige Enantioselektivität erhalten, die bei steigender Konzentration geringer wird. Ein entsprechendes Experiment, bei dem jeweils das Sättigungssignal von Dreifachmessungen zur Auswertung herangezogen wurde, zeigt eben diesen Zusammenhang (siehe Abbildung 34). Demnach bedarf es für enantioselektive Messungen mit MIPs auf Sensoroberflächen einer sehr hohen Oberflächenbelegung und kleinen Analytkonzentrationen, oder um es präziser auszudrücken, es muss eine Konzentration gewählt werden, die klein ist in Relation zum Durchschnittswert der Gleichgewichtskonstante der im MIP vorhandenen Wechselwirkungsplätze.

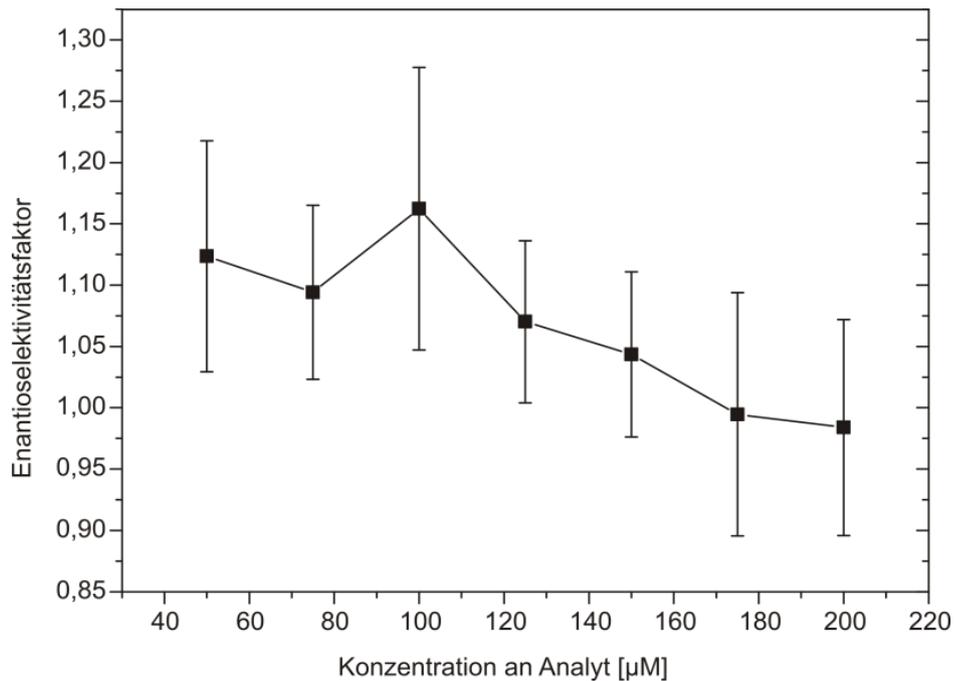


Abbildung 34: Mittels RfS-Messungen bestimmter Enantioselektivitätsfaktor der MIPs bei 30 % Methanol bei unterschiedlichen Konzentrationen an Analyt.

Dieser Zusammenhang muss demnach auch bei der Bewertung der in den in Abbildung 33 dargestellten Messungen zur Lösemittelabhängigkeit berücksichtigt werden, da diese bei unterschiedlichen Analytkonzentrationen durchgeführt wurden. Das Verhältnis aus der verwendeten Konzentration und der Affinitätskonstante (siehe Tabelle 9) war jedoch bis auf die Messung bei 40 % Methanol annähernd gleich, so dass dieser Wert eher für eine erhöhte und nicht verringerte Enantioselektivität sprechen würde. Zudem ist keine Korrelation aus diesem Quotienten und der erhaltenen Enantioselektivität erkennbar, so dass von einer erhöhten Enantioselektivität bei geringerem Methanolgehalt ausgegangen werden kann, wobei diese bei 30 % Methanolgehalt leicht erhöht zu sein scheint.

4.2.2 Ermittlung der Gleichgewichtskonstante der Templat-Polymer Wechselwirkung mittels RfS

Für die nähere Untersuchung der beobachteten Lösemittelabhängigkeit wurde jeweils die Wechselwirkung von MIP und NIP mit dem Templatmolekül konzentrationsabhängig vermessen. Mit diesen Messungen kann unter anderem die Affinitätskonstante der Wechselwirkung zwischen Polymer und Templatmolekül ermittelt werden. Zur Ermittlung der konzentrationsabhängigen Bindungssignale wurde für jede Konzentration jeweils der Mittelwert des Sättigungssignals aus drei Messungen gebildet. Somit wurden für diese Auswertung nur Messungen mit einbezogen, bei denen ein Gleichgewichtszustand erreicht wurde. Bei der Betrachtung biomolekularer Wechselwirkungen wird zur Ermittlung der Affinitätskonstanten ein Sorptionsmodell nach Langmuir verwendet, das Bindungsstellen der gleichen Affinität annimmt (siehe Kapitel 2.4). Bei MIPs, insbesondere bei nicht kovalent geprägten MIPs, existieren jedoch Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität, wie bereits im Theorieteil dieser Arbeit dargelegt wurde. Diese führt dazu, dass eine Linearisierung nach Scatchard, insbesondere bei kleinen Konzentration, zu Abweichungen vom linearen Verhalten führt. Für höhere

Ergebnisse und Diskussion

Analytkonzentrationen sind die relativen Belegungsunterschiede dieser hochaffinen Bindungsstellen bei der Messung mit verschiedenen Konzentrationen gering, wodurch es nur zu einem Offset kommt [42] und man das Langmuir Sorptionsmodell verwenden kann. Man erhält bei dieser Auswertung somit eine Affinitätskonstante, die der mittleren Affinität der Polymerpartikel entspricht.

Eine alleinige Adressierung der nur in geringer Anzahl vorkommenden hochaffinen Bindungsstellen und Bestimmung ihrer Affinität war auf Basis von RfS-Messungen nicht möglich. Für eine Affinitätsbestimmung dieser Bindungsstellen muss eine entsprechend geringe Konzentration an Analyt verwendet werden, um nicht auch signifikante Beiträge der Wechselwirkung mit Bindungsstellen geringerer Affinität zu erhalten. Daraus resultierten zum einen sehr kleine Messsignale, zum anderen wird eine Gleichgewichtsbeladung hierbei auch nicht in akzeptabler Zeit erreicht.

Für die Bestimmung der Bindungsaffinitäten nach Scatchard wurden demnach nur Messungen mit hoher Analytkonzentration berücksichtigt. Jede der in Tabelle 10 aufgeführte Affinitätskonstante wurde auf Basis mindestens 5 unterschiedlicher Konzentrationen bestimmt. Die Auftragung nach Scatchard ist jeweils für MIP und NIP für den unterschiedlichen Methanolgehalt in Abbildung 35 dargestellt. Bei der Ermittlung der Affinitätskonstanten durch den linearen Fit wurde der Messfehler der einzelnen Werte durch eine instrumentelle Fehlergewichtung berücksichtigt. Bei der Auswertung wurden ausschließlich Messungen berücksichtigt, die eindeutig kinetisch kontrolliert abliefen und bei denen eine Sättigung der Bindungskurve erreicht wurde.

Tabelle 10: Affinitätskonstanten für geprägtes und nicht geprägtes Polymer.

Methanolgehalt in %	Affinitätskonstante MIP [L·mol ⁻¹]		Affinitätskonstante NIP [L·mol ⁻¹]		Verhältnis $K_{A, MIP} / K_{A, NIP}$	
	$K_{A, MIP}$	$\Delta K_{A, MIP}$	$K_{A, NIP}$	$\Delta K_{A, NIP}$	Wert	Δ
50	850	50	450	100	1,89	0,43
40	3.700	350	3.350	500	1,10	0,20
30	17.000	2.550	11.700	900	1,45	0,24
20	31.700	3.650	24.150	4.900	1,31	0,31

Die Auswertung zeigt, dass das geprägte Polymer höhere Affinitätskonstanten aufweist als das nicht geprägte Polymer. Zusätzlich ist zu sehen, dass die Affinitätskonstanten von geprägtem und nicht geprägtem Polymer bei Erhöhung des Wassergehalts ansteigen. Dieser Trend war auch in den Batch Bindungsexperimenten zu sehen. Hier konnte ebenfalls eine stärkere Sorption ins Polymer bei höherem Wassergehalt festgestellt werden (siehe Kapitel 4.2).

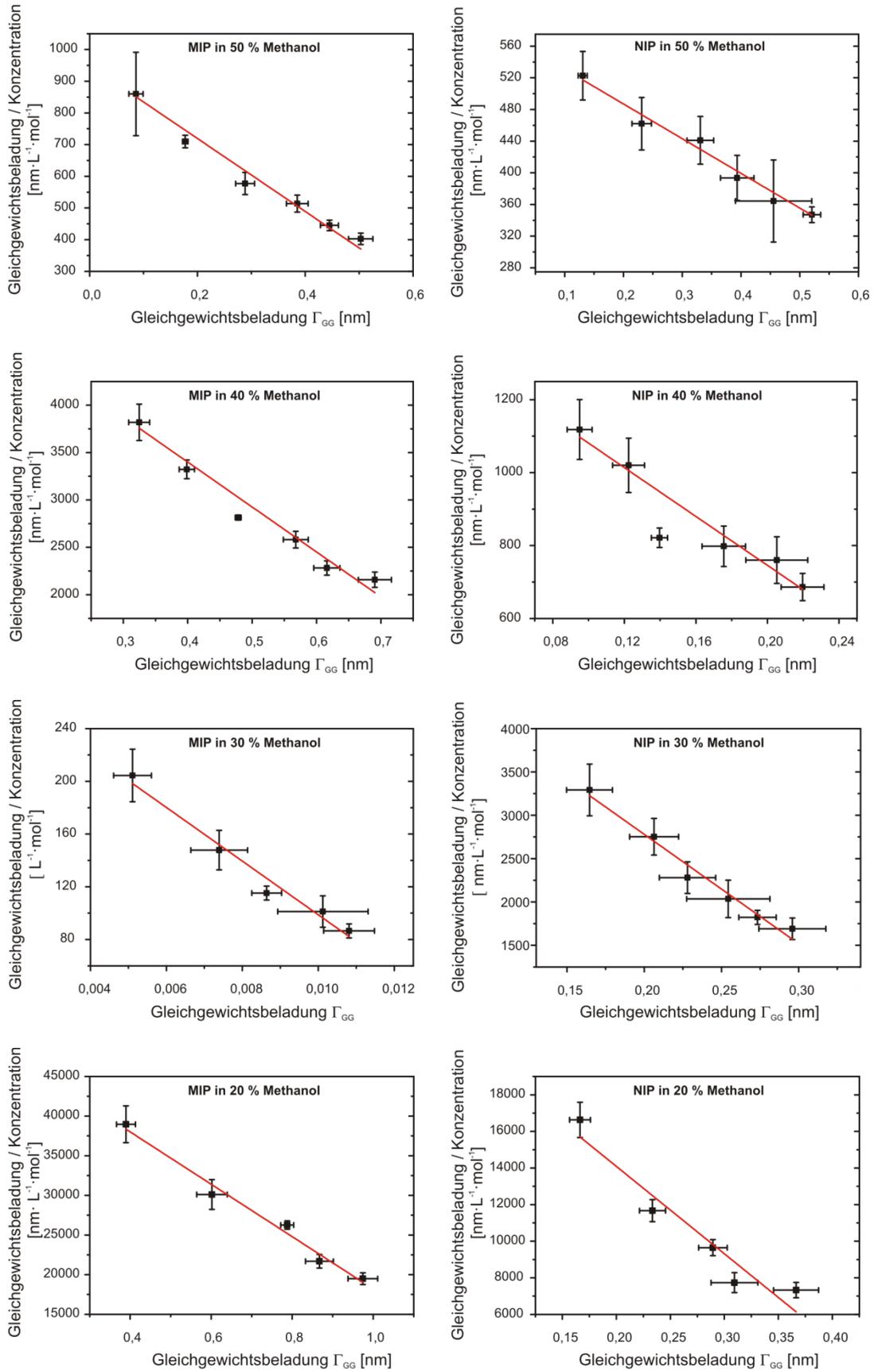


Abbildung 35: Scatchard Plots für geprägtes und nicht geprägtes Polymer bei unterschiedlichem Methanolgehalt. Bei der Messung mit MIPs in 30 % Methanol wurde eine Auswertung bei einer Wellenlänge durchgeführt, ansonsten wurde jeweils die optische Schichtdicke zur Auswertung verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Dieser Trend wird höchstwahrscheinlich durch die starke Abnahme der Löslichkeit von L-BFA bei höherem Wassergehalt (siehe Tabelle 11) verursacht. Die Löslichkeit kann als ein Maß angesehen werden, wie gut das Templatmolekül solvatisiert wird. Eine hohe Löslichkeit geht mit einer guten Solvatisierung einher und umgekehrt. Betrachtet man den Gesamtprozess der Polymer-Templat Wechselwirkung, so ist das Abstreifen der Solvathülle ein Teilschritt des Bindungsprozesses. Eine schlechtere Solvatisierung begünstigt diesen Teilschritt, was somit eine verstärkte Sorption ins Polymer zur Folge hat.

Tabelle 11: Maximale Löslichkeit von L-BFA in Wasser-Methanol Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung.

Methanolgehalt in %	Maximale Löslichkeit [$\mu\text{mol/L}$] (incl. Messunsicherheit)
20	63 ± 5
30	154 ± 2
40	390 ± 10
50	1.670 ± 31

Vergleicht man die absoluten Werte der ermittelten Affinitätskonstanten von MIP und NIP, kann man nur einen geringen Unterschied feststellen. Ein Vergleich zu Literaturangaben von Affinitätskonstanten, die für diese Partikel ermittelt wurden, liefert dabei eine recht gute Übereinstimmung. So wurde von Lehmann et al. [40] für ein Wasser-Methanol-Gemisch mit 25 % Methanol ein Verhältnis der Affinitätskonstanten von $K_{A,MIP}$ zu $K_{A,NIP}$ von 1,57 ermittelt, was innerhalb des Fehlerbereichs der hier ermittelten Affinitäten liegt. Bei der Beschreibung der Wechselwirkung zwischen MIP und Templatmolekül mittels eines Bi-Langmuir Sorptionsmodells wurde hierbei bei einem Methanolgehalt von 25 % ein Wert von 69.600 ± 11.550 L/mol für die niederaffinen Bindungsstellen publiziert. Da bei der hier dargestellten Auswertung nach Scatchard ebenfalls eher die Affinität der niederaffinen und nicht die der hochaffinen Bindungsstellen ermittelt werden, lässt sich dieser Wert gut für einen Vergleich nutzen. Interpoliert man die Affinitätskonstanten zwischen 20 und 30 % Methanol, so erhält man für die RfS-Messungen einen Wert, der ungefähr um den Faktor 2,8 geringer ist. Vermutlich beeinflusst die Immobilisierung an der Oberfläche die Affinität der geprägten Polymerpartikel, da die Partikel hier weitaus dichter beisammen liegen und somit nicht alle Bindungsstellen gut zugänglich sind. Geprägtes und nicht geprägtes Polymer werden hierbei im selben Maße beeinflusst, so dass die Affinität für beide herabgesetzt ist. Des Weiteren wird auch hier eine Rolle spielen, dass durch Messungen an der Oberfläche niederaffine Bindungsstellen eine größere Gewichtung aufweisen, als bei den Messungen in homogener Phase, die mit einem sehr viel größeren Verhältnis von Polymerpartikel zu L-BFA durchgeführt wurden.

Insgesamt sind der Trend und die Größenordnung der Affinitätskonstanten in sich stimmig und die Abweichung zu bereits publizierten Werten gering, so dass die ermittelten Werte für die Affinitätskonstanten als realistisch zu bewerten sind. Auch zeigt sich hier eine gute Korrelation mit dem Verhältnis der adsorbierten Stoffmenge, wie es in flüssiger Phase bestimmt wurde. Das Verhältnis der Gleichgewichtskonstanten zwischen MIP und NIP nimmt wie erwartet bei zunehmendem Wassergehalt tendenziell ab, auch wenn eine eindeutige und zweifelsfreie

Beurteilung des Trends aufgrund der großen Fehlerbalken schwer ist nicht möglich ist (siehe Abbildung 36).

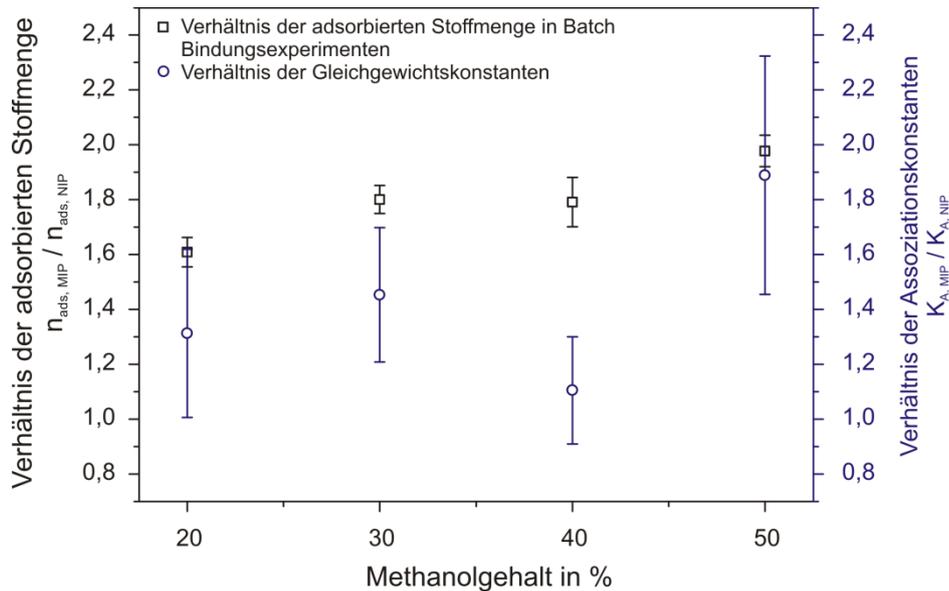


Abbildung 36: Vergleich des Quotienten der adsorbierten Stoffmenge von MIP und NIP in homogener Phase mit dem Quotienten der an der heterogenen Phase ermittelten Assoziationskonstanten.

4.2.3 Bestimmung kinetischer Daten der Wechselwirkung

Die bisherige Datenlage zeigt sowohl für die Zunahme der Affinitätskonstanten als auch für die Abnahme des Prägefaktors einen eindeutigen Trend und es kam die Vermutung auf, dass dies sich auf die geringere Löslichkeit von L-BFA bei höherem Wassergehalt rückführen lässt. Die dem Trend gegenüber leicht erhöhte Selektivität bei 30% konnte jedoch durch die Affinitätskonstanten nicht erklärt werden. Eine kinetische Analyse der Daten ermöglicht es, tiefere Einblicke in die ablaufenden Wechselwirkungsprozesse zu erzielen, das Verhalten somit detaillierter zu beschreiben und auch erklären zu können. Analog der für die Auswertung nach Scatchard diskutierten Kriterien müssen auch für eine kinetische Auswertung nur Messkurven mit hoher Konzentration einbezogen werden, um die mittlere Affinitätsratenkonstante der Bindung zu ermitteln.

4.2.3.1 Betrachtung der Dissoziationsphase

Für die Bestimmung kinetischer Parameter wurde zunächst der Fokus auf die Dissoziationsphase gelegt, da diese Phase leicht ausgewertet werden kann. Um die Dissoziationsratenkonstante aus den zeitabhängigen Bindungssignalen zu bestimmen, wird der zeitliche Verlauf aller Einzelmessungen einer Messreihe über einen globalen Fit angepasst. Als Modell für den Fit wird hierbei ein monoexponentieller Zerfall verwendet, wie es der analytischen Lösung einer Kinetik erster Ordnung entspricht.

Einfluss der Rückbindung

Bei Betrachtung des Dissoziationsverlaufes wird schnell deutlich, dass Rückbindung vorliegt, da die Bindungskurven nicht zur Basislinie hin abklingen. Ein exponentieller Fit, der die Rückbindung auf 0 festsetzt, führt zu erheblichen Abweichungen vom tatsächlichen Kurvenverlauf (siehe Abbildung 37) und mindert die Güte der Kurvenanpassung erheblich.

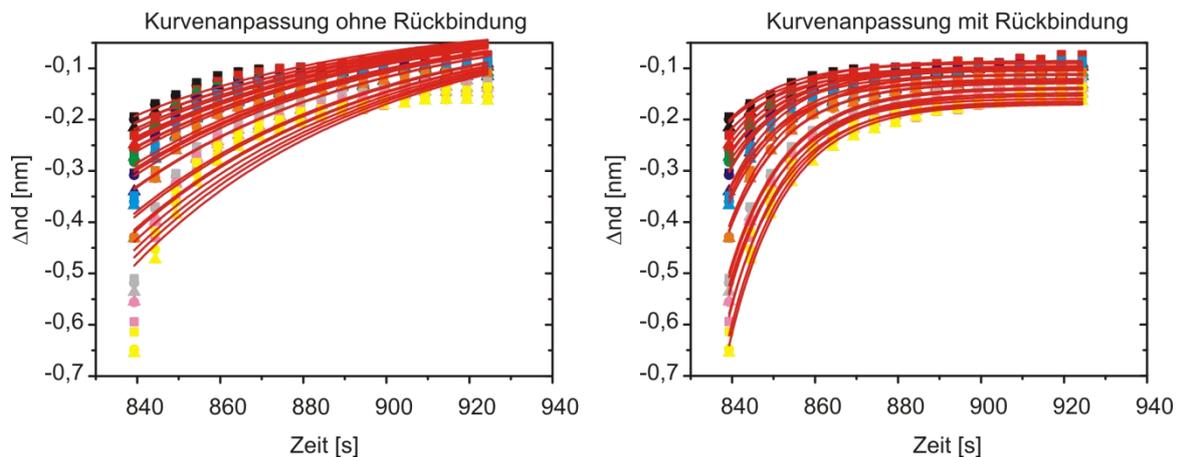


Abbildung 37: Nichtlineare Kurvenanpassung der Dissoziationsphase. Links: Kurvenanpassung ohne Rückbindung Rechts: Berücksichtigung der Rückbindung.

Zur Rückbindung kommt es vor allem dann, wenn eine große Anzahl an freien Bindungsplätzen an der Oberfläche zur Verfügung steht. Bei einer dicht belegten Oberfläche mit Partikeln, die mehrere Bindungsstellen aufweisen, ist daher eine Rückbindung sehr wahrscheinlich. Für den zeitlichen Verlauf der Dissoziationsphase bedeutet dies, dass der Einfluss der Rückbindung im Anfangsbereich der Dissoziationsphase am geringsten ist, da hier nur wenig freie Bindungsstellen zur Verfügung stehen. Bei einem hohen Einfluss der Rückbindung ermittelt man entsprechend kleinere Dissoziationsratenkonstanten als im selben System ohne Rückbindung. Denselben Effekt hat man bei Messungen mit geringer Analytkonzentration, auch hier liegt eine große Anzahl an freien Bindungsstellen vor.

Vergleicht man nun die Werte, die aus einer nichtlinearen Kurvenanpassung über den gesamten Dissoziationszeitraum resultieren mit Werten einer Kurvenanpassung, die nur die erste Minute der Dissoziationsphase betrachtet, so erhält man für geprägtes und nicht geprägtes Polymer jeweils größere Dissoziationsratenkonstanten, wenn nur der Anfangsbereich der Dissoziationsphase für die Kurvenanpassung verwendet wird. Um den Rückbindungseinfluss zu minimieren, wurde daher für die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstanten jeweils nur der Anfangsbereich der Dissoziationsphase angepasst. Zudem wurde jegliche im Folgenden dargestellte Auswertung des Dissoziationsverhaltens stets unter Berücksichtigung von Rückbindung durchgeführt. Da der Einfluss der Rückbindung allerdings nicht vollständig eliminiert werden konnte, kann es sein, dass die ermittelten Dissoziationsratenkonstanten eine systematische Abweichung hin zu betragsmäßig größeren Werten aufweisen.

4.2.3.2 Vergleich der ermittelten Dissoziationsratenkonstanten

In Tabelle 12 sind die durch die monoexponentielle Kurvenanpassung unter Berücksichtigung der Rückbindung ermittelten Dissoziationsratenkonstanten aufgelistet. Hierbei zeigt sich, dass das nicht geprägte Polymer in allen getesteten Solvenszusammensetzungen eine kleinere Dissoziationsratenkonstante aufweist als das geprägte Polymer. Dies ist zunächst verwunderlich, da es die Frage aufwirft, weshalb ein Material, das für eine stärkere und bessere Anbindung eines Analyten entwickelt ist, diesen schneller wieder aus den Bindungstaschen entlassen sollte, als das Vergleichsmaterial ohne diese spezifischen Bindungsstellen.

Tabelle 12: Dissoziationsratenkonstanten, ermittelt durch monoexponentielle Kurvenanpassung der ersten Minute der Dissoziationsphase

Methanolgehalt in %	Geprägtes Polymer		Nicht geprägtes Polymer	
	$k_{d,MIP} [s^{-1}]$	$\Delta k_{d,MIP} [s^{-1}]$	$k_{d,NIP} [s^{-1}]$	$\Delta k_{d,NIP} [s^{-1}]$
50	0,1136	0,0026	0,0334	0,0026
40	0,0707	0,0009	0,0287	0,0040
30	0,0424	0,0010	0,0211	0,0011
20	0,0215	0,0004	0,0169	0,0032

Um diese Frage zu beantworten wurden zunächst die Residuen der monoexponentiellen Kurvenanpassung analysiert, um zu sehen ob der monoexponentielle Kurvenfit auch den Kurvenverlauf gut widerspiegelt. Hierbei erkennt man, dass es für das geprägte Polymer (unabhängig von der Breite des Auswertefensters) zu systematischen Abweichungen kommt, wie in Abbildung 38 oben dargestellt ist. Diese systematischen Abweichungen bei der monoexponentiellen Kurvenanpassung treten bei allen getesteten Methanol-Wasser Gemischen in gleicher Form und Stärke auf. Für das nicht geprägte Polymer ist keine systematische Abweichung bei der Residuenanalyse beim Verwenden einer monoexponentiellen Zerfallsfunktion erkennbar.

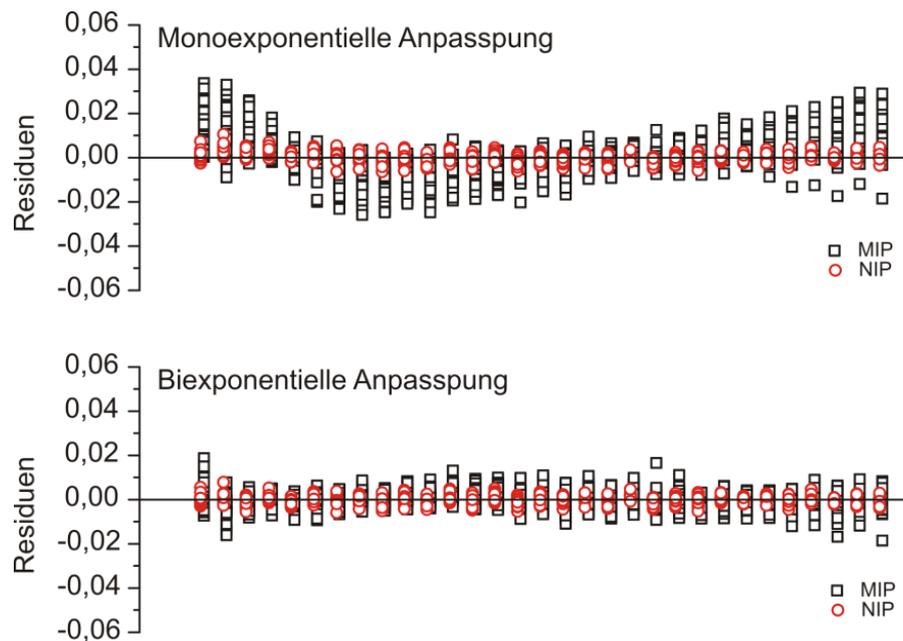


Abbildung 38: Residuenanalyse der Anpassung des Dissoziationsverlaufes von geprägtem (schwarze Quadrate) und nicht geprägtem Polymer (rote Kreise). Oben: Residuen der Kurvenanpassung eines monoexponentiellen Zerfalls; Unten: Residuen der Kurvenanpassung eines biexponentiellen Zerfalls

Verwendet man für das geprägte Polymer hingegen eine biexponentielle Zerfallsfunktion (Gl. 4.2.1), so wird der Kurvenverlauf der Dissoziationsphase wesentlich besser widerspiegelt, wie die nun statistisch verteilten Residuen aufzeigen. Für das nicht geprägte Polymer wird daher eine Kinetik erster Ordnung zur Beschreibung der Dissoziationsphase verwendet, für das

Ergebnisse und Diskussion

geprägte Polymer beschreibt eine solche Kinetik das gesamte Dissoziationsverhalten nur in grober Näherung.

$$f(x) = A_1 \cdot e^{-k_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{-k_2 \cdot t} + Y_{off} \quad \text{Gl. 4.2.1}$$

Der Vergleich dieser so ermittelten Konstanten zeigt hierbei auf, dass das MIP im Vergleich zum NIP doch nicht ausschließlich eine schnellere Dissoziation zeigt, wie durch den monoexponentiellen Kurvenfit suggeriert wurde. Die Dissoziation im MIP ist nur anteilig schneller als im NIP, ein Teil der angebotenen Templatmoleküle weist eine langsamere Dissoziationkinetik für das MIP als für das NIP auf. Die teilweise schnellere Dissoziationskinetik des MIP im Vergleich zum NIP lässt sich hierbei vermutlich auf die höhere Porosität der MIPs und der hierdurch höheren Mobilität des Templatmoleküls innerhalb der Polymerpartikel rückführen. Die tatsächliche Dissoziation aus den Bindungsstellen ist für das MIP langsamer, wie durch die Detaillierte Analyse der genauen Messwerte im Folgenden gezeigt werden kann.

Die durch die biexponentielle Kurvenanpassung ermittelten Dissoziationsratenkonstanten sind in Tabelle 13 aufgelistet, Abbildung 39 stellt die Werte graphisch dar. Für den biexponentiellen Fit ist eine sinnvolle Kurvenanpassung, die sich auf den Anfangsbereich der Dissoziationsphase beschränkt, aufgrund der geringen Anzahl an Datenpunkten nicht sinnvoll. Aus diesem Grund wurde der Fit über den gesamten Dissoziationszeitraum durchgeführt, die ermittelten Konstanten sind demnach tendenziell zu klein.

Tabelle 13: Dissoziationsratenkonstanten, ermittelt durch biexponentielle Kurvenanpassung der gesamten Dissoziationsphase

Methanolgehalt in %	Geprägtes Polymer			
	$k_{d1} [s^{-1}]$	$\Delta k_{d1} [s^{-1}]$	$k_{d2} [s^{-1}]$	$\Delta k_{d2} [s^{-1}]$
50	0,0209	0,0008	0,1667	0,0042
40	0,0179	0,0007	0,1159	0,0021
30	0,0112	0,0023	0,0782	0,0049
20	0,0078	0,0007	0,0454	0,0028

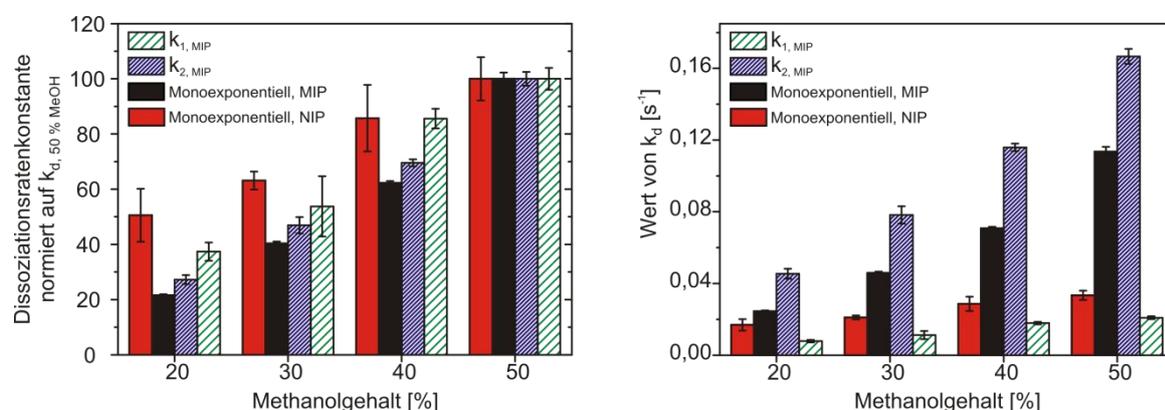


Abbildung 39: Graphische Darstellung der Dissoziationsratenkonstanten für das geprägte und nicht geprägte Polymer bei variablem Methanolgehalt. Links: Normiert auf die jeweilige Dissoziationsratenkonstante bei 50 % Methanol. Rechts: Absolutwerte der Dissoziationsratenkonstanten

Die graphische Darstellung veranschaulicht nochmals, dass das geprägte Polymer für alle getesteten Lösemittelzusammensetzungen bei einer monoexponentiellen Beschreibung eine schnellere Dissoziationsratengeschwindigkeit aufzeigt als das nicht geprägte Polymer. Hierbei nähern sich die Dissoziationsratenkonstanten jedoch mit zunehmendem Wassergehalt einander an. Die Trendbetrachtung zeigt auf, dass für das geprägte Polymer eine deutlich stärkere Abhängigkeit vom Lösemittel besteht – in absoluten Zahlen, als auch hinsichtlich der relativen Änderung. Beschreibt man die Dissoziationsphase mit einer biexponentiellen Zerfallsfunktion, erhält man für jede Solvenszusammensetzung eine Dissoziationsratenkonstante die größer ist als für das NIP und eine Dissoziationsratenkonstante, die kleiner ist als für das NIP.

Bei der Auswertung der kinetischen Daten wurde dabei festgestellt, dass das Verhältnis der Gewichtungsfaktoren bei der biexponentiellen Kurvenanpassung A_1 und A_2 konzentrationsabhängig ist und es bei höheren Konzentrationen zu einer zunehmenden Gewichtung der jeweils größeren Dissoziationsratenkonstante k_2 kommt (siehe Abbildung 40). Der Bereich, in dem sich das Verhältnis A_2 zu A_1 bewegt, ist dabei nicht für alle Solvenszusammensetzungen gleich. Bei zunehmendem Wassergehalt erfährt die kleinere Dissoziationsratenkonstante eine zunehmend größer werdende Gewichtung.

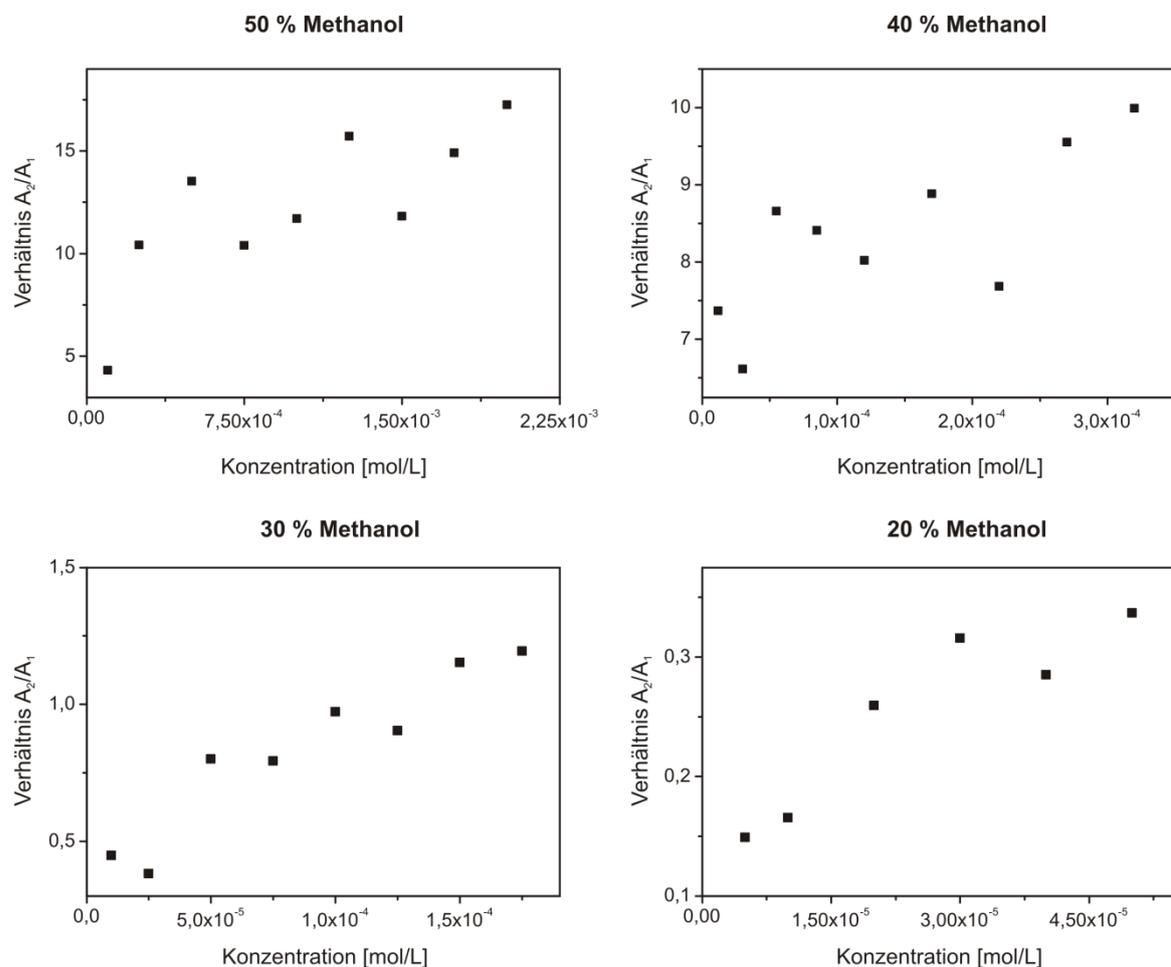


Abbildung 40: Abhängigkeit des Verhältnis der Gewichtungsfaktoren A_1 und A_2 bei der biexponentiellen Anpassung der Dissoziationsphase.

Der zunehmende Einfluss der höheren Dissoziationsratenkonstante bei Erhöhung der Konzentration lässt sich durch die ebenfalls mit der Konzentration zunehmenden Besetzung niederaffiner Bindungsstellen erklären. Die Besetzungszahl der niederaffinen Bindungsstellen nimmt mit steigender Konzentration zu - sowohl bezüglich ihrer absoluten Menge, als auch in Relation zu den hochaffinen Bindungsstellen. Dies bedeutet demnach, dass die schnellere Dissoziationsratenkonstante den niederaffinen Bindungsstellen, die langsamere Dissoziationsratenkonstante den hochaffinen Bindungsstellen zugeordnet werden kann. Die stärkere Gewichtung der hochaffinen Bindungsstellen bei geringerem Methanolgehalt korreliert hierbei sehr gut mit der zunehmenden Affinität der MIPs bei steigendem Wassergehalt.

Die Trendanalyse der Absolutwerte der Dissoziationsratenkonstanten bei den verschiedenen Methanol-Wasser-Gemischen zeigt eine stetig sinkende Dissoziationsratenkonstante für das geprägte wie auch für das nicht geprägte Polymer, wobei ein Methanolgehalt bei 30 % keinerlei Besonderheiten aufweist. Die beobachtete erhöhte Selektivität bei 30 % Methanol (siehe Kapitel 4.2.1.2) lässt sich also nicht über eine Trendabweichung der Dissoziationsgeschwindigkeit erklären.

Der generelle Trend hin zu kleineren Dissoziationsratenkonstanten lässt sich zum Teil auf die schlechtere Solvatisierung des Templatmoleküls bei höherem Wassergehalt zurückführen. Alleinig kann dies allerdings nicht die Ursache sein, da sich ansonsten MIP und NIP gleichermaßen verhalten würden. Die relative Abnahme ist beim MIP jedoch weitaus stärker ausgeprägt (siehe Abbildung 39 rechts). Dies, sowie die dargestellte Abhängigkeit der Gewichtung vom Solvens, sprechen dafür, dass sich mit der Änderung der Solvenszusammensetzung auch der Mechanismus der molekularen Erkennung bzw. die Stärke der Bindung der unterschiedlich selektiven Bindungsstellen im MIP ebenfalls in Abhängigkeit vom Solvens ändern muss. Weitere Details hierzu konnten durch Messungen der Bindungsenthalpie ermittelt werden (siehe Kapitel 4.2.4). Die fortführende Diskussion dieses Aspektes ist daher ebenfalls dort zu finden.

4.2.3.3 Betrachtung der Assoziationsphase

Prinzipielle Voruntersuchungen

Analog zur Dissoziationsphase erfolgt auch für die Assoziationsphase die Auswertung über eine nichtlineare Kurvenanpassung des zeitabhängigen Bindungssignals. Hierfür wird der Kurvenverlauf auf Basis eines zuvor definierten Bindungsmodells angepasst (siehe Kapitel 2.4). Das einfachste denkbare Modell hierfür ist eine bimolekulare Reaktion, wie in Gleichung Gl. 4.2.2 dargestellt. Dieses Modell kann für MIPs jedoch nur Mittelung darstellen, da in diesem Modell keine Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität vorkommen.



Bei der Auswertung nach Scatchard konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass in erster Näherung eine solche Mittelung der Affinitätsstellen bei hohen Konzentrationen möglich ist. Eine kinetische Auswertung nach dem Modell aus Gleichung Gl. 4.2.2 wurde nun ebenfalls bei hohen Konzentrationen durchgeführt um zu evaluieren, ob eine gemittelte Beschreibung der Wechselwirkungsprozesse im MIP auch auf Basis dieses Modells möglich ist. Hierfür wurden die

in Abbildung 41 dargestellten Bindungskurven mit dem entsprechenden nichtlinearen Fit angepasst.

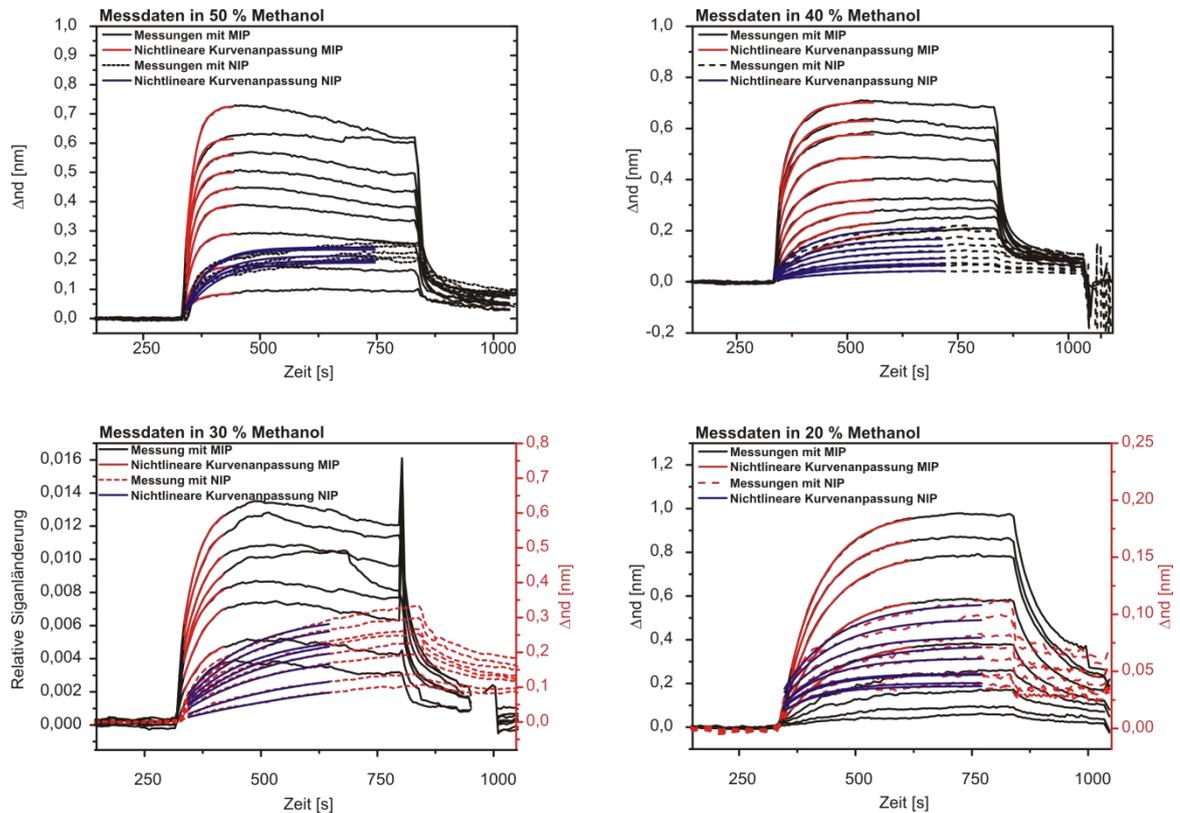


Abbildung 41: Darstellung der Bindungskurven für MIP und NIP sowie die nichtlineare Kurvenanpassung der Assoziationsphase inklusive Anfangsbereich. Durch Luft verursachte Datenpunkte wurden teilweise aus den Messkurven entfernt.

Auf den ersten Blick scheint es eine recht gute Übereinstimmung des Kurvenverlaufs mit den angepassten Daten zu geben. Die Residuenanalyse zeigt hierbei jedoch auf, dass es insbesondere in der Anfangsphase der Assoziation zu systematischen Abweichungen vom Kurvenverlauf kommt (siehe Abbildung 42), wobei die Ausprägung der Abweichungen für das NIP stärker ist als für das MIP.

Für diese Abweichungen in der Anfangsphase gibt es prinzipiell mehrere mögliche Ursachen:

- (1) Durch Diffusion der Probe im Schlauch kommt es zu einer leichten Verdünnung der Probe, die gemessenen Signale sind geringer als die zu erwartenden.
- (2) In der Anfangsphase existiert ein größerer Einfluss der Diffusion auf die Assoziationsphase, die Bindungskurven sind demnach nicht ausschließlich kinetisch kontrolliert.
- (3) Das verwendete bimolekulare Modell beschreibt den Wechselwirkungsprozess nicht gut genug, insbesondere nicht in der Anfangsphase.

Punkt 1 ist eher unwahrscheinlich, da durch das verwendete Messprogramm eine Verdünnung in diesem Ausmaß nahezu ausgeschlossen ist. Punkt 2 ist denkbar, jedoch ist der Einfluss der Diffusion eher als gering einzuschätzen. Der Massentransport an die Oberfläche kann vernachlässigt werden, wenn „dieser mindestens zehn Mal schneller verläuft als die Reaktion“

[19]. Da es sich bei L-BFA um ein sehr kleines Molekül mit einem Molekulargewicht von ca. 300 Da handelt und die Anbindung an die Oberfläche vergleichsweise langsam vonstattengeht, kann von einem nur minimalen Einfluss der Diffusion ausgegangen werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass das verwendete Bindungsmodell schlichtweg die Anfangsphase der Assoziation nicht genau beschreibt.

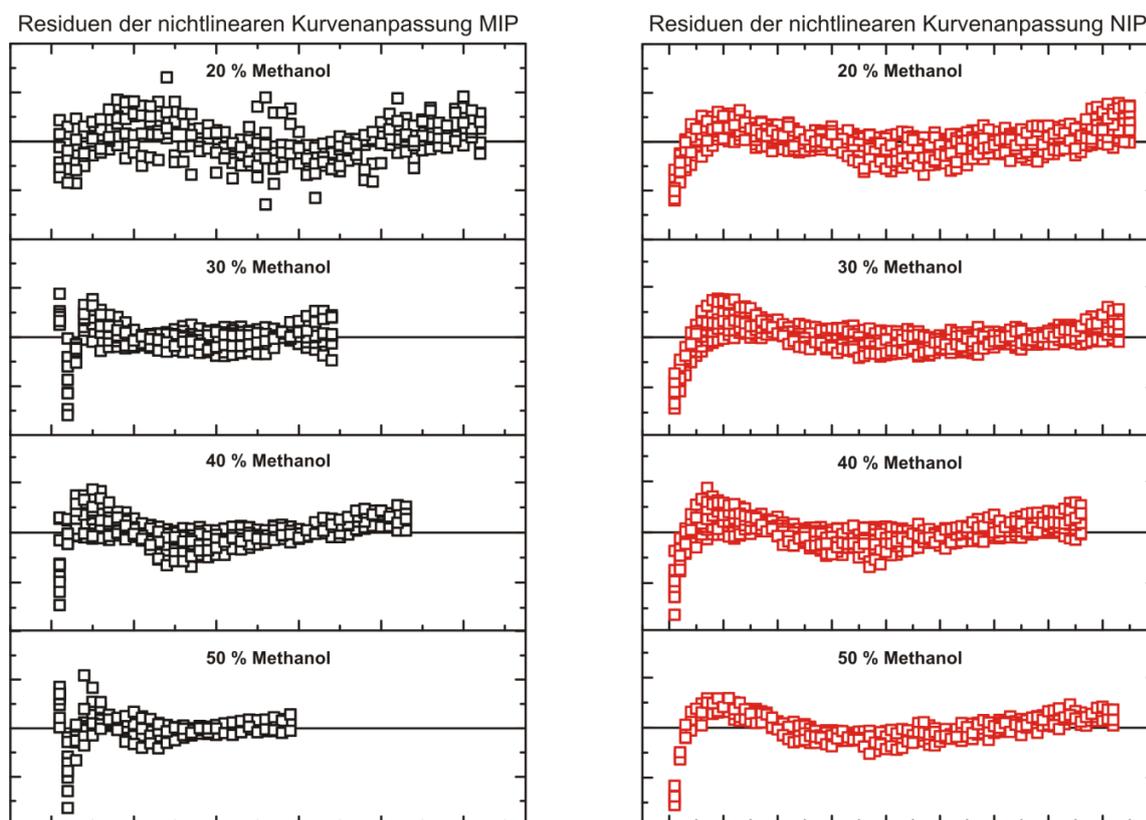
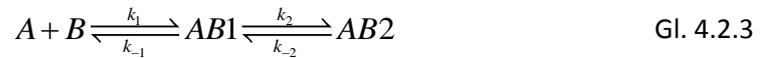


Abbildung 42: Residuenanalyse der nichtlinearen Anpassung der Assoziationsphase. Dargestellt sind jeweils die Residuen aller Kurvenanpassungen der Messungen bei dem jeweiligen Methanolgehalt. Links: Geprägtes Polymer; Rechts: Nicht geprägtes Polymer.

Um diesem vom bimolekularen Bindungsmodell abweichenden Verhalten Rechnung zu tragen, wurden verschiedene andere Modelle zur kinetischen Analyse der Assoziationsphase evaluiert. Zunächst wurde als alternatives Modell untersucht, ob für das MIP eine biexponentielle Beschreibung der Assoziationsphase, analog der biexponentiellen Beschreibung der Dissoziationsphase, besser geeignet ist, um den gesamten Verlauf der Assoziationsphase zu beschreiben. Bei einem solchen Fit waren die erhaltenen Residuen zwar statistisch verteilt, allerdings konnte aufgrund der vielen Freiheitsgrade der Funktion kein globales Minimum gefunden werden. Folglich waren auch die durch den Fit ermittelten Ratenkonstanten wenig sinnvoll. Selbst bei der Durchführung eines globalen Fits unter Verwendung der in Kapitel 4.2.3.1 ermittelten Dissoziationsratenkonstanten und der Konzentration als fixe Parameter konnte kein globales Minimum erreicht und somit auch keine sinnvollen Ratenkonstanten bestimmt werden.

Als weitere Alternative wurde evaluiert, ob nicht eine Bindungskinetik einer Folgereaktion (siehe Gl. 4.2.3) vorliegt. Denkbar wäre, dass das Templatmolekül zunächst locker an der Oberfläche

des MIP gebunden ist und erst durch Diffusion innerhalb des Partikels zur finalen Bindungsstelle findet. Zum Bindungssignal tragen dabei AB1 und AB2 gleichermaßen bei.



Allerdings existiert keine analytische Lösung für diese Gleichung, die direkt an den Kurvenverlauf angepasst werden kann. Eine näherungsweise Kurvenanpassung auf Basis der Differentialgleichungen, die sich aus den Geschwindigkeitsgesetzen ergeben, ist allerdings mit einer geeigneten Software (z.B. Scientist 3.0) möglich. Jedoch zeigten sich auch bei dieser Kurvenanpassung erhebliche systematische Abweichungen vom tatsächlichen Kurvenverlauf, die in ihrer Ausprägung noch größer waren als für das bimolekulare Bindungsmodell. Die Kinetik einer Folgereaktion beschreibt das Assoziationsverhalten der MIPs demnach nur unzureichend.

Da die untersuchten alternativen Bindungsmodelle zur Beschreibung der gesamten Assoziationsphase ungeeignet waren, wurde untersucht, ob die systematischen Abweichungen durch Nichtberücksichtigung des Anfangsbereiches der Assoziationsphase reduziert werden können. Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, kommt es hierdurch zu einer erheblichen Reduktion der absoluten Größe der Residuen als auch hinsichtlich der Systematik ihrer Abweichungen.

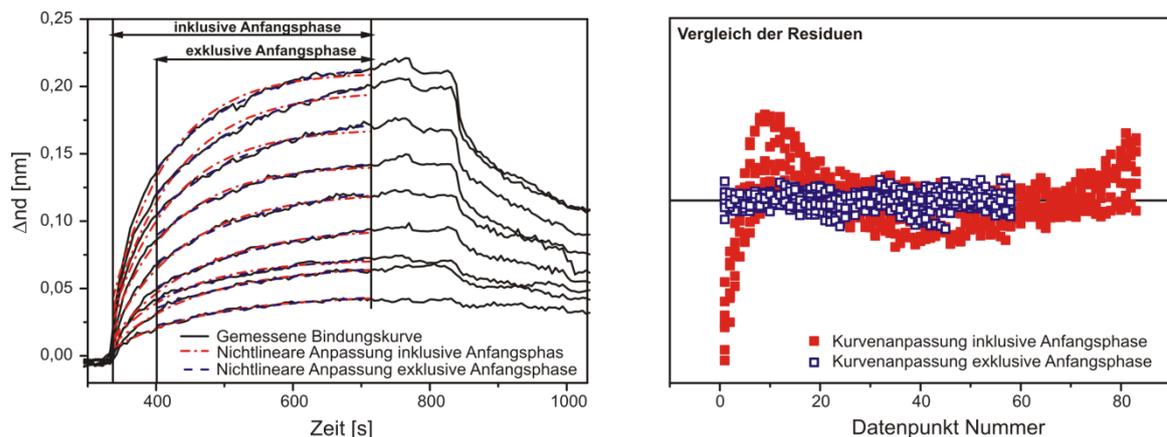


Abbildung 43: Vergleich der Residuen für den Fit der Assoziationsphase der Messung der Wechselwirkung des MIP in 30 % Methanol.

Bei der Auswertung der Dissoziationsphase wurde bereits gezeigt, dass das MIP eine schnellere Dissoziation aufweist als das NIP. Die höhere Affinität des MIP muss daher durch eine schnellere Assoziation im Vergleich zum NIP erzielt werden. Das bedeutet demzufolge, dass hochaffine Bindungsstellen ebenfalls eine schnellere Kinetik aufweisen müssen als niederaffine Bindungsstellen. Zu Beginn der Assoziation findet daher vor allem eine Belegung dieser hochaffinen Bindungsstellen statt. Zu einem späteren Zeitpunkt der Assoziation sind die wenigen hochaffinen Bindungsstellen weitestgehend abgesättigt und das Bindungssignal wird überwiegend durch Belegung der verbleibenden Bindungsstellen verursacht. Das Signal enthält also Informationen über die Kinetik der Wechselwirkung der am häufigsten auftretenden Bindungsstellen. Wie aus den nun statistisch verteilten Residuen hervorgeht, lässt sich deren Assoziationsverhalten in guter Näherung durch ein bimolekulares Bindungsmodell beschreiben.

Ebenfalls spricht für diese Theorie, dass die ermittelten Assoziationsratenkonstanten und Dissoziationsratenkonstanten, die aus der Kurvenanpassung exklusive der Anfangsphase resultieren kleiner sind, als diejenigen, die sich aus der Kurvenanpassung inklusive der Anfangsphase ergeben, wie im nächsten Abschnitt aufgezeigt wird.

Ermittlung der Assoziationsratenkonstanten

Trägt man die bei der nichtlinearen Kurvenanpassung erhaltenen scheinbaren Ratenkonstanten gegen die Konzentration auf, so kann man aus der Steigung der Kurven die Assoziationsratenkonstante erhalten. Aus dem Ordinatenabschnitt ist die Dissoziationsratenkonstante erhältlich, wobei dies zu eher ungenauen Werten führt (siehe Theorieteil, Kapitel 3.4.4).

Die Auftragung der scheinbaren Ratenkonstanten gegen die Konzentration ist in Abbildung 44 gezeigt. Die für das MIP ermittelten Konstanten sind in Tabelle 14 aufgelistet, diejenigen für das NIP in Tabelle 15.

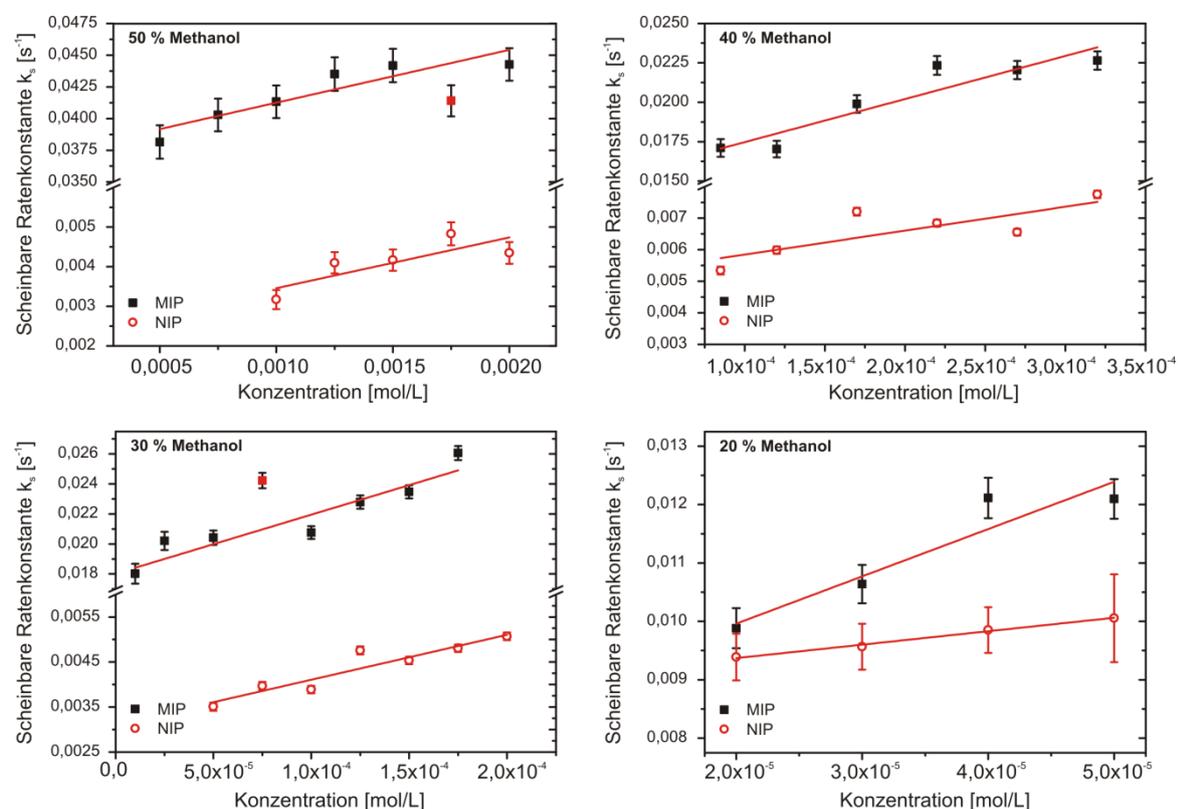


Abbildung 44: Auftragung der durch nichtlineare Kurvenanpassung der Assoziationsphase ermittelten scheinbaren Ratenkonstanten gegen die Konzentration. Oben links: 50 % Methanol, oben rechts: 40 % Methanol, unten links: 30 % Methanol, unten rechts: 20 % Methanol. Zu beachten ist die teilweise andere Skalierung für MIP und NIP. Schwarze Quadrate: Werte für das MIP, offene rote Kreise: Werte für das NIP. Für das MIP maskierte Werte sind als rote Quadrate dargestellt.

Bei einem Methanolgehalt von 20 % ist für das NIP bei einer Auswertung inklusive der Anfangsphase keine sinnvolle Assoziationsratenkonstante ermittelbar. Durch die geringe Löslichkeit erhält man bei einem Methanolgehalt von 20 % nur sehr geringe Signale. Daher stützt sich die Auswertung nur auf vier verschiedene Datenpunkte. Bei der Auswertung inklusive der Anfangsphase wich einer dieser vier Werte systematisch ab. Da sich eine Auswertung folglich nur

auf drei Werte stützen würde, wird auf die Angabe einer Assoziationsratenkonstante verzichtet. Für die weitere Auswertung werden ausschließlich die Werte verwendet, die ohne Berücksichtigung der Anfangsphase ermittelt wurden.

Tabelle 14: Assoziationsratenkonstanten und Dissoziationsratenkonstanten für das geprägte Polymer, ermittelt auf Basis eines bimolekularen Modells aus der Steigung der Auftragung der scheinbaren Ratenkonstante k_s gegen die Konzentration.

Methanolgehalt in %	inklusive Anfangsphase				exklusive Anfangsphase			
	[L·mol·s ⁻¹]		[s ⁻¹]		[L·mol·s ⁻¹]		[L·mol·s ⁻¹]	
	k_a	Δk_a	k_d	Δk_d	k_a	Δk_a	k_d	Δk_d
50	10,2	1,7	0,0377	0,0021	5,3	1,2	0,035	0,0015
40	32,2	4,3	0,0195	0,0009	27,3	5,2	0,015	0,0011
30	56,4	7,3	0,0162	0,0009	39,4	6,9	0,018	0,0008
20	79,4	18,2	0,0090	0,0007	81,0	19,7	0,008	0,0008

Tabelle 15: Assoziationsratenkonstanten und Dissoziationsratenkonstanten für das nicht geprägte Polymer, ermittelt auf Basis eines bimolekularen Modells aus der Steigung der Auftragung der scheinbaren Ratenkonstante k_s gegen Konzentration.

Methanolgehalt in %	inklusive Anfangsphase				exklusive Anfangsphase			
	[L·mol·s ⁻¹]		[s ⁻¹]		[L·mol·s ⁻¹]		[L·mol·s ⁻¹]	
	k_a	Δk_a	k_d	Δk_d	k_a	Δk_a	k_d	Δk_d
50	2,7	0,7	0,0062	0,0010	1,3	0,5	0,002	0,0008
40	12,7	3,6	0,0078	0,0009	7,6	2,8	0,005	0,0006
30	16,78	2,3	0,0048	0,0003	10,0	1,6	0,003	0,0002
20	-	-	-	-	23,03	1,84	0,009	0,0001

Für die hier untersuchten MIPs wurden bereits kinetische Konstanten in homogener Phase ermittelt. Hierbei wurde für ein Lösemittelgemisch von 25 % Methanol eine Assoziationsratenkonstante von 93 L·mol·s⁻¹ für die Wechselwirkung von L-BFA mit dem geprägten Polymer in homogener Phase publiziert [40]. Interpoliert man die mittels RIFS bestimmten Assoziationsratenkonstanten zwischen den Werten für 20 % Methanol und 30 % Methanol, so erhält man einen Wert von ungefähr 60 L·mol·s⁻¹ und somit eine recht gute Übereinstimmung, so dass von einer Richtigkeit der ermittelten Assoziationsratenkonstanten ausgegangen werden kann. Der geringere Wert für die Assoziationsratenkonstante an der heterogenen Phase kann dadurch verursacht werden, dass die Zugänglichkeit der Bindungsstelle im Vergleich zur homogenen Phase leicht reduziert ist.

Trendbetrachtung

Für alle untersuchten Lösemittelzusammensetzungen erhält man für das MIP ungefähr vier Mal höhere Assoziationsratenkonstanten als für das NIP, wobei das Verhältnis aus $k_{a,MIP}$ zu $k_{a,NIP}$ einen leicht abnehmenden Trend mit zunehmendem Wassergehalt zeigt. Mit zunehmendem Wassergehalt steigen hierbei die Assoziationsratenkonstanten von geprägtem und nicht

Ergebnisse und Diskussion

geprägtem Polymer an. Das MIP zeigt einen deutlich stärkeren Anstieg der Assoziationsratenkonstanten mit zunehmendem Wassergehalt als das NIP (siehe Abbildung 45 links).

Der generelle Anstieg der Assoziationsratenkonstanten ist durch die schlechtere Solvatisierung des Templatmoleküls bei geringerem Wassergehalt bedingt. In die Kinetik einer Affinitätsreaktion fließt die Aktivierungsenergie dieser Reaktion mit ein, welche sich wiederum aus der energetischen Differenz aus Übergangszustand und Ausgangszustand ergibt. Wird der Ausgangszustand energetisch angehoben (z.B. durch eine schlechtere Solvatisierung), verringert sich auch die Differenz zwischen Ausgangszustand und Übergangszustand und somit auch die Aktivierungsenergie. Die Geschwindigkeitskonstante ist nach Arrhenius proportional zum natürlichen Logarithmus der Aktivierungsenergie. Durch die Auftragung der logarithmierten Werte der Geschwindigkeitskonstanten (siehe Abbildung 45 rechts) erhält man somit Aufschluss darüber, ob es lösemittelabhängige Beiträge zur Bindungskinetik gibt, die sich für MIP und NIP unterschiedlich auswirken.

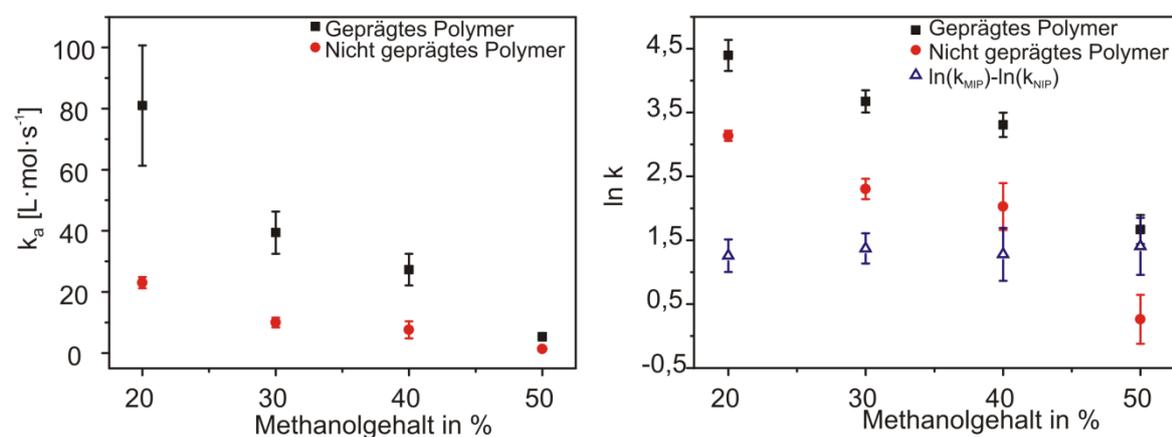


Abbildung 45: Natürlicher Logarithmus der Affinitätsratenkonstanten von MIP und NIP in Abhängigkeit der Lösemittelzusammensetzung

Wie Abbildung 45 zeigt, ist hier kein Unterschied zwischen MIP und NIP in der Trendbetrachtung zu sehen. Die Differenz der logarithmierten Werte ist innerhalb der Fehlerbereiche gleich, die Zunahme der Geschwindigkeitskonstante ist demnach durch eine Destabilisierung des Templatmoleküls bei kleinerem Wassergehalt bedingt.

Die prinzipiell schnellere Bindungskinetik für das MIP resultiert aus dessen höherer Porosität und der somit schnelleren Sorption ins Polymer und der schnelleren Diffusion innerhalb des Polymers. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Wechselwirkung stellt somit die Sorption ins Polymer dar und nicht das passgenaue Einfinden am finalen Ort der Anbindung.

Berechnung der Affinitätskonstanten aus kinetischen Konstanten

Die Affinitätskonstante kann ebenfalls aus dem Quotienten aus k_a und k_d berechnet werden (siehe Theorieteil Gl. 2.2.12). Für diese Berechnung wurden für das MIP hierbei die auf Basis des monoexponentiellen Zerfalls ermittelten Dissoziationsratenkonstanten verwendet, da mit dieser Konstante die mittlere Geschwindigkeit der Dissoziation des MIP widerspiegelt. Wie in Abbildung 46 zu erkennen ist, sind die Affinitätskonstanten die nach Scatchard bestimmt wurden allesamt um einen Faktor von ungefähr 10 größer. Diese Abweichungen zeigen auf, dass bei der

kinetischen Analyse die ablaufenden Wechselwirkungsprozesse nicht vollständig erfasst wurden. So werden bei der Assoziation und der monoexponentiellen Beschreibung der Dissoziationsphase die Beiträge der hochaffinen Bindungsstellen nicht vollständig berücksichtigt. Zudem wurde durch den Einfluss der Rückbindung nur die Anfangsphase der Dissoziation verwendet. Zu Beginn der Dissoziationsphase kommt es vermehrt zur Abdissoziation aus niederaffinen Bindungsstellen. Stärker gebundenes Templatmolekül trägt also in der Anfangsphase der Dissoziation deutlich weniger bei, die ermittelte k_d scheint hierdurch größer.

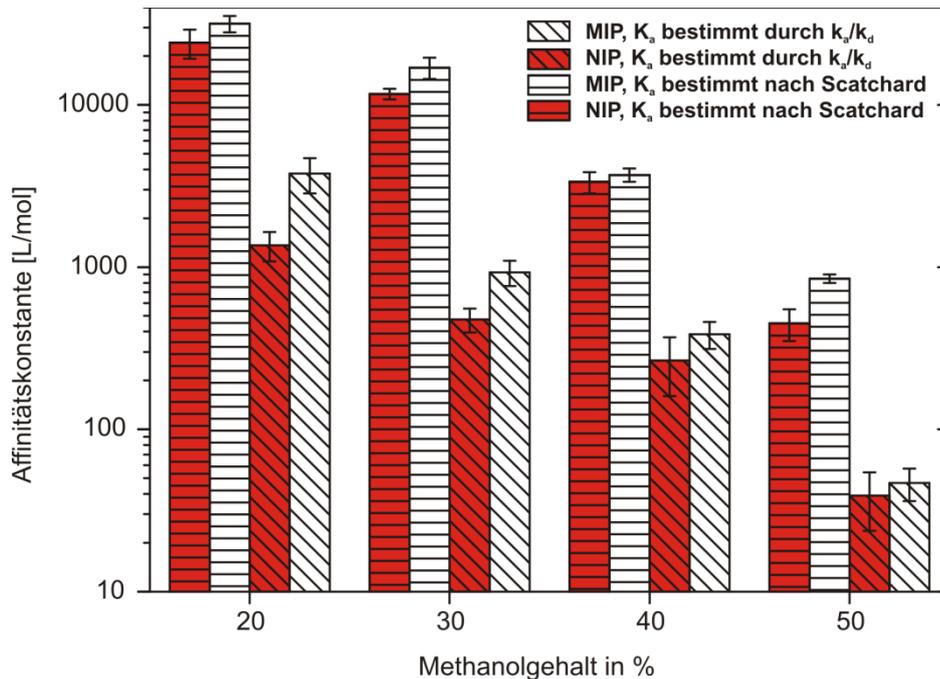


Abbildung 46: Graphische Darstellung des Vergleichs der Affinitätskonstanten ermittelt aus der kinetischen Analyse und aus der Analyse des Gleichgewichtbindungssignals nach Scatchard.

Diese Effekte zusammengenommen erklärt demnach die systematische Abweichung der aus den kinetischen Konstanten berechneten Affinitätskonstanten hin zu geringeren Werten. Durch diese Analyse wird allerdings klar, dass auch das NIP über unterschiedlich affine Bindungsstellen verfügen muss.

4.2.4 Bestimmung der Bindungsenthalpie der Wechselwirkung

4.2.4.1 Messtechnische Anforderungen

Um weitere Einblicke in die ablaufenden Prozesse bei der Anbindung des Templatmoleküls zu erhalten, wurde die Enthalpie der Wechselwirkung zwischen den Polymerpartikeln und dem Templatmolekül bestimmt. Der klassische im Theorieteil abgehandelte Ansatz zur Bestimmung der Enthalpie und Gleichgewichtskonstanten mittels ITC lässt sich für dieses System allerdings nicht gut realisieren. Für den im Theorieteil (Kapitel 2.2.6) dargestellten Ansatz ist es nötig, die molare Menge von Ligand und Rezeptor genau zu kennen. Bei einem MIP, das pro Partikel über eine Vielzahl an Bindungsstellen verfügt, ist eine molare Angabe der Rezeptorstoffmenge sehr ungenau und wäre nur durch extrapolative Bestimmung der maximalen Bindungskapazität bezogen auf die Partikelmenge möglich. Ein fehlerhafter Wert bei der Anzahl an Bindungsstellen pro Partikelmenge hat hierbei sehr große Auswirkungen auf die durch die nichtlineare

Kurvenanpassung ermittelte Enthalpie. Zudem ist die Affinitätskonstante der Wechselwirkung zwischen MIP bzw. NIP und Templatmolekül relativ klein, der resultierende c-Wert dementsprechend auch. Bei einem geringen c-Wert ist eine verlässliche Bestimmung der Enthalpie jedoch nur bedingt möglich. Eine beliebige Anpassung der Konzentration hin zu einem höheren c-Wert ist für dieses System aufgrund der begrenzten Löslichkeit von L-BFA ebenfalls nicht möglich.

Da jedoch allein die Enthalpie der Wechselwirkung bestimmt werden sollte und nicht auch zusätzlich die Affinitätskonstante, bietet sich eine alternative Bestimmungsmethode an. Bei dieser alternativen Bestimmungsmethode wird die freigesetzte Wärmemenge der Wechselwirkung ermittelt, anschließend werden die Polymerpartikel abgetrennt und die nicht gebundene Stoffmenge des Templatmoleküls wird bestimmt. Die gebundene Stoffmenge ist hierbei gleich der Differenz zwischen der vorgelegten Stoffmenge und der nicht gebundenen Stoffmenge. Durch Division der freigesetzten Wärmemenge durch die gebundene Stoffmenge kann so die Wechselwirkungsenthalpie ermittelt werden. Für diesen Ansatz bedarf es keinerlei Annahmen oder Annäherungen bezüglich der Stoffmenge an Polymerpartikeln, nur die vorgelegte Stoffmenge des Templatmoleküls fließt in die Berechnung ein, welche hierbei selbst gewählt werden kann. Kritisch ist für diese Methode (wie auch für den klassischen Ansatz siehe Kapitel 3.3.3) die genaue Ermittlung der der Wechselwirkung zuzurechnenden Wärmemenge. Hierzu bedarf es einer exakten Bestimmung des Untergrundes, sprich der Bestimmung des Anteils an freigesetzter Wärmemenge, die nicht durch die Anbindung des Analyten, sondern allein durch die Injektion der Polymerpartikel verursacht wird.

Wegen der geringen Löslichkeit des Templatmoleküls ist es hierbei erforderlich, das Templatmolekül vorzulegen und die Polymerpartikel zu injizieren. Da ein möglichst hohes Messsignal angestrebt wird, wird die Konzentration des Templatmoleküls so gewählt, dass die maximale Löslichkeit nur geringfügig unterschritten wird. Die Wahl des Injektionsvolumens sowie die Konzentration der Partikel werden durch mehrere Parameter bestimmt:

1. Der Untergrund sollte möglichst gering sein, was zum einen durch eine möglichst geringe Abweichung der stofflichen Zusammensetzung des Titranten vom Titranden erreicht wird und zum anderen durch die Wahl möglichst geringer Injektionsvolumina.
2. Man möchte ein maximal hohes Signal für die Wechselwirkung zwischen Polymerpartikeln und Templatmolekül erzielen. Dies wird erreicht, wenn durch eine Injektion bereits die zur Sättigung notwendige Menge an Partikeln injiziert wird, sprich eine möglichst hohe Konzentration an Partikeln bzw. ein großes Injektionsvolumen gewählt wird.
3. Möglichst geringer Verbrauch an Materialien. Da nicht eine unbegrenzte Menge an Partikeln einer Charge zur Verfügung steht, möchte man den Verbrauch so gering wie möglich halten.

Die sich aus diesen 3 Punkten ergebenden Forderungen stehen allerdings im Widerspruch zueinander, so dass nicht alle Parameter gleichzeitig optimiert werden können. Zudem ist die maximale Partikelkonzentration, die gewählt werden kann, durch die Stabilität der Suspension limitiert. Durch Vorversuche wurde festgestellt, dass bei einem Wert von 50 mg/mL die

Suspension noch stabil und keine Sedimentation der Partikel zu beobachten ist, weshalb diese Partikelkonzentration für die Versuche gewählt wurde.

Der erste Ansatz beruhte darauf, ein möglichst hohes Signal für die Wechselwirkung zwischen Polymerpartikel und Templatmolekül zu erzielen. Hierfür wurde ein Volumen von 100 μL auf einmal injiziert. Dieser Ansatz erwies sich jedoch wegen dem sehr hohen Untergrundsignal sowie starken Schwankungen zwischen den Messungen als untauglich. Die beobachteten hohen Schwankungen wurden vermutlich durch eine nicht konstante Raumtemperatur zwischen den einzelnen Messungen hervorgerufen. Durch das große Injektionsvolumen kann nicht das gesamte Volumen im Kalorimeter vortemperiert werden - Schwankungen in der Raumtemperatur wirken sich somit direkt auf die Mischungswärme aus, was zu einem stark unterschiedlichen Untergrund für die einzelnen Messungen führt.

Durch eine Reduktion des Injektionsvolumens auf 20 μL können diese Probleme gelöst werden, so dass recht geringe Abweichungen zwischen den einzelnen Messungen erhalten werden. Insgesamt werden 4 Injektionen pro Messung durchgeführt, so dass auch für das nicht geprägte Polymer eine ausreichend hohe Wärmemenge detektiert werden kann. Für die Referenzmessung werden 4 mal 20 μL einer NIP Suspension in das entsprechende Lösemittelgemisch ohne L-BFA injiziert. Die genauen Versuchsparameter für die einzelnen Messungen in den verschiedenen Lösemittelgemischen können Tabelle 3 in Kapitel 3.6.6 entnommen werden.

4.2.4.2 Ergebnisse der Bestimmung der Wechselwirkungsenthalpie

In Abbildung 47 ist die gemessene Wärmeleistung für die verschiedenen Interaktionen sowie die durch Integration erhaltene detektierte Wärmemenge exemplarisch für die Messungen in 40 % Methanol dargestellt. Die Messungen in den anderen untersuchten Solvenszusammensetzungen zeigten einen analogen Verlauf, so dass auf eine Darstellung aller Messungen verzichtet wurde. Die ermittelten Wärmemengen, die angebundene Stoffmenge sowie die aus diesen beiden Größen berechnete Wechselwirkungsenthalpie sind in Tabelle 16 aufgelistet. Als Referenzmessung wurden NIPs in eine Lösung ohne Templatmolekül injiziert.

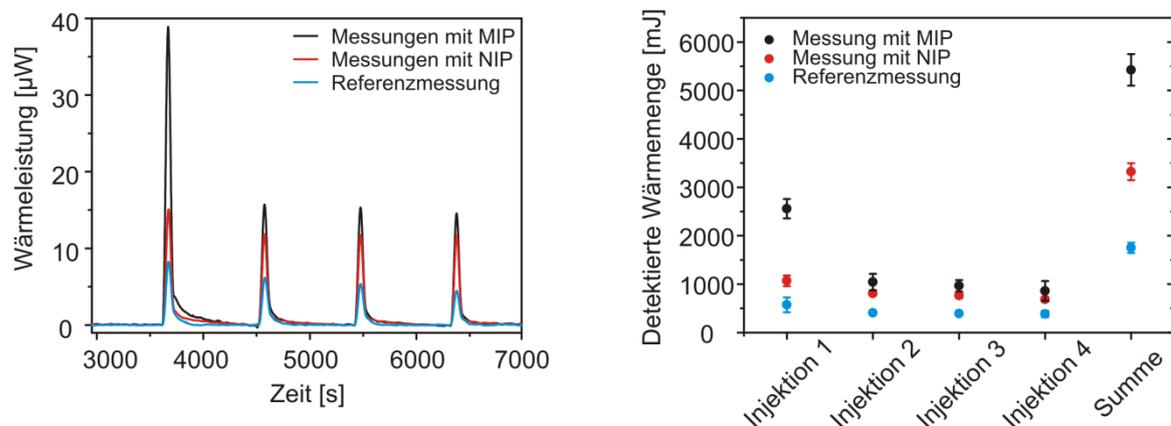


Abbildung 47: Links: Detektierte Wärmeleistung für die Wechselwirkung der Polymerpartikel mit L-BFA in 40 % Methanol sowie die dazugehörige Referenzmessung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils drei Messungen. Schwarz: Messungen mit geprägtem Polymer, rot: Messungen mit nicht geprägtem Polymer, blau: Referenzmessungen. Rechts: Durch die Integration der Wärmeleistung erhaltene detektierte Wärmemenge für die jeweiligen Injektionen.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 16: Ergebnisse der ITC-Messungen bei unterschiedlichem Methanolgehalt: Wärmemenge für MIP, NIP und Referenzmessung, adsorbierte Stoffmenge sowie die daraus berechnete Wechselwirkungsenthalpie

	Freigesetzte Wärme gemessen [mJ]		Freigesetzte Wärme abzgl. Referenz [mJ]		Adsorbierte Stoffmenge [nmol]		Wechselwirkungsenthalpie [kJ/mol]	
	Wert	sdv	Wert	sdv	Wert	sdv	Wert	sdv
20 % MIP	3,53	0,3	1,37	0,37	84,7	0,44	-16,1	4,4
20 % NIP	2,73	0,09	0,57	0,24	69,9	2,29	-8,1	3,4
20 % Ref	2,17	0,23						
30 % MIP	3,72	0,19	1,97	0,22	129,4	1,9	-15,2	1,7
30 % NIP	2,16	0,05	0,41	0,12	105,5	2,0	-3,9	1,1
30 % Ref	1,75	0,11						
40 % MIP	5,43	0,33	3,78	0,36	276,8	13,5	-13,6	1,4
40 % NIP	3,32	0,17	1,67	0,22	200,7	15	-8,3	1,3
40 % Ref	1,65	0,14						
50 % MIP	4,89	0,65	3,48	0,67	397,8	58,6	-8,8	2,1
50 % NIP	2,86	0,37	1,45	0,4	293,0	30,9	-5,0	1,5
50 % Ref	1,41	0,14						

Wie aus den Ergebnissen zu erkennen ist, erhält man für das geprägte Polymer für alle Lösemittelgemische eine höhere Wechselwirkungsenthalpie als für das nicht geprägte Polymer. Hierbei ist eine Zunahme der Wechselwirkungsenthalpie mit steigendem Wassergehalt für das geprägte Polymer zu beobachten. Beim NIP ist dieser Trend ebenfalls sichtbar, jedoch ist er nicht so eindeutig ausgeprägt wie beim MIP. Eine genaue Beurteilung ist schwierig, da die Messungen bei einem Methanolgehalt von 20 % recht hohe Schwankungen zeigen. Dies ist bedingt durch die geringe adsorbierte Stoffmenge in diesem Lösemittelgemisch. Durch den kleinen Nenner bei der Berechnung wirkt sich der Messfehler der ITC-Messung relativ stark aus. Da bei einem Methanolgehalt von 10 % die Löslichkeit noch geringer ist und somit der Fehlereinfluss noch mehr zunimmt, wird hier von weiteren Messungen abgesehen.

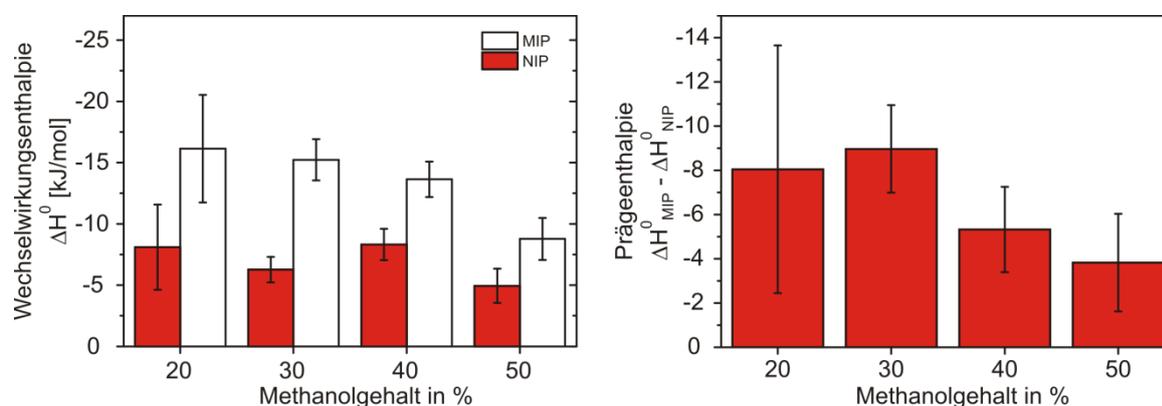


Abbildung 48: Wechselwirkungsenthalpie (links) von geprägtem und nicht geprägtem Polymer in Abhängigkeit des Methanolgehalts und daraus berechnete Prägeenthalpie (rechts).

Die Prägeenthalpie nimmt hierbei mit zunehmendem Wassergehalt ebenfalls zu und durchläuft ein Maximum bei 30 % Methanol. Einschränkend muss man jedoch darauf hinweisen, dass, bedingt durch den großen Fehler bei der Messung mit einem Methanolgehalt von 20 %, auch eine höhere Bindungsenthalpie bei 20 % im Bereich des Möglichen liegt. Die beobachtete maximale Enantioselektivität bei einem Methanolgehalt von 30 % und die beobachtete Verringerung des Prägeeffektes (siehe Kapitel 4.2.1) sprechen jedoch eher für eine weitere Verringerung der Prägeenthalpie bei kleinem Methanolgehalt.

Von Weber et. al. [78] ist eine Untersuchung der Wechselwirkungsenthalpie dieser MIPs bereits beschrieben. In dieser Publikation wird für das MIP ein Wert von $-21,1 \pm 1,7$ kJ/mol, für das NIP ein Wert von $-0,5 \pm 0,6$ kJ/mol für die Wechselwirkungsenthalpie bei einem Methanolgehalt von 50 % angegeben. Die Methodik zur Bestimmung wich von der in dieser Arbeit verwendeten Methode ab. So wurde die Enthalpie in der Publikation über die nichtlineare Kurvenanpassung der Titrationskurve bestimmt (wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben), was genau die Methode darstellt, gegen die sich in dieser Arbeit explizit entschieden wurde. In der Publikation bleibt unklar, wie die Bestimmung der molaren Stoffmenge an Bindungsstellen durchgeführt wurde und welcher Wert hierfür erhalten wurde. Zudem wurden die sich aus dem Fit ergebenden Assoziationskonstanten nicht angegeben. Beide Angaben sind allerdings zwingend erforderlich, wenn die Güte und die Konsistenz der publizierten Bindungsenthalpien mit den gezeigten Titrationskurven bewertet werden soll. Eine grobe Abschätzung dieser Unstimmigkeit ergibt sich aus den in dieser Publikation abgebildeten Titrationskurven. Diese zeigen einen Ordinatenwert von ca. $-1,8$ kJ/mol mit einer Wisemankonstante, die aus dem Kurvenverlauf rückschließend im Bereich zwischen 1 und 5 liegen muss. Dies kann allerdings rechnerisch auf Basis von Gl. 2.2.24 nicht stimmig sein mit einer 10-mal so großen Wechselwirkungsenthalpie von $-21,1$ kJ/mol. Realistisch wäre auf Basis dieser Titrationskurve eine Wechselwirkungsenthalpie im Bereich zwischen 3 und 6 kJ/mol. Auch ist nicht erläutert, ob als Referenzexperiment Partikel injiziert wurden, oder ob nur die Verdünnungsenthalpie der in der Vorlage befindlichen L-BFA Lösung bestimmt wurde (was bei Betrachtung der dargestellten Messdaten naheliegender ist). Aus diesen Gründen erübrigt sich ein Vergleich mit den bereits publizierten Werten.

4.2.4.3 Ursachen der Lösemittelabhängigkeit der Wechselwirkungsenthalpie

Die Wechselwirkung zwischen Templatmolekül und Polymer lässt sich nach dem Satz von Hess in mehrere Beiträge zerlegen (siehe Gl. 4.2.4). Für die Desolvatisierung des Templatmoleküls wie für die Desolvatisierung der Bindungstasche muss Energie aufgebracht werden, bei der Anbindung des Templatmoleküls in der Bindungstasche wird Energie frei.

$$\Delta H^0 = \Delta H^0_{\text{Desolvatisierung Templatmolekül}} + \Delta H^0_{\text{Desolvatisierung Bindungstasche}} + \Delta H^0_{\text{Anbindung in Bindungstasche}} \quad \text{Gl. 4.2.4}$$

Die Energie, die für die Desolvatisierung des Templatmoleküls aufgebracht werden muss, wirkt sich für MIP und für NIP gleichermaßen aus. Stabilisierende Beiträge zur Solvatisierung durch Van-der-Waals Wechselwirkungen nehmen durch eine Erhöhung der Dielektrizitätskonstante des Mediums von ca. 44 bei einem Methanolgehalt von 50 % auf 60 bei einem Methanolgehalt von 20 % [79] entsprechend um den Faktor 1,36 ab. Der Beitrag dieses Terms wird somit geringer, es kommt zu einer Erhöhung der Wechselwirkungsenthalpie von MIP und NIP.

Ebenfalls von Bedeutung sind die Beiträge der Desolvatisierung der Bindungstasche im Polymer. Bevor ein Templatmolekül anbinden kann, müssen zunächst die Lösemittelmoleküle, mit denen die Bindungstasche gefüllt ist, verdrängt werden. In dem hier betrachteten konkreten Fall sind die Partikel ein Copolymer, bestehend aus dem unpolaren Quervernetzer Ethylenglycoldimethylacrylat und dem funktionellen Monomer Methacrylsäure. Letztere kann Wasserstoffbrückenbindungen hin zu Solvensmolekülen ausbilden. Wasser hat hierbei die stärkere Tendenz zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen als Methanol, folglich ist die erforderliche Enthalpie zum Verdrängen der Solvensmoleküle bei einem höheren Wassergehalt größer. Des Weiteren ist der Energiebeitrag, der für diesen Prozess aufgebracht werden muss, natürlich auch abhängig von der konkreten Ausprägung der Bindungstasche bzw. von der zugänglichen inneren Oberfläche der Partikel. Im NIP sind die Bindungstaschen nur schwach ausgeprägt und die innere Oberfläche ist geringer. Man hat bei diesem Term also lösemittelabhängige Beiträge, die für das geprägte Polymer betragsmäßig größer sind als für das nicht geprägte Polymer.

Der letzte Beitrag ist die Wärmemenge, die bei der Anbindung des Templatmoleküls in die Bindungstasche freigesetzt wird. Die höhere Bindungsenthalpie für das MIP wird demnach durch diesen Beitrag verursacht. Dieser Beitrag ist durch den Prägeprozess bedingt höher für das MIP als für das NIP, da für Ersteres die Bindungstasche eine komplementäre Struktur zum Templatmolekül besitzt. Es ist hierbei eine Abhängigkeit der Prägeenthalpie ($\Delta H_{\text{MIP}}^0 - \Delta H_{\text{NIP}}^0$) vom Solvens zu beobachten (siehe Abbildung 48 rechts). Zudem wurde durch mehrere unabhängig voneinander durchgeführte Experimente gezeigt, dass bei einem Methanolgehalt von 30 % ein Maximum der Selektivität erhalten wird. Den oben dargelegten Ausführungen folgend kann nur der letzte Term in Gl. 4.2.4 zu einer Steigerung der Prägeenthalpie bei hohem Wassergehalt beitragen. Demnach bedeutet dies, dass mit sich änderndem Methanolgehalt auch die Besetzung von Bindungsstellen, die zu einer hohen Wechselwirkungsenthalpie führen, ändert. Da die freigesetzte Wechselwirkungsenthalpie mit der Zahl der Interaktionen zwischen Templatmolekül und den funktionellen Monomeren zunimmt kann man folgern, dass bei zunehmendem Wassergehalt auch zunehmend Bindungstaschen mit hoher Selektivität belegt werden. Dies erklärt die beobachtete höhere Selektivität bei einem hohen Wassergehalt, erklärt allerdings noch nicht, weshalb eine Verringerung des Prägeeffektes erhalten wird. Durch zusätzliche Betrachtung der Bindungsentropie der Wechselwirkung erhält man jedoch zusätzlich Informationen, um diese Frage aufzuklären.

4.2.4.4 Betrachtung der Bindungsentropie

Die Berechnung der Entropie der Wechselwirkung kann mittels der Gibbs-Helmholtz Gleichung (Theorieteil, Gl. 2.2.14) erfolgen. Zuvor muss dafür aus den in Kapitel 4.2.2 gemessenen Affinitätskonstanten die freie Bindungsenthalpie gemäß Gl. 2.2.13 berechnet werden. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 17 aufgelistet. Abbildung 49 stellt diese Daten graphisch dar und zeigt zudem den relativen Anteil des entropischen Beitrags an der freien Wechselwirkungsenthalpie.

Tabelle 17: Affinitätskonstante, daraus berechnete freie Bindungsenthalpie und aus Enthalpie und freier Enthalpie errechnete Entropie der Wechselwirkung. Die Berechnung erfolgte für eine Temperatur von 20°C, bei der die Bindungsenthalpie bestimmt wurde. Ein Temperaturfehler von 4 °C wurde mit einberechnet, da die Bestimmung der Affinitätskonstanten bei Raumtemperatur und nicht bei exakt 20 °C durchgeführt wurde.

Methanolgehalt und Polymer	Affinitätskonstante [L·mol ⁻¹]		Freie Bindungsenthalpie der Wechselwirkung [kJ·mol ⁻¹]		Bindungsentropie der Wechselwirkung [J/mol·K]	
	K _A	ΔK _A	ΔG ⁰	ΔΔG ⁰	ΔS ⁰	ΔΔS ⁰
50 % / MIP	850	50	-16,44	0,14	26,1	7,2
50 % / NIP	450	100	-14,89	0,54	33,7	5,4
40 % / MIP	3.700	350	-20,02	0,23	21,9	4,8
40 % / NIP	3.350	500	-19,78	0,36	39,2	4,6
30 % / MIP	17.000	2.550	-23,74	0,37	29,1	5,9
30 % / NIP	11.700	900	-22,83	0,19	64,6	3,8
20 % / MIP	31.700	3.650	-25,26	0,28	31,1	15,0
20 % / NIP	24.150	4.900	-24,60	0,49	56,3	12,0

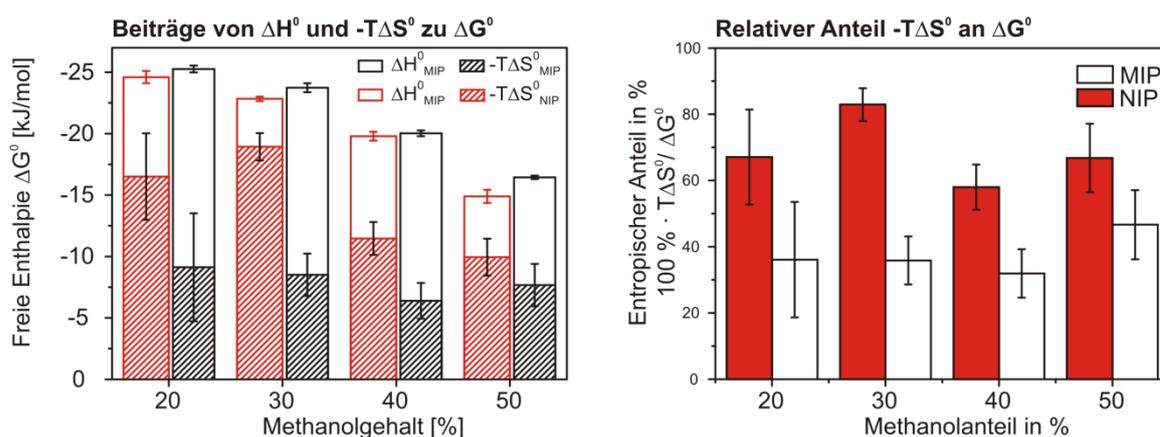


Abbildung 49: Links: Absoluter Beitrag von Entropie und Enthalpie zur Wechselwirkung zwischen Templatmolekül und geprägtem Polymer bzw. nicht geprägtem Polymer. Rechts: Relativer Anteil des entropischen Terms an der freien Bindungsenthalpie der Wechselwirkung.

Wie in Abbildung 49 zu erkennen ist, liegt der relative Anteil der Entropie an der freien Wechselwirkungsenthalpie beim NIP bei ca. 60 bis 80 %, für das MIP ist der relative Anteil deutlich geringer und liegt zwischen 30 und 50 %. Ein Trend in Abhängigkeit der Lösemittelzusammensetzung ist hier weder für das geprägte, noch für das nicht geprägte Polymer erkennbar.

Eine Aufteilung der Wechselwirkung in ihre einzelnen Beiträge, wie bereits für den enthalpischen Anteil aufgezeigt, kann auch bei der Betrachtung des entropischen Anteils der Wechselwirkung durchgeführt werden.

$$\Delta S^0 = \Delta S^0_{\text{Desolvatisierung Templatmolekül}} + \Delta S^0_{\text{Desolvatisierung Bindungstasche}} + \Delta S^0_{\text{Anbindung in Bindungstasche}} \quad \text{Gl. 4.2.5}$$

Aufgrund des hydrophoben Charakters des Templatmoleküls wird für den ersten Term, die Desolvatisierung des Templatmoleküls, ein Gewinn an Entropie durch hydrophobe Wechselwirkungen erwartet. Erhöht man den Wasseranteil, so steigt auch der Entropiegewinn durch diese hydrophoben Wechselwirkungen. Dieser Term wirkt sich dabei gleichermaßen für das MIP wie auch für das NIP aus. Für NIP und MIP ist ein Anstieg des Entropiegewinns bei Zunahme des Wassergehalts beobachtbar, nur ist die absolute Zunahme beim NIP deutlich stärker ausgeprägt. Für das MIP muss dieser Beitrag daher durch andere lösemittelabhängige Beiträge kompensiert werden.

Für die Betrachtung des Beitrages, der durch die Desolvatisierung der Bindungstasche verursacht wird, kann dasselbe Modell wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erläutert herangezogen werden. Bei der Verdrängung der Solvensmoleküle kommt es zu einer Erhöhung der Entropie des Systems, analog dem Verdrängen des Wassers aus der Bindungstasche von biologischen Erkennungselementen wie Antikörpern. Der Mechanismus ist somit derselbe wie bei hydrophoben Wechselwirkungen, was zur Folge hat, dass dieser Term bei steigendem Wassergehalt ebenfalls zunimmt. Jedoch führt dies, der Logik folgend, für das MIP zu einem höheren Entropiebeitrag im Gegensatz zum NIP, da die im MIP zugängliche Oberfläche um den Faktor 1,23 größer ist, wie durch Gas-Adsorptionsmessungen gezeigt werden konnte [40] und somit mehr Wasser aus der Bindungstasche verdrängt werden kann.

Da die beiden ersten Terme ausschließlich zu einer positiven Entropie führen und dabei entweder dem MIP eine noch größere Entropie zusprechen bzw. MIP und NIP denselben Entropieanteil, müssen die beobachteten Unterschiede durch den letzten Term in Gleichung Gl. 4.2.5 bedingt sein. Durch eine feste Anbindung des Templatmoleküls in der Bindungstasche des MIP und der damit verbundenen Einschränkung der molekularen Bewegungsfreiheitsgrade, besitzt dieser Term ein negatives Vorzeichen und erklärt somit, warum der Entropiegewinn beim MIP geringer ist als beim NIP. Die im Vergleich zum NIP schwach ausgeprägte Lösemittelabhängigkeit spricht dafür, dass dieser Term ebenfalls eine Abhängigkeit vom Solvens aufzeigen muss, um entsprechend zur Überkompensation von Term 1 und Term 2 beitragen zu können.

Hierfür spricht des Weiteren die beobachtete Abhängigkeit der Dissoziationsratenkonstante von der Lösemittelzusammensetzung (siehe Kapitel 4.2.4.3), die beim MIP weitaus stärker ausgeprägt ist als beim NIP. Bei einem höheren Wassergehalt kommt es demnach zu einer verstärkten Besetzung von Bindungsstellen hoher Selektivität. Die Dissoziationsratengeschwindigkeit wird dadurch verringert, da die Bindungstaschen passgenau ausgefüllt sind und die Moleküle fest angebunden sind. Bei einem geringeren Wassergehalt sind die Bindungstaschen nicht im selben Ausmaß aufgefüllt, die Bindung ist entsprechend schwächer und die sich hieraus ergebende Dissoziation schneller. Da die Belegung dieser hochselektiven Bindungstaschen mit einer erheblichen Einschränkung der molekularen Beweglichkeit verbunden ist, ist dies mit einer positiven Wechselwirkungsentropie verbunden.

Bei einem zunehmenden Wassergehalt kommt es nun zu einer zunehmenden Belegung eben dieser Bindungstaschen, wie durch die Experimente in Kapitel 4.2.4.3 gezeigt werden konnte. Dies führt zu der Steigerung der Selektivität des MIP mit zunehmendem Wassergehalt. Da diese Belegung allerdings entropisch ungünstig ist, steigt die freie Wechselwirkungsenthalpie für das

MIP nicht im selben Ausmaß wie für das NIP – die Erhöhung der Selektivität ist demnach mit einer Reduktion des Prägeeffektes verbunden.

4.2.5 Kurzzusammenfassung Thermodynamik und Kinetik der Wechselwirkung zwischen MIP, NIP und Templatmolekül

Die Analyse der Thermodynamik und Kinetik der Wechselwirkung führt zu folgenden experimentellen Feststellungen:

- Die Affinitätskonstante der niederaffinen Bindungsstellen der Partikel lässt sich mittels einer Scatchard Analyse des Bindungssignals bestimmen. Die Affinitätskonstante ist für das MIP größer als für das NIP, wobei beide mit steigendem Wassergehalt zunehmen.
- Das Dissoziationsverhalten des NIPs kann durch eine Kinetik erster Ordnung beschrieben werden. Für das MIP wird zur Beschreibung eine Überlagerung zweier Kinetiken erster Ordnung benötigt. Von den zwei Dissoziationsratenkonstanten für das MIP ist eine größer und eine kleiner als für das NIP. Mit zunehmender Affinität des MIP nimmt der Einfluss der langsameren Dissoziationsratenkonstante zu.
- Das Assoziationsverhalten kann (bis auf den Anfangsbereich) für MIP und NIP durch eine bimolekulare Reaktion angenähert werden. Die Assoziationsratenkonstanten sind lösemittelabhängig und nehmen mit zunehmendem Wassergehalt zu. Die Assoziationsratenkonstanten für das MIP sind stets größer als für das NIP.
- MIP und NIP weisen beide eine negative Wechselwirkungsenthalpie bei der Anbindung des Templatmoleküls auf. Die Prägeenthalpie ($\Delta H_{\text{MIP}}^0 - \Delta H_{\text{NIP}}^0$) ist lösemittelabhängig und durchläuft bei einem Methanolgehalt von 30 % ein Maximum.
- Bei der Anbindung des Templatmoleküls an das MIP oder an das NIP kommt es zu einem Entropiegewinn. Dieser ist für die Wechselwirkung mit dem NIP höher als für das MIP. Für MIP und NIP kommt es zu einer Zunahme des Entropiegewinns bei steigendem Wassergehalt, wobei diese Zunahme für das NIP stärker ausgeprägt ist als für das MIP.

Basierend auf diesen experimentellen Feststellungen können folgende Schlüsse bezüglich der ablaufenden Wechselwirkung gezogen werden:

Die zunehmende Affinität von MIP und NIP mit steigendem Wassergehalt wird hauptsächlich durch die zunehmend schlechter werdende Löslichkeit des Analyten verursacht. Diese bedingt den Anstieg der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten von MIP und NIP. Mit steigendem Wassergehalt kommt es dabei zu einer vermehrten Belegung hochselektiver Bindungsstellen im MIP. Dies erfordert eine genaue räumliche Orientierung des Templatmoleküls innerhalb der Bindungstasche und so zu einer zunehmenden Gewichtung der langsameren Dissoziationskinetik. Dieser Prozess ist zudem entropisch ungünstig und führt zu einer Überkompensation der Prägeenthalpie. Die freie Bindungsenthalpie steigt daher mit zunehmendem Wassergehalt nicht so sehr an wie für das NIP, es kommt somit zwar zu einer Erhöhung der Selektivität, aber ebenso zu einer Reduktion des Prägeeffektes.

4.3 Untersuchung des M2-Protonenkanals

Wie in den vorhergehenden Kapiteln aufgezeigt wurde eignet sich die ITC sehr gut, um ein besseres Verständnis der genauen Wechselwirkungsprozesse bei der molekularen Erkennung in Bindungskavitäten zu erzielen. Im folgenden Kapitel wurden die Untersuchungen mittels ITC daher auf ein zusätzliches System erweitert, wobei Untersuchungen zur Struktur-Aktivitätsbeziehung von Amantadinderivaten und deren Wechselwirkung mit dem M2-Protonenkanal durchgeführt wurden. Hierbei wurden zwei Mutanten des Protonenkanals untersucht, namentlich Weybridge und Udorn, die sich geringfügig in der Aminosäuresequenz des Peptidstrangs unterscheiden. Insgesamt wurden dabei 14 strukturell leicht unterschiedliche Liganden hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit dem M2-Protonenkanal untersucht. Durch ITC-Messungen konnte hierbei nicht nur die Affinität der Wechselwirkung, sondern auch deren Enthalpie und Entropie ermittelt werden. Erst die Bestimmung dieser thermodynamischen Parameter erlaubt eine detaillierte Beschreibung der Zusammenhänge zwischen Bindungsaffinität und molekularer Struktur der Amantadinderivate.

4.3.1 Auswertung der ITC-Messungen

4.3.1.1 Nichtlineare Kurvenanpassung

Wie bereits im theoretischen Teil abgehandelt (siehe Kapitel 3.3.3), wird zur Ermittlung von Affinitätskonstanten aus ITC Experimenten eine nichtlineare Kurvenanpassung durchgeführt. Hierbei wird Gl. 2.2.24 an die Daten angepasst, so dass sich Enthalpie und Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante aus dem Fit-Ergebnis ermitteln lassen. Für die Auswertung der Wechselwirkung zwischen den Amantadinderivaten und des M2TM Tetramers war es allerdings notwendig, die Funktion um den Parameter b zu ergänzen. Der Parameter b ist hierbei der Faktor, um den die tatsächliche Konzentration des Tetramers geringer ist, als dass sie eingewogen wurde. Die effektive Tetramerkonzentration ist geringer als die eingewogene, da sich nur ca. 60-70 % der Peptidstränge zu einem Tetramer zusammenlagerten, wie eine Analyse der Stöchiometrie der Reaktion ergab (siehe Kapitel 4.3.2.2 und Kapitel 4.3.3). Zur Auswertung der Daten wurde somit eine nichtlineare Kurvenanpassung mit der in Gleichung Gl. 4.3.1 dargestellten Funktion durchgeführt.

$$f(x) = a \cdot \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{x}{b} - r}{2 \cdot \sqrt{\left(1 + \frac{x}{b} + r\right)^2 - 4 \frac{x}{b}}} \right) \quad \text{Gl. 4.3.1}$$

Aus den Parametern a , b und r lassen sich die Wechselwirkungsenthalpie ΔH_i und unter Verwendung der Konzentration des Rezeptors c_R die Dissoziationskonstante K_D nach Gleichung Gl. 4.3.2 bzw. Gleichung Gl. 4.3.3 berechnen.

$$\Delta H_i = -a \quad \text{Gl. 4.3.2}$$

$$K_D = r \cdot b \cdot c_R \quad \text{Gl. 4.3.3}$$

Der jeweilige Fehler der Zielgröße wird unter Zuhilfenahme des Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetzes berechnet.

4.3.1.2 Auswertestrategie

Zu den im Folgenden dargestellten Untersuchungen der Struktur-Aktivitätsbeziehungen wurden pro Ligand und Peptid jeweils drei Messungen unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Hierbei stellt sich die Frage nach der bestmöglichen Auswertestrategie, da sich hierfür prinzipiell unterschiedliche Möglichkeiten zur Auswertung anbieten:

1. Separate Auswertung der einzelnen ITC Experimente
2. Auswertung über einen globalen Fit
3. Mittelung der Daten und Auswertung der Mittelwerte

Für Methode 1 ist es hierbei auch möglich Versuchsparameter wie z.B. die Konzentration des Liganden bzw. des Peptides zu variieren, Auswertestrategie 2 und 3 lassen solche Variationen nicht zu und fordern eine Konstanz sämtlicher Versuchsparameter. Für Auswertestrategie 2 kann man entweder alle Parameter variieren oder bestimmte Parameter durch einen sogenannten „allgemeinen Fit“ gemeinsam ermitteln lassen. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Auswertestrategien sind exemplarisch in Abbildung 50 dargestellt.

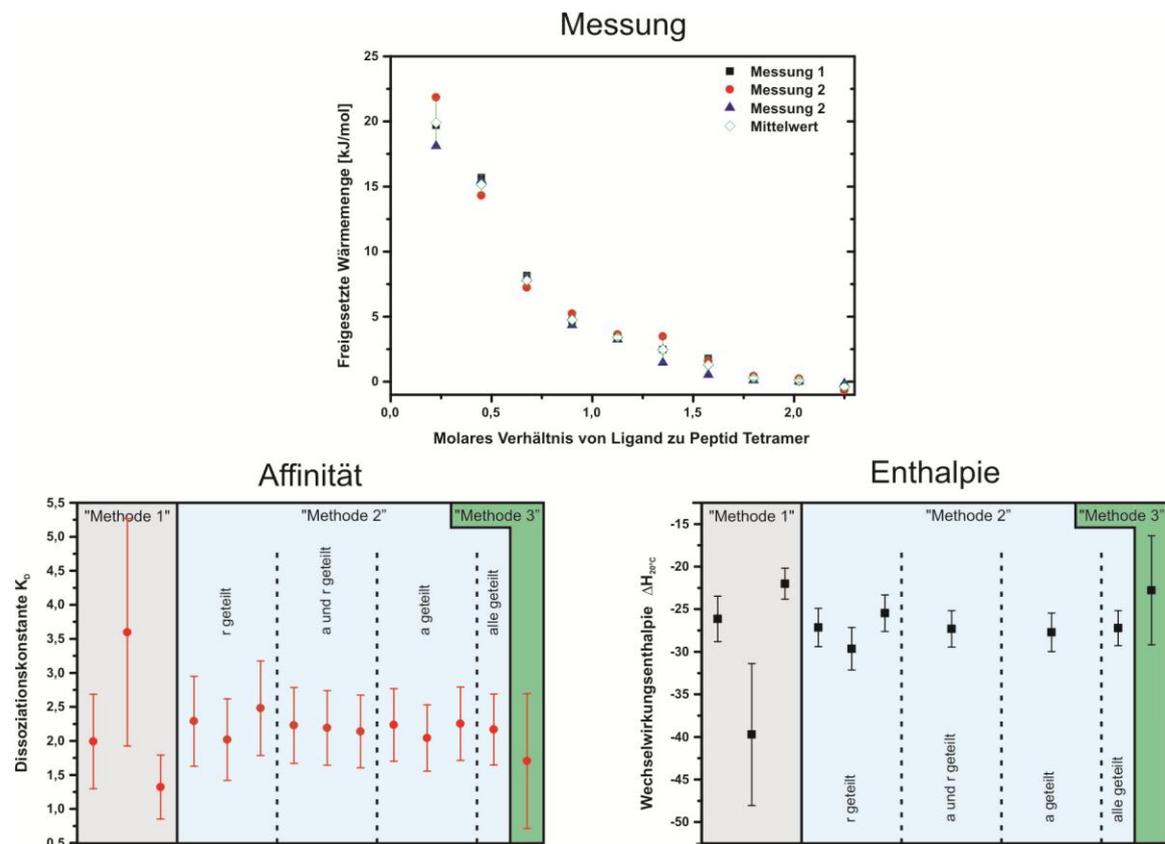


Abbildung 50: Oben: Darstellung von drei unabhängigen ITC-Messungen der Wechselwirkung von Udorn mit Ligand Rim. Links unten: Betrag und Fehler des Parameters a bei unterschiedlichen Auswertestrategien. Rechts unten: Betrag und Fehler der Dissoziationskonstante bei den verschiedenen Auswertestrategien.

Wie zu erkennen ist, liefern bis auf Methode 1 alle anderen möglichen Auswertemethoden Werte in derselben Größenordnung mit vergleichbaren Fehlern. Methode 1 ist eher ungeeignet,

da hierbei einzelne Ausreißer zu einer starken Verzerrung des Ergebnisses inklusive erhöhter Unsicherheit führen können. Auch die Auswertung über die Mittelwerte (Methode 3) scheint ungeeignet, da hier ebenfalls Ausreißer das Ergebnis zu stark beeinflussen können. Zudem führt eine leichte Verschiebung der Messungen untereinander hier zu stark verfälschten Ergebnissen. Dies kann beispielsweise durch einen leicht variablen Gehalt an aktivem Tetramer in der Lösung verursacht werden. Für die Auswertung der Messungen wird somit Methode 2 gewählt. Zur nichtlinearen Kurvenanpassung werden hierbei alle Parameter geteilt ermittelt.

Prinzipiell kann es bei ITC-Messungen vorkommen, dass die erste Injektion falsche (zu kleine) Werte liefert. Dies wird durch die Diffusion des Liganden in der Spritze in die Vorlage verursacht. Bei der ersten Injektion wird von daher eine geringere Stoffmenge als gewünscht injiziert, man erhält somit zu kleine Signale. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich (bedingt durch präparative Gründe) eine kleine Luftblase im zuerst injizierten Volumen befindet, was dementsprechend auch die injizierte Stoffmenge verringert. Bei einer signifikanten Abweichung der Wärmemenge der ersten Injektion wurde diese somit maskiert und nicht für die Auswertung berücksichtigt.

4.3.2 Voruntersuchungen des Systems

4.3.2.1 Optimale Messbedingungen

Bei der Verwendung der ITC zur Ermittlung thermodynamischer Kenndaten von Wechselwirkungen steht zu Beginn der Messungen stets die Ermittlung der optimalen Messbedingungen. Im Idealfall hat man für die Auswertung eine Wisemankonstante (Produkt aus Assoziationskonstante und Konzentration) zwischen 10 und 100 und möglichst viele Messpunkte im Bereich des Maximums der Ableitung der Titrationskurve. Im Realfall existieren allerdings Rahmenparameter wie die Verfügbarkeit an Material, die Löslichkeit der Komponenten und die Füllmengenanforderungen der Messzelle. Die für die Messungen verwendeten Parameter entsprechen somit einem Kompromiss aus geringem Materialverbrauch bei einer gleichzeitig guten Qualität der Messungen. So wurden die Bedingungen so optimiert, dass eine Wisemankonstante zwischen 10 und 100 erhalten wurde. Die Titrationskurve wies hierbei stets mindestens 5 Punkte im Bereich großer Änderung auf. Die genauen Messbedingungen für die einzelnen ITC-Messungen finden sich in Kapitel 3.6.7. Für die meisten Liganden konnten dieselben Messbedingungen verwendet werden, mit Ausnahme besonders niederaffiner Liganden wie z.B. Ligand 24, Ligand 16 und Ligand 17.

4.3.2.2 Spezifität der Bindung

Wie bereits im theoretischen Teil dieser Arbeit (Kapitel 2.6.3) erwähnt, ist die Zusammenlagerung der Peptidstränge zum Tetramer, um den M2-Protonenkanal auszubilden, aber auch die Wechselwirkung des M2-Protonenkanals mit Liganden, abhängig vom pH-Wert [61]. Im Bereich zwischen pH 8 und pH 5 findet eine Wechselwirkung statt, bei geringerem pH-Wert kommt es zu keiner Tetramerbildung. Das Messen bei unterschiedlichem pH-Wert kann somit als Referenz dienen um zu sehen, ob die gemessene Wärmemenge auch der Wechselwirkung zwischen Tetramer und Ligand zuzurechnen ist, oder ob alternativ eine Wechselwirkung der Liganden mit einem einzelnen Peptidstrang vorliegt.

Wie in Abbildung 51 zu sehen ist, erhält man eine Abhängigkeit der Wechselwirkung vom pH-Wert. Bei pH 8 findet die Wechselwirkung hierbei mit der geschlossenen Form des

Protonenkanals statt [61], bei pH 5 mit der offenen Form. Die Affinität zur geschlossenen Form ist hierbei deutlich höher, wie der Vergleich der Wiseman-Konstanten in Abbildung 51 aufzeigt. Bei einem pH-Wert von 3 erhält man keinerlei messbare Wechselwirkung mehr, was somit bestätigt dass keine Wechselwirkung vorliegt solange sich das Peptid nicht zu einem Tetramer zusammenlagert.

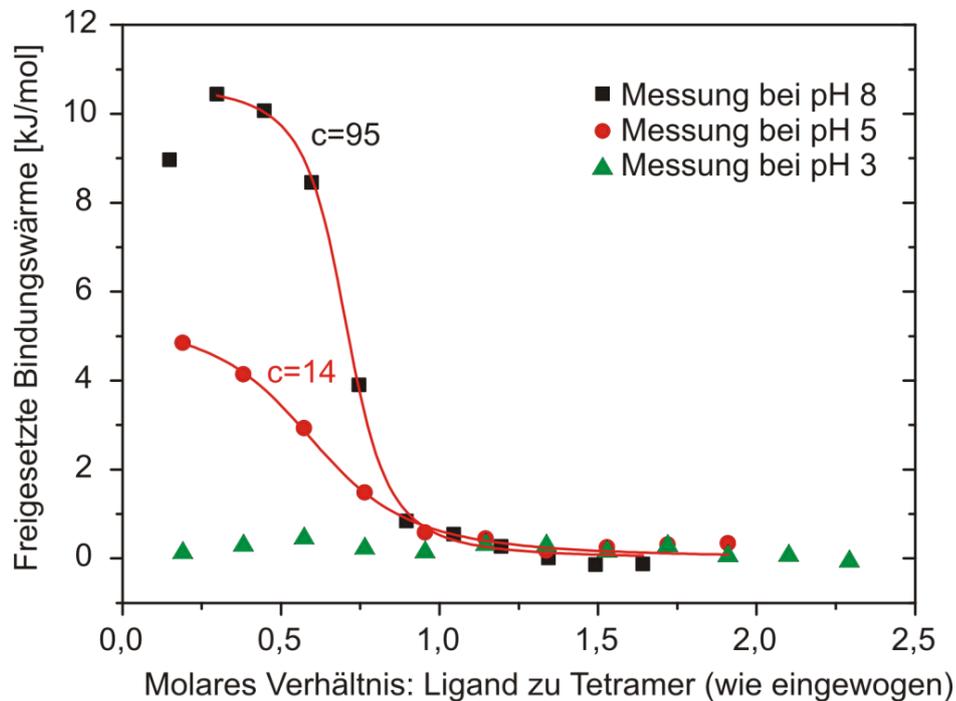


Abbildung 51: Messung der Wechselwirkung zwischen Weybridge und Ligand 8 bei unterschiedlichem pH-Wert und jeweils gleicher Konzentration an Peptid. Schwarze Quadrate: Messung bei pH 8; Rote Kreise: Messung bei pH 5; grüne Dreiecke: Messung bei pH 3.

Bei den Messungen ist auffällig, dass die Messkurven insgesamt zu einem kleineren Abszissenwert verschoben sind, als dass es die Stöchiometrie der Wechselwirkung mit dem Tetramer ergeben würde. Es gibt für dieses Verhalten zwei mögliche Erklärungen. Zum einen kann dies dadurch verursacht werden, dass die aktive Konzentration an Peptidtetramer geringer ist, als die eingewogene Stoffmenge es erwarten ließe. Dies kann beispielsweise durch Verunreinigungen im Peptid verursacht werden, oder alternativ dadurch, dass sich schlichtweg in den DPC-Micellen nicht alle Peptidstränge zum Tetramer zusammenlagern. Eine alternative Möglichkeit besteht darin, dass die Stöchiometrie der Wechselwirkung eine andere ist, als dass es dem Vorliegen des Peptides in Form eines Tetramers entsprechen würde.

Die Auswertesoftware Digitam ermöglicht es, für eine Titrationskurve bei gegebenen Konzentrationen eine Stöchiometrie zu berechnen. Die hierbei berechnete Stöchiometrie beläuft sich auf 1 zu 0,19 was einem Vorliegen des Peptides als Pentamer entsprechen würde. Jedoch widerspricht dies jeglichen Forschungsergebnissen, die über das Vorliegen des M2-Protonenkanals publiziert wurden. Eine Reduktion der tatsächlichen aktiv vorliegenden Spezies im Vergleich zur eingewogenen Stoffmenge des Peptides um ca. 20 % ist naheliegender und würde diese Abweichung von der erwarteten Stöchiometrie weitaus besser erklären. Die ermittelten Stöchiometrien für die verschiedenen getesteten Liganden liegen hierbei alle in diesem Bereich, so dass eine Wechselwirkung mit dem Tetramer als gesichert gilt.

Im Rahmen der durchgeführten Vorversuche wurde untersucht, ob sich die Menge an aktiv vorliegender Spezies durch Variation der DPC-Konzentration erhöhen lässt. Die Vermutung war, dass eine kleine Konzentration an DPC die Micellenkonzentration verringert und somit die Aggregation zum Tetramer begünstigt. Die mögliche DPC-Konzentration ist jedoch nach unten begrenzt durch die kritische Micellenkonzentration (ca. 3 mM), unterhalb derer keine klare Lösung mit dem Tetramer erhalten wird. Hier zeigen die Messungen, dass die Stöchiometrie der Bindung und die resultierende Affinitätskonstante der Bindung unabhängig von der verwendeten DPC-Konzentration im Bereich 4,5 bis 15 mM sind.

4.3.3 Ergebnisse der Messungen

Die einzelnen Messkurven sind aus Gründen der Übersichtlichkeit separat im Anhang dargestellt. Die aus den Titrationskurven berechneten thermodynamischen Daten der Wechselwirkung mit den einzelnen Liganden sind für Weybridge in Tabelle 18 und für Udorn in Tabelle 19 aufgelistet.

Für alle Liganden wird eine negative Enthalpie erhalten, das heißt, dass bei Anbindung der Liganden an den M2-Protonenkanal Wärme freigesetzt wird. Die Bindungsentropie ist bis auf wenige Ausnahmen positiv. Im direkten Vergleich beider Mutaten ist auffällig, dass die Affinität gegenüber Weybridge für alle Liganden höher ist als gegenüber Udorn. Die Wechselwirkungsenthalpie ist dabei für Weybridge für die meisten Liganden kleiner als für Udorn. Dies hat zur Konsequenz, dass die Wechselwirkung mit Weybridge mit den meisten Liganden vorwiegend entropisch dominiert ist (siehe Abbildung 52). Eine detailliertere Diskussion der Ursachen, insbesondere der direkte Vergleich der Strukturvariationen der Liganden findet in den folgenden Abschnitten statt.

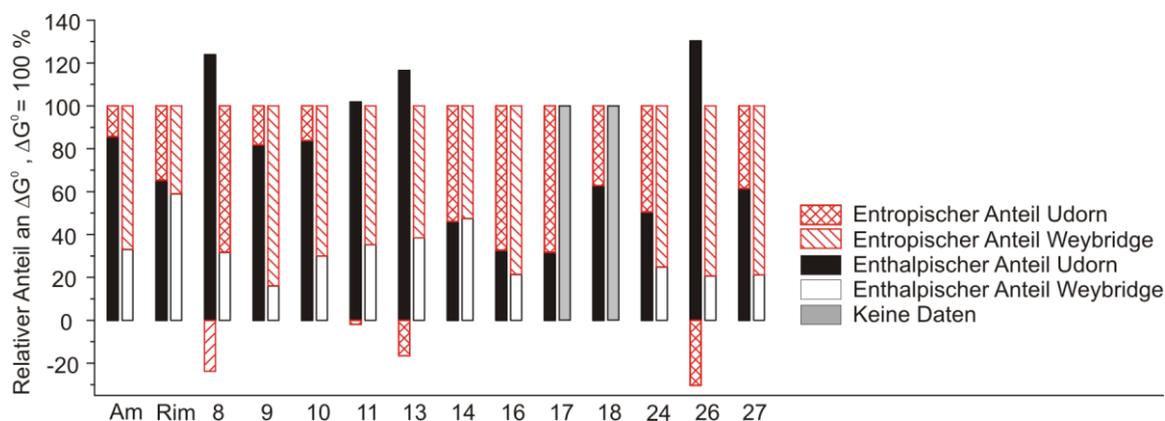


Abbildung 52: Enthalpischer und entropischer Anteil an der Wechselwirkung der Liganden mit dem M2-Protonenkanal für Udorn und Weybridge.

Tabelle 18: Thermodynamische Parameter der Wechselwirkung von Weybridge mit unterschiedlichen Liganden: Dissoziationskonstante, Freie Wechselwirkungsenthalpie, Wechselwirkungsenthalpie und Wechselwirkungsentropie.

Ligand	K_D [μM]	ΔK_D [μM]	$\Delta G^{293\text{K}}$ [kJ/mol]	$\Delta \Delta G^{293\text{K}}$ [kJ/mol]	$\Delta H^{293\text{K}}$ [kJ/mol]	$\Delta \Delta H^{293\text{K}}$ [kJ/mol]	$-T\Delta S^{293\text{K}}$ [kJ/mol]	$\Delta T\Delta S^{293\text{K}}$ [kJ/mol]	Stöchio- metrie
Am	0,74	0,26	-34,39	0,85	-11,37	0,60	-23,02	1,04	0,24
Rim	0,18	0,09	-37,86	1,24	-22,33	0,99	-15,53	1,59	0,21
8	0,34	0,14	-36,28	0,98	-11,52	0,53	-24,76	1,11	0,17
9	0,21	0,10	-37,50	1,21	-6,03	0,27	-31,47	1,24	0,21
10	0,23	0,12	-37,27	1,24	-11,17	0,32	-26,10	1,28	0,17
11	1,13	0,43	-33,38	1,24	-11,79	1,06	-21,58	1,40	0,17
13	0,38	0,14	-36,01	0,88	-13,85	1,06	-22,16	1,37	0,17
14	0,98	0,25	-33,72	0,62	-16,01	0,72	-17,71	0,95	0,24
16	3,05	2,11	-30,95	1,69	-6,63	1,67	-24,32	2,37	0,17
24	4,28	1,21	-30,13	0,69	-7,49	0,48	-22,64	0,84	0,27
26	1,18	0,49	-33,28	1,02	-6,89	0,54	-26,39	1,15	0,19
27	1,08	0,27	-33,48	0,60	-7,07	0,24	-26,41	0,64	0,19

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 19: Thermodynamische Parameter der Wechselwirkung von Udorn mit unterschiedlichen Liganden: Dissoziationskonstante, Freie Wechselwirkungsenthalpie, Wechselwirkungsenthalpie und Wechselwirkungsentropie

Ligand	K_D [μM]	ΔK_D [μM]	ΔG^{293K} [kJ/mol]	$\delta \Delta G^{293K}$ [kJ/mol]	ΔH^{293K} [kJ/mol]	$\delta \Delta H^{293K}$ [kJ/mol]	$-T\Delta S^{293K}$ [kJ/mol]	$\delta T\Delta S^{293K}$ [kJ/mol]	Stöchiometrie
Am	2,17	0,52	-31,78	0,59	-27,23	2,05	-4,56	2,13	0,23
Rim	0,81	0,22	-34,20	0,67	-22,32	1,15	-11,88	1,33	0,29
8	1,60	0,34	-32,52	0,51	-40,27	1,73	7,75	1,80	0,22
9	0,89	0,19	-33,96	0,53	-27,78	1,08	-6,18	1,20	0,25
10	0,62	0,14	-34,83	0,54	-29,20	0,87	-5,64	1,02	0,25
11	0,71	0,15	-34,52	0,50	-35,17	1,13	0,65	1,23	0,22
13	0,40	0,13	-35,90	0,78	-41,84	1,60	5,94	1,77	0,20
14	0,93	0,36	-33,85	0,95	-15,60	1,15	-18,25	1,49	0,23
16	2,90	1,16	-31,08	0,97	-10,14	1,14	-20,94	1,50	0,29
17	3,01	1,42	-30,98	1,14	-9,82	1,49	-21,16	1,88	0,29
18	1,30	0,43	-33,04	0,81	-20,76	1,28	-12,27	1,51	0,28
24	6,33	1,53	-29,18	0,59	-14,71	1,25	-14,46	1,38	0,28
26	0,91	0,21	-33,90	0,57	-44,17	2,01	10,27	2,09	0,19
27	1,55	0,52	-32,61	0,82	-20,04	1,51	-12,57	1,72	0,28

Vergleich mit Literaturwerten

Für Weybridge wurden bereits Affinitätskonstanten für manche der hier vermessenen Substanzen bestimmt [80]. Die Affinitätsbestimmung fand hierbei mit einem Fluoreszenzassay statt, der das Quenchen der Fluoreszenz von Tryptophan 41 durch die Protonierung von Histidin 37 in der M2TM misst [81].

Der Vergleich mit den Literaturwerten zeigt große Unterschiede auf. Die mittels des Fluoreszenzassays gemessenen Affinitäten sind hierbei meist weitaus geringer, als die mittels ITC ermittelten Affinitäten. Die Ursache hierfür liegt vermutlich darin, dass die in der Literatur erwähnten Affinitätskonstanten bei pH 5 gemessen wurden, die ITC-Messungen jedoch bei pH 8 durchgeführt wurden und die Werte daher nur bedingt vergleichbar sind. Interessant ist hierbei jedoch zu sehen, dass die Affinität in der Reihe 8->9->10->11 bei pH 5 stetig abnimmt, die ITC-Messungen zeigten kaum einen Unterschied zwischen den Liganden 8, 9 und 10 – erst Ligand 11 zeigte eine deutlich geringere Affinität. Im Detail ist der Vergleich dieser Liganden in Kapitel 4.3.3.2 dargestellt.

Tabelle 20: Vergleich der mittels ITC bestimmten Affinitätskonstanten mit Literaturwerten.

Ligand	Ergebnisse ITC		Literaturwert
	K_D [μM]	ΔK_D [μM]	Fluoreszenzassay [80] K_D [μM]
Am	0,74	0,26	0,32
8	0,34	0,14	2,36
9	0,21	0,10	6,7
10	0,23	0,12	8,71
11	1,13	0,43	>26
13	0,38	0,14	1,16

4.3.3.1 Ergebnisse für Am, Rim und Ligand 24

Für die bessere Vergleichbarkeit der Liganden wurden diese in verschiedene Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe stellt den Vergleich der bereits etablierten antiviralen Medikamente Rimantadin und Amantadin dar und beinhaltet zudem die strukturell sehr ähnliche Komponente Fluoro-Amantadin (Lig 24).

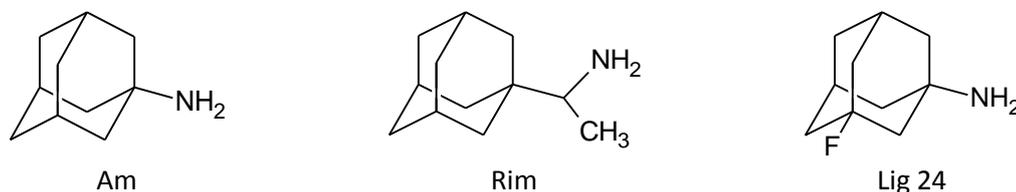


Abbildung 53: Sturktuformeln der Liganden Amantadin (Am), Rimantadin (Rim) und Fluoro-Amantadin (Lig 24).

Für alle der hier betrachteten Liganden tragen jeweils Entropie und Enthalpie positiv zur Wechselwirkung für beide Mutanten bei, wobei Weybridge eine höhere Affinität gegenüber allen drei Liganden zeigt. Für Rimantadin erhält man bei beiden Mutanten vergleichbare Werte für Enthalpie und Entropie, wobei für Weybridge ein leicht höherer Entropiegewinn verzeichnet wird (siehe Abbildung 54). Beide Mutanten unterscheiden sich jedoch signifikant bei der Wechselwirkung mit Amantadin bzw. Fluoro-Amantadin. Beide Liganden zeigen eine deutlich

Ergebnisse und Diskussion

höhere Enthalpie bei der Wechselwirkung mit Udorn als bei der Wechselwirkung mit Weybridge. Umgekehrt wird für die Wechselwirkung mit Weybridge im Vergleich zu Udorn ein deutlich größerer Entropiegewinn erzielt.

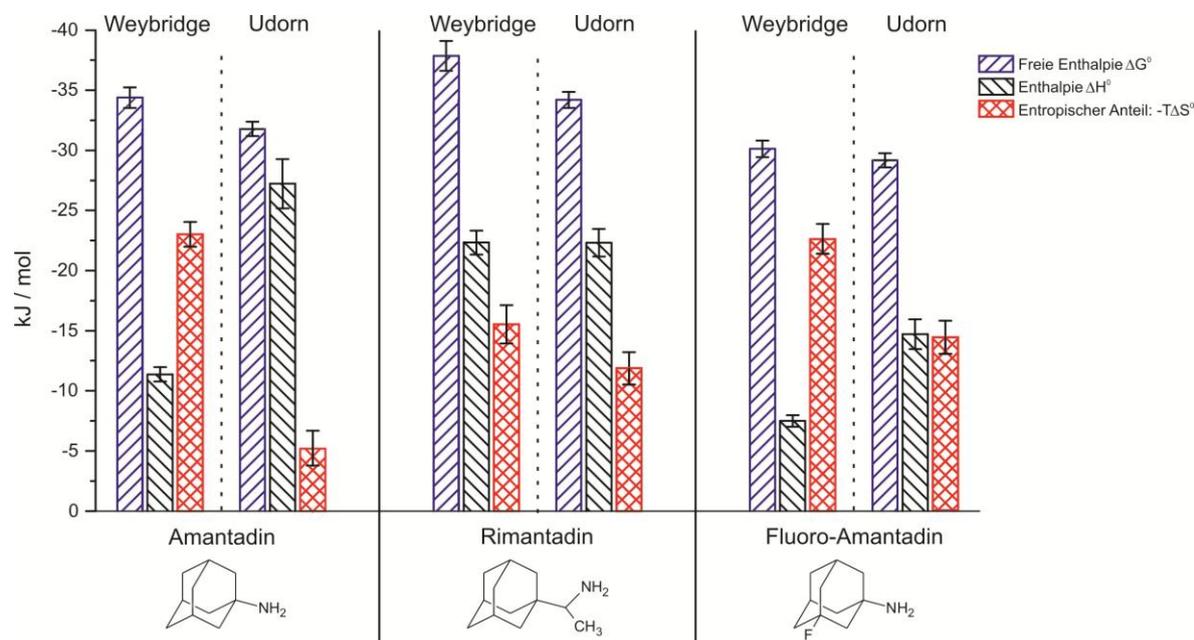


Abbildung 54: Graphische Darstellung der freien Enthalpie, Enthalpie und des Entropischen Beitrags zur Wechselwirkung mit dem M2-Protonenkanal für die Liganden Amantadin, Rimantadin und Fluoro-Amantadin.

Diese Beobachtung kann durch den engeren Porendurchmesser des M2-Protonenkanals bei Udorn im Vergleich zu Weybridge [67] erklärt werden (siehe Abbildung 55). Durch das geringere Porenvolumen sind die Orientierungsmöglichkeiten eingeschränkt, wodurch die Zahl konformativer Freiheitsgrade und der somit mögliche Entropiegewinn reduziert werden. Zusätzlich zeigt die höhere Bindungsenthalpie, die für beide Liganden mit Udorn erzielt wird eine stärkere lokale Fixierung innerhalb der Bindungstasche an, was somit ebenfalls die konformativen Freiheitsgrade reduziert. Rimantadin ist größer als Amantadin, wodurch eine bessere Einpassung in die Bindungspore von Weybridge möglich ist. Hierdurch kommen die im vorherigen Abschnitt erläuterten Effekte nicht zum Tragen, wodurch sich beide Mutanten kaum unterscheiden.

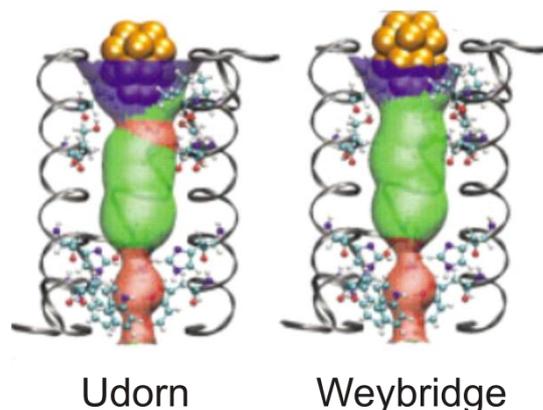


Abbildung 55: Porengröße des M2-Protonenkanals bei Weybridge und Udorn (entnommen [67] mit geringfügigen Anpassungen). Die Farbe gibt den Porendurchmesser an: Rot: 2-3 Å, grün 3-4 Å, blau: 4-5 Å.

Vergleich von Amantadin mit Fluoro-Amantadin

Die Substitution eines Wasserstoffatoms an Position 3 durch ein Fluoratom führt bei beiden Mutanten zu einer erheblichen Reduktion der Affinität. Hierbei kommt es für Weybridge als auch für Udorn im Vergleich zu Amantadin zu einer Reduktion der Bindungsenthalpie. Diese Reduktion lässt sich durch den negativen induktiven Effekt des Fluoratoms erklären, welcher die Basizität der Aminogruppe reduziert und somit die in der Bindungstasche des Protonenkanals vorliegende protonierte Form der Aminogruppe [63] destabilisiert. Bei der Änderung der Entropie im Vergleich zu Amantadin unterscheiden sich beide Mutanten. So ist bei Weybridge kaum eine Entropieänderung zu beobachten, bei Udorn wird der absolute Beitrag der Entropie zur Bindung erhöht. Auch hierfür ist die im vorhergehenden Abschnitt erläuterte engere Bindung von Amantadin in Udorn im Vergleich zu Weybridge verantwortlich. Die Lockerung der Bindung führt zu einer erhöhten Beweglichkeit des Liganden und somit zu zusätzlichen konformativen Freiheitsgraden, die den Entropiebeitrag erhöhen. Da der Ligand in der Bindungstasche von Weybridge beweglicher ist als in Udorn, ist die Erhöhung des Entropiebeitrags entsprechend geringer für Weybridge.

4.3.3.2 Ergebnisse für Ligand 8, 9, 10, 11

Bei dieser Gruppe an Liganden handelt es sich um n-Alkyl Adamantanderivate, wobei die Länge der Alkylgruppe sukzessive erhöht wird.

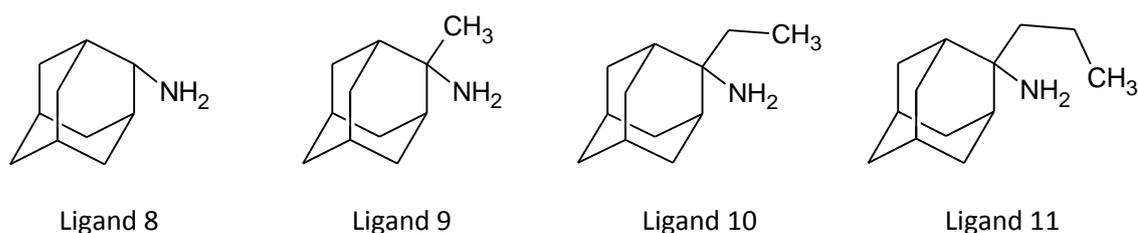


Abbildung 56: Strukturformeln der n-Alkyldamantanderivate Ligand 8 bis Ligand 11.

Interessant ist, dass für beide Mutanten die Affinität und somit die freie Enthalpie der Wechselwirkung in der Reihe 8->9->10 ansteigt, obwohl sie in ihrer Größe deutlich zunehmen (siehe Abbildung 57). Dieser Trend ist hierbei recht klar für Udorn ausgeprägt, für Weybridge liegen die beobachteten Änderungen weitestgehend im Rahmen der Messfehler, so dass eine definitive Trendaussage schwer ist. Auffällig ist jedoch, dass für beide Mutanten für Ligand 11 eine Erniedrigung der Affinität festzustellen ist. Die Bindungsenthalpien sind dabei für beide Mutanten bei Ligand 9 minimal, die Bindungsentropien bei diesem Liganden für beide Mutanten maximal. Bei Udorn weist Ligand 8 innerhalb der Reihe die höchste Bindungsenthalpie auf, bei Weybridge Ligand 10.

Ergebnisse und Diskussion

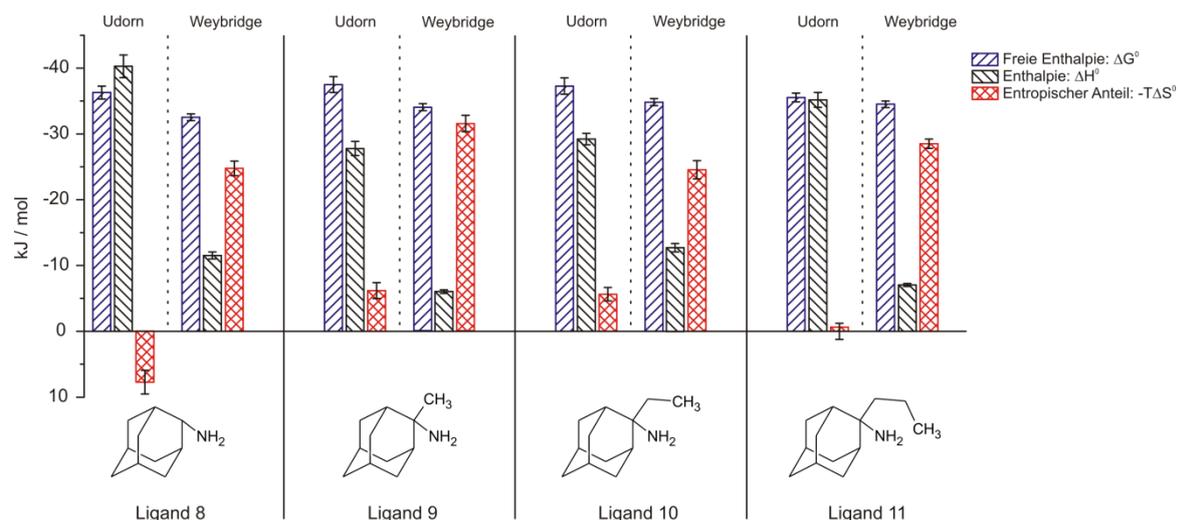


Abbildung 57: Graphische Darstellung der freien Enthalpie, Enthalpie und des Entropischen Anteils der Wechselwirkung von Udorn und Weybridge mit Ligand 8, 9 10 und 11.

Generell ist die Wechselwirkung mit den Liganden dieser Reihe für Udorn enthalpisch dominiert, für Weybridge ist der Beitrag der Entropie wesentlich höher, wie aus Abbildung 57 ersichtlich wird. Dies erklärt bereits die größere Abhängigkeit der Affinitätskonstanten von der genauen strukturellen Ausprägung des Liganden für Udorn. Für eine genauere Auswertung wird durch Differenzbildung der thermodynamischen Konstanten deren sukzessive Änderung bei Variation der Liganden genauer betrachtet (siehe Abbildung 58). Hierzu wird, wie im Schaubild dargestellt, jeweils die Differenz zwischen Ligand 9 und Ligand 8, Ligand 10 und Ligand 9 bzw. Ligand 11 und Ligand 10 gebildet.

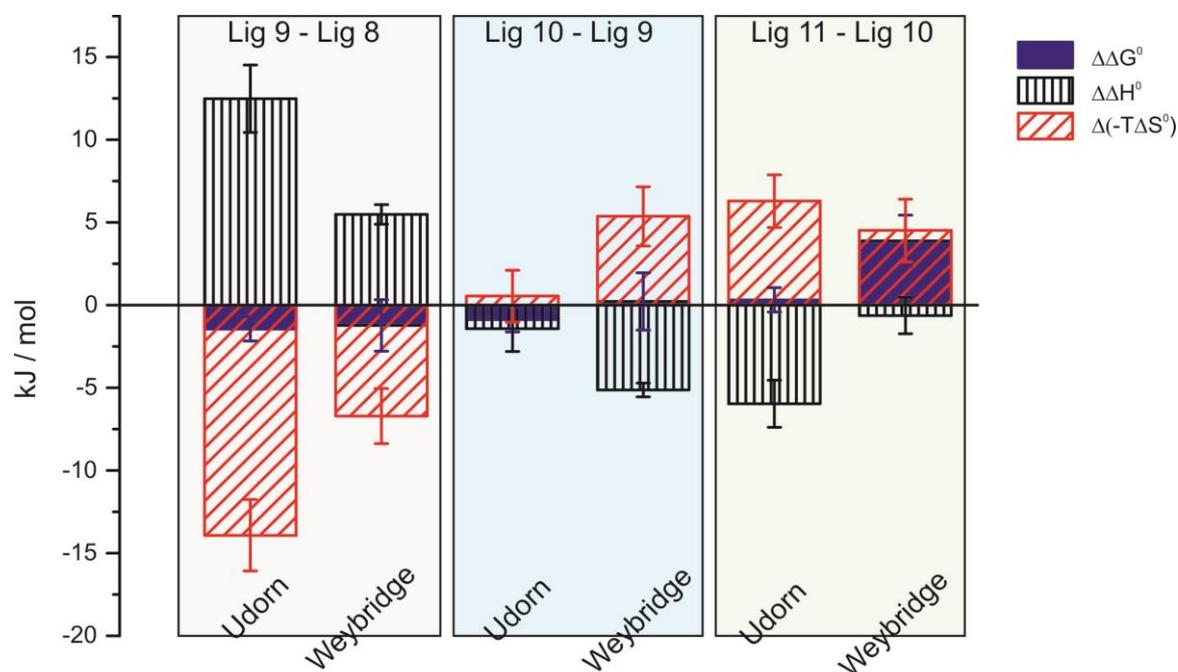


Abbildung 58 Links: Graphische Darstellung der enthalpischen und entropischen Beiträge zur Wechselwirkung für die Liganden 8, 9, 10 und 11. Rechts: Differenz aus freier Enthalpie, Enthalpie und Entropie der Permutationen Ligand 9-Ligand 8, Ligand 10 – Ligand 9 und Ligand 11 – Ligand 10.

Wie in Abbildung 58 zu erkennen ist, verhalten sich die Liganden für beide Mutanten des M2-Protonenkanals gleich, was die Änderung von Enthalpie und Entropie angeht, unterscheiden sich jedoch stark was die Größe der dabei auftretenden Änderungen angeht.

Der Vergleich von Ligand 8 und Ligand 9 weist die betragsmäßig größte Änderung an entropischem und enthalpischem Beitrag der Wechselwirkung auf. Durch die zusätzliche Methylgruppe in Ligand 9 kann die Position in der Bindungstasche nicht optimal eingenommen werden, weshalb stabilisierende Beiträge (über eine Wasserstoffbrücke zur Aminogruppe) und somit die Bindungsenthalpie betragsmäßig reduziert werden. Ligand 9 ist hydrophober als Ligand 8 und wird somit verstärkt über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Durch die Anbindung werden die stark ausgerichteten Solvensmoleküle freigesetzt, es kommt zu einer Erhöhung der Entropie. Bedingt durch die größere Bindungstasche von Weybridge befinden sich nach Anbindung des Liganden immer noch (mehr) Lösemittelmoleküle in der Bindungstasche, der Entropiegewinn fällt dementsprechend geringer aus als bei Udorn.

Mit zunehmender Größe des Alkylsubstituenten wird der relative Unterschied zwischen den Liganden bezüglich ihrer Hydrophobizität geringer, was sich in zunehmend kleiner werdenden freien Desolvatisierungsenthalpien ΔG_{solv}^0 äußert [63]. Dies stimmt gut mit den experimentellen Ergebnissen überein, die einen kontinuierlich sinkenden entropischen Beitrag aufzeigen. Die detaillierte Analyse in Abbildung 58 (rechts) zeigt hierbei auf, dass der Entropiegewinn durch die Desolvatisierung bereits für Ligand 10 nicht mehr groß genug ist, um zu einer Affinitätserhöhung zu führen. Die durch die zunehmend „beengte“ Position innerhalb der Bindungstasche resultierende Einschränkung der Freiheitsgrade des Liganden kann durch den Gewinn an Freiheitsgraden des Solvens dementsprechend nicht beliebig lang überkompensiert werden. Ab einer bestimmten Größe des Liganden (Unterschied Ligand 10 / Ligand 11) wird daher die Affinität wieder geringer, obwohl der Ligand eine zunehmend enthalpisch günstigere Bindungsposition einnimmt.

4.3.3.3 Ergebnisse für Lig 13, 16, 27, 26

Bei den in diesem Abschnitt betrachteten Liganden handelt es sich allesamt um Pyrrolidin bzw. Methylpyrrolidinderivate des Adamantan Grundgerüsts. Da bei dieser Gruppe nicht ein Teil der Molekülstruktur sukzessive geändert wird, wie in Abschnitt 4.3.3.2 bei der Betrachtung der Alkylderivate, wird hier für die Diskussion der Vergleich zu einer Leitstruktur herangezogen. Die Leitstruktur stellt hierbei Ligand 13 dar, die restlichen drei betrachteten Liganden unterscheiden sich durch die Substitution eines Wasserstoffatoms durch eine Methylgruppe am Pyrrolidinrest.

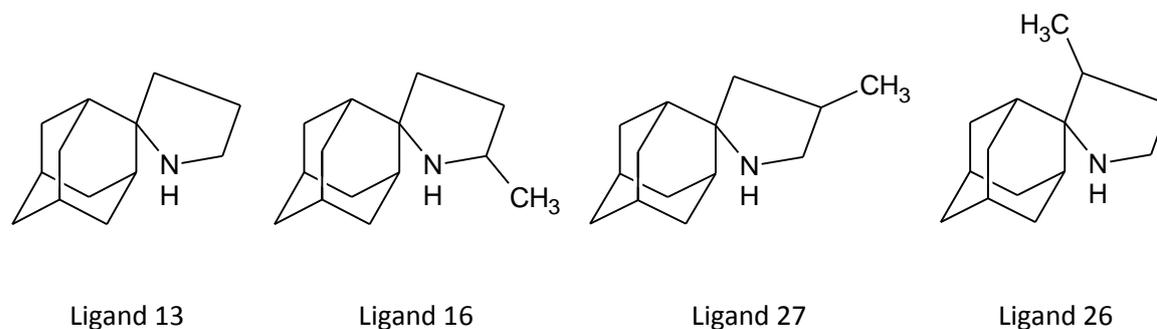


Abbildung 59: Strukturformeln von Ligand 13, Ligand 16, Ligand 27 und Ligand 26.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Analyse sind daher nicht wie in den vorangehenden Abschnitten erneut die Absolutwerte der thermodynamischen Parameter graphisch dargestellt, sondern jeweils die Differenz der freien Enthalpie, der Enthalpie und des entropischen Beitrags zwischen Ligand 13 und dem jeweiligen Vergleichsliganden (siehe Gl. 4.3.4).

$$\Delta\Delta G^0 = \Delta G_{Lig\ 13}^0 - \Delta G_{Lig\ i}^0 \quad \text{Gl. 4.3.4}$$

Ein negativer Wert in Abbildung 60 links bedeutet demnach, dass Ligand 13 eine höhere Affinität (und somit eine betragsmäßig höhere freie Enthalpie) besitzt als der Vergleichsligand. Ein negativer Wert beim enthalpischen Beitrag bedeutet, dass beim Vergleichsligand entsprechend weniger Wärme freigesetzt wird. Entsprechend bedeutet ein positiver Wert in Abbildung 60 rechts, dass beim Vergleichsligand der Entropiebeitrag größer ist, ein negativer Wert weist auf einen kleineren Entropiebeitrag hin.

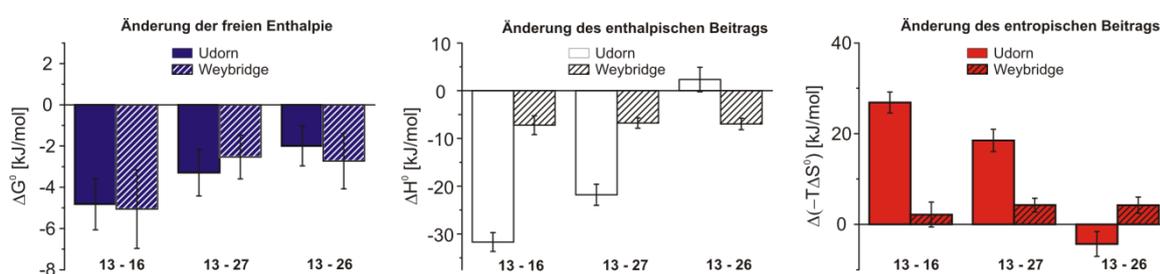


Abbildung 60: Änderung der freien Enthalpie (links), Enthalpie (Mitte) und des entropischen Beitrags (rechts) der Wechselwirkung der Liganden mit Udon bzw. Weybridge bei struktureller Variation ausgehend von Ligand 13.

Beim Vergleich der Liganden ist offensichtlich, dass eine Variation der Leitstruktur durch zusätzliche Methylgruppen an jeder Position des Pyrrolidinrings zu einer Verringerung der Affinität führt. Die Reduktion der Affinität ist hierbei an der Position direkt neben der sekundären Aminofunktion (Ligand 16) mit Abstand am stärksten ausgeprägt. Diese Reduktion wird hauptsächlich durch eine starke Reduktion der Bindungsenthalpie verursacht und kann durch einen Mehrgewinn an Entropie nicht kompensiert werden. Die starke Reduktion der Bindungsenthalpie durch Methylierung der Position neben der Aminogruppe lässt sich hierbei höchstwahrscheinlich auf eine sterische Hinderung bei der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Aminofunktion und Aminosäureresten in der Bindungstasche rückführen. Die somit resultierende geringere Fixierung in der Bindungstasche führt zu einem erheblichen Gewinn an Freiheitsgraden, worauf der deutlich sichtbare Anstieg des entropischen Beitrags hindeutet. Da diese Fixierung bei Weybridge durch den weiteren Porendurchmesser geringer ausgeprägt ist, sind die Auswirkungen auf die Bindungsentropie entsprechend geringer bzw. nur sehr schwach ausgeprägt.

Dies zeigt sich ebenfalls beim Vergleich von Ligand 26 und Ligand 27. Beide Permutationen führen zu einer Vergrößerung des Liganden, wobei Ligand 26 kompakter ist als Ligand 27 und eine geringere maximale Ausdehnung besitzt (siehe Abbildung 61). Diese strukturellen Unterschiede machen sich daher nur in der engeren Bindungstasche von Udon bemerkbar, für Weybridge führt die Permutation von Ligand 13 zu Ligand 26 bzw. Ligand 27 zu jeweils ähnlichen Werten von Enthalpie und Entropie. In der engeren Bindungstasche von Udon ist durch die lineare Struktur von Ligand 27 zu wenig Platz für eine gute Einpassung, die freigesetzte Enthalpie

ist entsprechend geringer und kann nicht durch die zusätzlichen konformativen Freiheitsgrade kompensiert werden. Die Methylierung bei Ligand 26 erlaubt für Udorn sogar eine bessere Einpassung in die Bindungstasche, worauf der geringfügig höhere Enthalpiebetrag und die Reduktion des entropischen Beitrags hinweist.

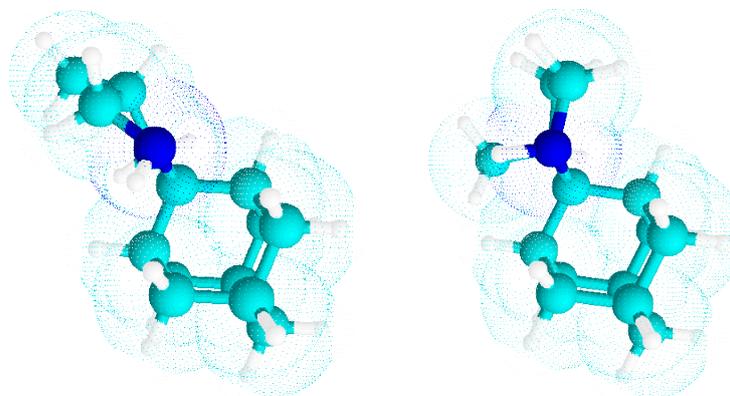


Abbildung 61: Vergleich der Molekularstruktur von Ligand 27 (links) und Ligand 26 (rechts). Ligand 27 zeigt eine größere räumliche Ausdehnung als Ligand 26. Zeichnung erstellt mit Chemschetch.

4.3.3.4 Ergebnisse für Ligand 14, 16, 17, 18

Auch bei diesen Liganden handelt es sich analog der im vorangegangenen Abschnitt diskutierten Struktur motive um Pyrrolidin bzw. Methylpyrrolidinderivate des Adamantan Grundgerüsts, weshalb auch hier der Vergleich zu der Leitstruktur von Ligand 13 herangezogen wird. Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte ist Ligand 16 hierbei nochmals aufgeführt.

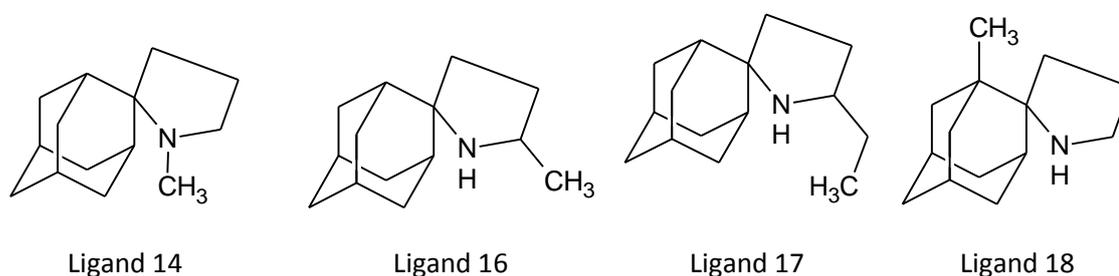


Abbildung 62: Strukturformeln von Ligand 14, 16, 17 und 18.

Für Ligand 17 kann mittels ITC für Weybridge leider keine Affinitätskonstante ermittelt werden, da die Affinität und die Bindungsenthalpie zu klein sind. Für Ligand 18 kann für Weybridge zwar eine nichtlineare Kurvenanpassung der Messdaten durchgeführt werden, der resultierende c -Wert war allerdings für eine sinnvolle Auswertung zu gering, so dass auf eine Angabe der ermittelten Bindungsaffinität verzichtet wird. Die Affinität von Ligand 16 und Ligand 17 gegenüber Weybridge ist schlichtweg zu gering, um mit vertretbarem Einsatz an Peptid einen c -Wert zu erhalten, der eine sinnvolle Auswertung ermöglicht. Zudem existiert eine prinzipielle Limitierung durch die geringe Löslichkeit des Peptides. Die theoretisch erforderlichen Konzentrationen, die für eine auswertbare Messung notwendig wären, können somit nicht erreicht werden.

Auch hier zeigen alle strukturellen Variationen von Ligand 13 eine Reduktion der Affinität, wobei diese Reduktion besonders stark bei Ligand 16 und Ligand 17 ausgeprägt ist (siehe Abbildung

63). Für Udorn ist hierbei eine starke Reduktion der Enthalpie zu beobachten, welche allerdings zum Teil durch einen Anstieg des entropischen Terms wieder kompensiert werden kann. Bei den anderen vermessenen Liganden zeigte sich bereits, dass eine solche Kompensation bei Weybridge nicht so stark ausgeprägt ist wie bei Udorn. Dies erklärt somit, weshalb die Affinität für Ligand 17 und 18 für Weybridge so stark verringert wird, dass eine Messung nicht möglich war.

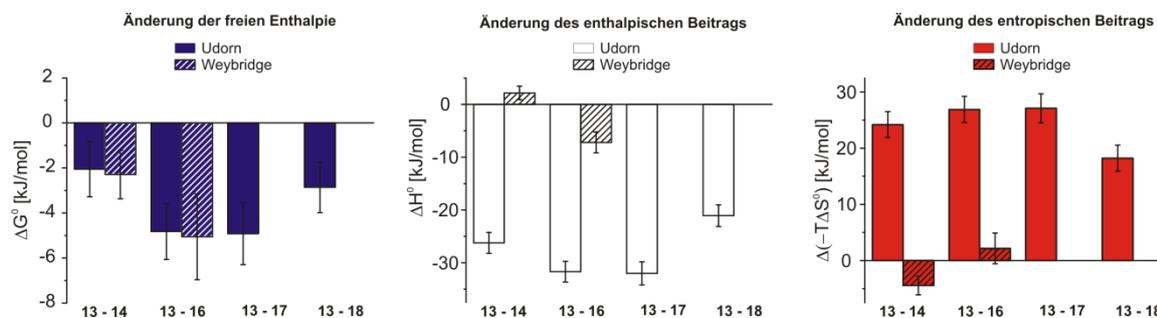


Abbildung 63: Änderung der freien Enthalpie (links), Enthalpie (Mitte) und des entropischen Beitrags (rechts) der Wechselwirkung der Liganden mit Udorn bzw. Weybridge bei struktureller Variation ausgehend von Ligand 13.

Durch die Methylierung der Aminofunktion (Vergleich Ligand 13 – Ligand 14) wird deren Basizität verringert, was hierdurch Auswirkungen auf deren Funktion als Wasserstoffbrückenakzeptor hat. Das Resultat ist ähnlich der Permutation 13/16, es kommt zu einer schwächeren Anbindung in der Bindungstasche. Beim Vergleich der enthalpischen Auswirkungen beider Permutationen (Ligand 13 – Ligand 16 im Vergleich zu Ligand 13 – Ligand 14) wird zudem deutlich, dass die Methylierung neben der Aminofunktion in Ligand 16 eine ausgeprägte zusätzliche sterische Hinderung bewirken muss und nicht nur die Wasserstoffbrückenbindung geringfügig stört. Hierbei spielt es allerdings keine Rolle hinsichtlich der Bindungsenthalpie und -entropie, ob sich eine Methylgruppe oder eine Ethylgruppe neben der Aminofunktion befindet. Die geringere Affinität von Ligand 18 ist vermutlich bei Udorn ebenfalls durch dessen größeren Raumbedarf innerhalb der Bindungspore bedingt.

4.3.4 Vergleich zu berechneten Werten

Zur Entwicklung von guten Docking-Modellen, welche die Wechselwirkung zwischen den Liganden und dem M2-Protonenkanal gut wiedergeben können, ist zum einen eine genaue Kenntnis des molekularen Aufbaus der Bindungstasche notwendig, des Weiteren bedarf es aber auch detaillierten experimentellen Daten, die die Wechselwirkung gut beschreiben. Die mittels den ITC-Messungen erhaltenen Daten bieten dabei die Basis zur Weiterentwicklung eines Bindungsmodells, basierend auf der Kombination aus molekulardynamischen Simulationen und FEP (Free Energy Perturbation)-Berechnungen [82]. Die Ergebnisse der Messungen erlauben das bisher nur für die Gasphase existierende Dockingmodell [83] an die flüssige Phase anzupassen und zeigten dabei auch die Schwachstellen des Modells auf, wie die Korrelationsdiagramme in Abbildung 64 aufzeigen. Die Berechnungen wurden von der Arbeitsgruppe Kolocouris der Universität Athen durchgeführt, auf deren Werte für die Korrelationsdiagramme zurückgegriffen wurde.

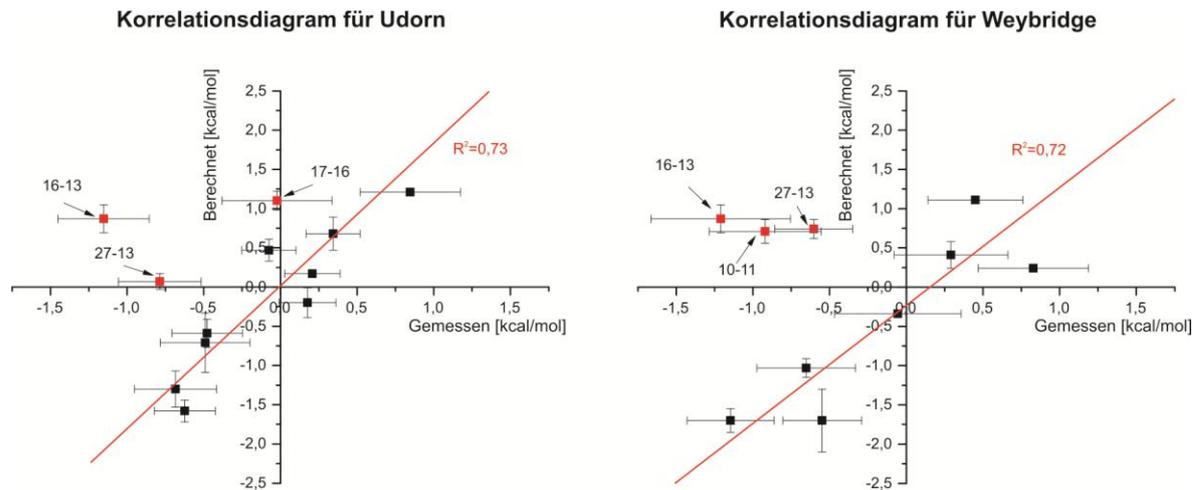


Abbildung 64: Korrelationsdiagramme für die Korrelation zwischen Berechneten Daten (FEP/MD) und mittels ITC gemessenen Daten.

Wie zu erkennen ist, erhält man bis auf wenige Ausnahmen eine recht gute Korrelation zwischen den berechneten Werten und den gemessenen Daten. Auffällig ist hierbei, dass für beide Mutanten Permutationen der Pyrrolidinderivate, insbesondere bei C-Methylierung nahe des Stickstoffatoms (Ligand 16, 17 und 27) zu Abweichungen zwischen den berechneten Werten und den gemessenen Werten führen.

Das Computermodell sagt eine Steigerung der Affinität bzw. bei der Permutation 27-13 eine Beibehaltung der Affinität vor, gemessen wurde allerdings jeweils eine Verringerung der Affinität. Die Messungen sind hierbei eindeutig, so dass eine fehlerhafte Interpretation der Messdaten nahezu ausgeschlossen ist – die Abweichungen müssen daher auf eine nicht ausreichend genaue Beschreibung des Bindeverhaltens dieser Substanzen zurückzuführen sein. Die Affinitätsreduktion bei allen diesen Permutationen ist enthalpisch bedingt, so dass der Schluss nahe liegt, dass die Position in der Bindetasche nicht genau genug modelliert wird.

Die Abweichung der Permutation 17-16 bei der Messung mit Udon kann jedoch auch durch eine fehlerhafte Messung bedingt sein. Die Anbindung ist mit einer niederen Affinität und einer geringen Enthalpie verbunden, was somit sehr leicht zu einer Fehlinterpretation der Daten führt. Leider stand eine nicht ausreichend genügende Menge an diesem Ligand zur Verfügung, um die Affinitätskonstante durch weitere Experimente zu erhärten.

Für Weybridge erhält man zudem eine systematische Abweichung bei der Permutation 11/10. Hier sagen die Berechnungen eine leichte Steigerung der Affinität voraus, die Messung zeigen allerdings eine Reduktion der Affinität an. Um sicher zu gehen, dass die ITC-Messungen hier das richtige Ergebnis zeigen und es sich nicht um einen Messfehler handelt, wurden beide Liganden jeweils mit einer anderen Konzentration an Peptid erneut vermessen. Alle Ergebnisse zeigten dabei eine geringere Affinität für Ligand 11 als für Ligand 10. Der starke Abfall der Affinität ist in diesem Fall entropisch bedingt. Anders als für Udon kann bei dieser Permutation die ungünstigere Bindungsentropie nicht durch einen Gewinn an Enthalpie kompensiert werden. Eine fehlerhafte Messung kann zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden, jedoch legt dies somit den Schluss nahe, dass auch für Ligand 11 die exakte Position innerhalb der

Ergebnisse und Diskussion

Bindungstasche vom Modell nicht genau genug wiedergegeben wird und es hier noch einen weiteren Anpassungsbedarf des Modelles gibt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit (Kapitel 4.1) wurde untersucht, inwiefern molekular geprägte Nanopartikel als sensitive Schicht für optische Sensoren eingesetzt werden können. Hierzu wurden zunächst verschiedene Möglichkeiten zur Immobilisierung untersucht und hinsichtlich ihrer Eignung bewertet. Die am besten geeignete Methode, die zu einer hohen Oberflächenbelegung führte, eine sehr gute Reproduzierbarkeit aufwies, geringe unspezifische Wechselwirkungen zeigte und zu hohen und stabilen Sensorsignalen führte, stellte dabei die nichtkovalente Immobilisierung auf APTES dar.

Es konnte gezeigt werden, dass die sensitiven Schichten basierend auf MIPs eine hohe Langzeitstabilität aufweisen, in einem breiten pH-Bereich und auch bei höheren Temperaturen als Erkennungselement einsetzbar sind. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Sensors hingen dabei sehr stark vom eingesetzten Solvens zur Detektion ab, wobei die niedrigste erreichte Nachweisgrenze bei 30 mg/L lag. Jedoch zeigten die temperaturabhängigen Messungen auch auf, dass es bei einer Temperatur von 60 °C zu einer Ablösung der elektrostatisch immobilisierten MIPs kam.

Um die Stabilität der Schichten weiter zu erhöhen, wurden verschiedene Ansätze zur kovalenten Immobilisierung der Partikel evaluiert. Ohne weitere Modifikation der Partikel war dabei eine zufriedenstellende kovalente Immobilisierung nicht möglich. Die Verwendung von Partikeln mit azid- bzw. alkinfunktionalisierten Ankergruppen ermöglichte eine kovalente Anbindung über eine Huisgenreaktion. Dies führte zu sehr stabilen und gut reproduzierbaren sensitiven Schichten, die eine hohe Oberflächenbelegung aufwiesen und sich gut für RfS-Messungen eigneten. Durch die Modifikation der Partikel mit alkin- bzw. azidfunktionalisierten Ankergruppen wurde deren Affinität allerdings reduziert. Trotz reduzierter Affinität blieb der Prägeeffekt erhalten, wobei die Affinitätsreduktion bei Verwendung von alkinfunktionalisierten Ankergruppen deutlich stärker ausfiel.

Die Etablierung einer Methode zur elektrostatischen Immobilisierung erlaubte es dabei im zweiten Teil (Kapitel 4.2) dieser Arbeit Untersuchungen zur molekularen Erkennung der geprägten Polymerpartikel durchzuführen. Durch den Vergleich mit Sorptionsmessungen in Lösung wurde aufgezeigt, dass die absolute Signalhöhe in RfS-Messungen als Evaluierungsmerkmal für den Prägeeffekt ungeeignet ist und es einer detaillierteren Analyse der Messsignale für aussagekräftige Schlussfolgerungen bedarf.

Bei der Untersuchung des Prägeeffektes und dessen Abhängigkeit vom verwendeten Solvens zur Detektion wurde in Kapitel 4.2.1 zunächst die Selektivität der geprägten Polymere evaluiert. Beim Vergleich mit strukturell sehr ähnlichen Molekülen wurde festgestellt, dass durch das Prägen ein Selektivitätsgewinn erzielt wird und eine Unterscheidung von Enantiomeren möglich ist. Die Selektivität zeigte eine leichte Abhängigkeit vom Solvens und war bei einem Methanolgehalt von 30 % maximal. Die Selektivität war dabei zudem abhängig von der

Analytkonzentration, was durch das Vorhandensein von Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität im MIP verursacht wurde.

In Kapitel 4.2.2 wurde aufgezeigt, dass für MIPs eine Scatchard Analyse des Bindungssignales möglich ist, um die Affinitätskonstante zu ermitteln. Durch die Evaluierung der Messwerte bei hoher Konzentration konnte so die mittlere Affinität der Bindungsstellen ermittelt werden. Der Vergleich mit in homogener Phase ermittelten Affinitätskonstanten zeigte dabei eine gute Übereinstimmung. Die Affinitätskonstanten nahmen für MIP und NIP mit steigendem Wassergehalt zu, ihr Verhältnis und somit der Prägeeffekt wurde hierbei bei zunehmendem Wassergehalt kleiner.

Kapitel 4.2.3 diskutierte die kinetische Analyse des Bindungssignals. Für das NIP konnte zur Beschreibung des Dissoziationsverhaltens eine Kinetik erster Ordnung verwendet werden. Für das MIP mussten für eine gute Beschreibung der Dissoziationsphase zwei Kinetiken erster Ordnung überlagert werden. Die kleinere Dissoziationsratenkonstante wies bei geringem Wassergehalt und bei kleinen Analytkonzentrationen die höchste Gewichtung auf und ließ sich so hochaffinen Bindungsstellen im MIP zuordnen. Die niederaffinen Bindungsstellen im MIP zeigten dabei eine höhere Dissoziationsratenkonstante als das NIP. Dies wurde durch die höhere Porosität des MIP, aber auch durch Bindungsstellen, die mehrere Analytmoleküle enthalten, verursacht. Bei der Betrachtung der Assoziationsphase konnte aufgezeigt werden, dass ein bimolekulares Modell zur Beschreibung des Verlaufes der Bindungskurve angewendet werden kann. Hierzu durfte jedoch nicht der Anfang der Assoziationsphase mit einbezogen werden, da es sonst durch die anfängliche Sättigung hochaffiner Bindungsstellen zu systematischen Abweichungen kam. Der Vergleich mit der in homogener Phase ermittelten Wechselwirkungskinetik zeigte dabei eine gute Übereinstimmung. Die Assoziationsratenkonstanten zeigten ebenfalls eine Abhängigkeit vom Solvens und stiegen mit zunehmendem Wassergehalt an, was sich auf die zunehmend schlechtere Solvatisierung des Templatmoleküls zurückführen lässt.

Durch kalorimetrische Messungen konnte in Kapitel 4.2.4 die Enthalpie und Entropie der Wechselwirkung zwischen Templatmolekül und Polymerpartikel bestimmt werden. Die Wechselwirkung mit dem MIP war dabei enthalpisch günstiger als die Wechselwirkung mit dem NIP. Die Prägeenthalpie war abhängig vom Wassergehalt und wies bei einem Methanolgehalt von 30 % einen Maximalwert auf, was die erhöhte Enantioselektivität bei dieser Solvenszusammensetzung verursachte. Der Entropiegewinn bei der Wechselwirkung mit dem Templatmolekül war für das MIP geringer als für das NIP. Dies war bedingt durch die spezifischen und selektiven Bindungstaschen, in welche das Templatmolekül nur bei passgenauer Orientierung angebonden werden konnte. Aus diesen Ergebnissen konnte gefolgert werden, dass mit steigendem Wassergehalt eine zunehmende Belegung von Bindungsstellen hoher Selektivität erfolgt.

Im Gesamten ergab die Analyse der Thermodynamik und Kinetik der Wechselwirkung in Kapitel 4.2, dass die zunehmende Affinität von MIP und NIP mit steigendem Wassergehalt hauptsächlich durch die schlechter werdende Löslichkeit des Analyten verursacht wird. Diese schlechtere Solvatisierung führte zum Anstieg der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten von MIP und NIP bei steigendem Wassergehalt. Die Reduktion des Prägeeffektes war bedingt durch

die zunehmende Gewichtung der langsameren Dissoziationskinetik des MIP. Dies deutete auf eine vermehrte Belegung hochselektiver Bindungsstellen im MIP hin, welche eine passgenaue Orientierung des Templatmoleküles erfordert. Dieser Prozess ist enthalpisch sehr günstig, wird aber durch eine ungünstige Bindungsentropie überkompensiert. Die freie Bindungsenthalpie stieg für das MIP daher in Relation zum NIP langsamer an, es kam somit zwar zu einer Erhöhung der Selektivität, jedoch auch zu einer Reduktion des Prägeeffektes.

Kapitel 4.3 dieser Arbeit befasste sich mit Analyse von Auswirkungen struktureller Änderungen von Liganden auf deren Fähigkeit zur Anbindung in die Bindungstasche des M2-Protonenkanals. Hierfür wurde eine Methode basierend auf ITC entwickelt, die es erlaubte, Affinität, Enthalpie und Entropie dieser Wechselwirkungen zu bestimmen. Die Korrelation dieser thermodynamischen Parameter mit der Molekülstruktur der Liganden erlaubten es, Erklärungen für die auftretenden Affinitätsänderungen zu finden.

Die Liganden zeigten gegenüber Weybridge meist eine höhere Affinität als gegenüber Udorn, obwohl sich die Wechselwirkung mit Udorn durch einen höheren relativen Anteil und absoluten Wert der Enthalpie auszeichnete. Dies ist bedingt durch das geringere Volumen der Bindungstasche von Udorn, was zu einer enthalpisch günstigeren Bindeposition führt. Durch die engere Anbindung werden die konformativen Freiheitsgrade der gebundenen Liganden stark reduziert, was zu einer geringeren Bindungsentropie bei der Wechselwirkung mit Udorn führt und zudem die stärkere Abhängigkeit der Affinitätskonstanten von der Molekülstruktur für Udorn verursacht.

5.2 Ausblick

Diese Arbeit zeigte erstmals auf, dass eine thermodynamische und kinetische Charakterisierung der Bindungseigenschaften von molekular geprägten Polymeren mittels der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie möglich ist. Diese Methode zur Charakterisierung der Partikel ist gegenüber den klassischerweise angewendeten Batch Bindungsexperimenten deutlich schneller, kostengünstiger und flexibler anwendbar. Wie aufgezeigt wurde, kann man durch geschickte Variation der Versuchsparameter, insbesondere durch eine kinetische Charakterisierung, Aufschlüsse über den Mechanismus der molekularen Erkennung erhalten. Für die Weiterentwicklung bzw. für die Entwicklung von neuen MIPs ist es demnach sehr empfehlenswert, die Bindungseigenschaften statt mit recht aufwändigen Batch Bindungsexperimenten, durch Untersuchungen an der heterogenen Phase zu charakterisieren.

Möchte man MIPs nicht charakterisieren sondern diese „nur“ als sensitive Schicht in Sensoren einsetzen, so empfiehlt es sich sehr, MIPs in Form von Nanopartikeln zu verwenden. Die Sensoransprechzeiten sind kurz (ca. 100 s bis zum Erreichen des Gleichgewichtes), die Oberflächen regenerierbar und stabil. Zudem kann man auch bei einer (im Vergleich zu biomolekularen Wechselwirkungen) geringen Affinität der Partikel mit einer K_D von ca. 30 μM kleine Moleküle mit wenigen hundert Dalton Molekulargewicht im $\mu\text{g/L}$ Bereich markierungsfrei nachweisen. Möchte man die Nachweisgrenzen weiter senken, so wäre ein möglicher Ansatz hierfür die Zahl der Partikel auf der Oberfläche weiter zu erhöhen. Denkbar wäre z.B. dass man, basierend auf der in dieser Arbeit aufgezeigten Methode zur Immobilisierung der Partikel mittels Klick-Chemie, alternierend azid- und alkinfunktionalisierte Partikel aufbringt und so mehrere

Schichten an Partikeln erhält. Durch diese kovalente Immobilisierung hat man zudem auch die Stabilität die für einen Einsatz des Sensors, auch unter sehr widrigen Bedingungen, nötig ist.

Die im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Wechselwirkung des M2-Protonenkanals mit verschiedenen Liganden legten die Basis zur Generierung eines FEP/MD Modells zur Beschreibung der Wechselwirkung. Dieses zeigt bis auf wenige Ausnahmen eine recht gute Korrelation zwischen experimentellen und berechneten Daten. Beides, experimentelle Daten sowie die computergestützte Simulation der Wechselwirkung, sind von hoher Bedeutung, um den genauen Bindemechanismus zu verstehen. Dieses Verständnis legt dabei die Basis dafür, sehr zielgerichtet nach neuen Substanzen zu suchen, die zukünftig als antivirale Medikamente eingesetzt werden können. Durch die experimentelle Verifizierung des Computermodells können so verlässliche Prognosen über die Wechselwirkung des M2-Protonenkanals mit solchen neuen, vielversprechenden Substanzen erstellt werden.

Dies ist insbesondere deshalb von hoher Bedeutung, da zunehmende Resistenzen der Virenstämme gegenüber den althergebrachten Medikamenten auftreten. Das Verständnis über den Bindemechanismus der Substanzen und das daraus abgeleitete Computermodell erlaubt es nun sehr schnell die genaue molekulare Auswirkung der Mutation, die zur Resistenz führte, nachzuvollziehen und durch eine entsprechende Änderung in der Molekularstruktur der antiviralen Medikamente dieser Mutation entgegen zu treten.

6. Literaturverzeichnis

1. Ruigrok, V.J.B., et al., *Alternative affinity tools: more attractive than antibodies?* Biochemical Journal, 2011. **436**: p. 1-13.
2. Jayasena, S.D., *Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics*. Clinical Chemistry, 1999. **45**(9): p. 1628-1650.
3. Binz, H.K., P. Amstutz, and A. Pluckthun, *Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains*. Nature Biotechnology, 2005. **23**(10): p. 1257-1268.
4. Haupt, K., et al., *Molecularly Imprinted Polymers*. Molecular Imprinting, 2012. **325**: p. 1-28.
5. Wulff, G., *Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates - a way towards artificial antibodies*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1995. **34**(17): p. 1812-1832.
6. Nopper, D.C., *Charakterisierung neuartiger sensitiver Materialien für optische Sensoren in flüssiger Phase*, 2000, Dissertation, Universität Tübingen
7. Delaney, T.L., et al., *Capacitive detection in ultrathin chemosensors prepared by molecularly imprinted grafting photopolymerization*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(8): p. 3220-3225.
8. Bruggemann, O., et al., *New configurations and applications of molecularly imprinted polymers*. Journal of Chromatography A, 2000. **889**(1-2): p. 15-24.
9. Jäger, S., *Entwicklung optischer Sensoren für die Boden-, Grundwasser- und Gewässeranalytik*. 2010, Berlin: Rhombos.
10. Tovar, G.E.M., I. Krauter, and C. Gruber, *Molecularly imprinted polymer nanospheres as fully synthetic affinity receptors*. Colloid Chemistry li, 2003. **227**: p. 125-144.
11. Anders, H., *Dünne Schichten für die Optik : mit 94 Abb. u. 3 Farbtaf.* Optik und Feinmechanik in Einzeldarstellungen. 1965, Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
12. Brecht, A., *Interferenzspektroskopische Untersuchung von Affinitätsreaktionen*. 1993, Dissertation, Universität Tübingen
13. Proll, F., et al., *Label-free characterisation of oligonucleotide hybridisation using reflectometric interference spectroscopy*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **382**(8): p. 1889-1894.
14. Wedler, G.F., Hans-Joachim, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. Vol. 6. Auflage. 2012, Weinheim: Wiley-VCH.
15. Wiseman, T., et al., *Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter*. Analytical Biochemistry, 1989. **179**(1): p. 131-137.
16. Atkins, P.W., *Physikalische Chemie*. 5. Aufl. ed. Physikalische Chemie. 2013, Weinheim: Wiley-VCH.
17. Muller, P., *Glossary of terms used in physical organic chemistry*. Pure & Applied Chemistry, 1994. **66**(2): p. 1077-1184.
18. Markovitch, O. and N. Agmon, *Structure and Energetics of the Hydronium Hydration Shells*. The Journal of Physical Chemistry A, 2007. **111**(12): p. 2253-2256.
19. Piehler, J., *Modifizierung von Oberflächen für die thermodynamische und kinetische Charakterisierung biomolekularer Erkennung mit optischen Transducern*, 1997, Dissertation, Universität Tübingen
20. Wulff, G. and A. Sarhan, *Use of polymers with enzyme-analogous structures for resolution of recamates*. Angewandte Chemie-International Edition, 1972. **11**(4): p. 341.
21. Arshady, R. and K. Mosbach, *Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization*. Macromolecular Chemistry and Physics-Makromolekulare Chemie, 1981. **182**(2): p. 687-692.

22. Haupt, K., *Molecularly Imprinted Polymers: The Next Generation*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(17): p. 376-383.
23. Nicholls, I.A., et al., *Theoretical and computational strategies for rational molecularly imprinted polymer design*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. **25**(3): p. 543-552.
24. Takeuchi, T., D. Fukuma, and J. Matsui, *Combinatorial Molecular Imprinting: An Approach to Synthetic Polymer Receptors*. Analytical Chemistry, 1998. **71**(2): p. 285-290.
25. Wulff, G. and K. Knorr, *Stoichiometric noncovalent interaction in molecular imprinting*. Bioseparation, 2001. **10**(6): p. 257-276.
26. Spivak, D.A., *Selectivity in Molecularly Imprinted Matrices*, in *Molecularly imprinted materials Science and Technology*, M.R. MYan, Olof, Editor. 2005, Marcel Dekker: New York.
27. Muhammad, T., et al., *Rational design of molecularly imprinted polymer: the choice of cross-linker*. Analyst, 2012. **137**(11): p. 2623-2628.
28. Chen, L., S. Xu, and J. Li, *Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications*. Chemical Society Reviews, 2011. **40**(5): p. 2922-2942.
29. Cacho, C., et al., *Characterisation and quality assessment of binding sites on a propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation*. Journal of Chromatography B, 2004. **802**(2): p. 347-353.
30. Jing, T., et al., *Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted solid-phase extraction*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **393**(8): p. 2009-2018.
31. Tan, C.J. and Y.W. Tong, *Preparation of Superparamagnetic Ribonuclease A Surface-Imprinted Submicrometer Particles for Protein Recognition in Aqueous Media*. Analytical Chemistry, 2006. **79**(1): p. 299-306.
32. Tan, C.J. and Y.W. Tong, *Molecularly imprinted beads by surface imprinting*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **389**(2): p. 369-376.
33. Lieberzeit, P.A., et al., *Imprinting as a versatile platform for sensitive materials – nanopatterning of the polymer bulk and surfaces*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2005. **111–112**(0): p. 259-263.
34. Kempe, M., M. Glad, and K. Mosbach, *An approach towards surface imprinting using the enzyme ribonuclease A*. Journal of Molecular Recognition, 1995. **8**(1-2): p. 35-39.
35. Pérez, N., M.J. Whitcombe, and E.N. Vulfson, *Molecularly imprinted nanoparticles prepared by core-shell emulsion polymerization*. Journal of Applied Polymer Science, 2000. **77**(8): p. 1851-1859.
36. Vaihinger, D., et al., *Molecularly imprinted polymer nanospheres as synthetic affinity receptors obtained by miniemulsion polymerisation*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2002. **203**(13): p. 1965-1973.
37. Piletsky, S.A., et al., *Recognition of ephedrine enantiomers by molecularly imprinted polymers designed using a computational approach*. Analyst, 2001. **126**(10): p. 1826-1830.
38. Shea, K.J. and D.Y. Sasaki, *An analysis of small-molecule binding to functionalized synthetic polymers by ¹³C CP/MAS NMR and FT-IR spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 1991. **113**(11): p. 4109-4120.
39. Katz, A. and M.E. Davis, *Investigations into the mechanisms of molecular recognition with imprinted polymers*. Macromolecules, 1999. **32**(12): p. 4113-4121.
40. Lehmann, M., et al., *Affinity parameters of amino acid derivative binding to molecularly imprinted nanospheres consisting of poly (ethylene glycol dimethacrylate)-co-(methacrylic acid)*. Journal of Chromatography B, 2004. **808**(1): p. 43-50.

41. Rampey, A.M., et al., *Characterization of the Imprint Effect and the Influence of Imprinting Conditions on Affinity, Capacity, and Heterogeneity in Molecularly Imprinted Polymers Using the Freundlich Isotherm-Affinity Distribution Analysis*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(4): p. 1123-1133.
42. Umpleby, R.J., et al., *Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir-Freundlich isotherm*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(19): p. 4584-4591.
43. Andersson, L.I., *Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field*. Journal of Chromatography B, 2000. **745**(1): p. 3-13.
44. Cheong, W.J., S.H. Yang, and F. Ali, *Molecular imprinted polymers for separation science: A review of reviews*. Journal of Separation Science, 2013. **36**(3): p. 609-628.
45. Ansell, R.J., *Molecularly imprinted polymers in pseudoimmunoassay*. Journal of Chromatography B, 2004. **804**(1): p. 151-165.
46. Resmini, M., K. Flavin, and D. Carboni, *Microgels and Nanogels with Catalytic Activity*. Molecular Imprinting, 2012. **325**: p. 307-342.
47. Puoci, F., et al., *Molecularly imprinted polymers in drug delivery: state of art and future perspectives*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2011. **8**(10): p. 1379-1393.
48. Kandimalla, V.B. and H.X. Ju, *Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004. **380**(4): p. 587-605.
49. Henry, O.Y.F., D.C. Cullen, and S.A. Piletsky, *Optical interrogation of molecularly imprinted polymers and development of MIP sensors: a review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **382**(4): p. 947-956.
50. Moreno-Bondi, M.C., et al., *Molecularly Imprinted Polymers as Selective Recognition Elements in Optical Sensing*. Current Analytical Chemistry, 2008. **4**(4): p. 316-340.
51. Nopper, D., et al., *Amidine-based molecularly imprinted polymers - new sensitive elements for chiral chemosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2003. **377**(4): p. 608-613.
52. Belmont, A.S., et al., *Molecularly imprinted polymer films for reflectometric interference spectroscopic sensors*. Biosensors & Bioelectronics, 2007. **22**(12): p. 3267-3272.
53. Martin, K. and A. Heleniust, *Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: The viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import*. Cell, 1991. **67**(1): p. 117-130.
54. Ciampor, F., et al., *Evidence that the amantadine-induced, M2-mediated conversion of Influenza-A virus hemagglutinin to the low pH conformation occurs in an acidic transgolgi compartment*. Virology, 1992. **188**(1): p. 14-24.
55. Tominack, R.L. and F.G. Hayden, *Rimantadine hydrochloride and amantadine hydrochloride use in influenza A virus infections*. Infectious disease clinics of North America, 1987. **1**(2): p. 459-78.
56. Deyde, V.M., et al., *Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide*. Journal of Infectious Diseases, 2007. **196**(2): p. 249-257.
57. Kolocouris, N., et al., *Design and synthesis of bioactive adamantane spiro heterocycles*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007. **17**(15): p. 4358-4362.
58. Zoidis, G., et al., *Heterocyclic rimantadine analogues with antiviral activity*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006. **14**(10): p. 3341-3348.
59. Kolocouris, A., et al., *Synthesis of 2-(2-adamantyl)piperidines and structure anti-influenza virus A activity relationship study using a combination of NMR spectroscopy and molecular modeling*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999. **9**(24): p. 3465-3470.
60. Ayton, G.S. and G.A. Voth, *Multiscale simulation of transmembrane proteins*. Journal of Structural Biology, 2007. **157**(3): p. 570-578.

61. Stouffer, A.L., et al., *Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel*. Nature, 2008. **451**(7178): p. 596-613.
62. Hu, J., et al., *Backbone structure of the amantadine-blocked trans-membrane domain M2-Proton channel from influenza A virus*. Biophysical Journal, 2007. **92**(12): p. 4335-4343.
63. Gkeka, P., et al., *Free Energy Calculations Reveal the Origin of Binding Preference for Aminoadamantane Blockers of Influenza A/M2TM Pore*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2012. **9**(2): p. 1272-1281.
64. Hu, J., R. Fu, and T.A. Cross, *The Chemical and Dynamical Influence of the Anti-Viral Drug Amantadine on the M2-Proton Channel Transmembrane Domain*. Biophysical Journal, 2007. **93**(1): p. 276-283.
65. Leonov, H., et al., *How Do Aminoadamantanes Block the Influenza M2 Channel, and How Does Resistance Develop?* Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(25): p. 9903-9911.
66. Schnell, J.R. and J.J. Chou, *Structure and mechanism of the M2-Proton channel of influenza A virus*. Nature, 2008. **451**(7178): p. 591-612.
67. Astrahan, P., et al., *A novel method of resistance for influenza against a channel-blocking antiviral drug*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2004. **55**(2): p. 251-257.
68. Salom, D., et al., *pH-dependent tetramerization and amantadine binding of the transmembrane helix of M2 from the influenza A virus*. Biochemistry, 2000. **39**(46): p. 14160-14170.
69. Flegler, S.L., J.W. Heckman, and K.L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie : Grundlagen, Methoden, Anwendungen*. 1995, Heidelberg [u.a.]: Spektrum.
70. Hemminger, W. and G. Höhne, *Grundlagen der Kalorimetrie*. 1979, Weinheim [u.a.]: Verl. Chemie.
71. Ehni, M., *Validierung und Assayimplementierung im Rahmen der Entwicklung eines neuen optischen Biosensorsystems für die medizinische Diagnostik*, 2012, Dissertation, Universität Tübingen
72. Asenath-Smith, E. and W. Chen, *How To Prevent the Loss of Surface Functionality Derived from Aminosilanes*. Langmuir, 2008. **24**(21): p. 12405-12409.
73. Morawietz, T., *Kovalente Immobilisierung von Acrylat-Copolymerpartikeln auf Glas und glasähnlichen Oberflächen mittels Klick Chemie für Sensoranwendungen*, 2011, Masterarbeit, Hochschule Esslingen / Hochschule Aalen
74. Kolarov, F., *Entwicklung und Charakterisierung von Strategien zur Immobilisierung molekular geprägter Nanopartikel für die optische Sensorik*. 2009, Diplomarbeit, Universität Tübingen
75. Huisgen, R., *Concerted nature of 1,3-dipolar cycloadditions and questions of diredicalic intermediates*. Journal of Organic Chemistry, 1976. **41**(3): p. 403-419.
76. Horemans, F., et al., *Towards water compatible MIPs for sensing in aqueous media*. Journal of Molecular Recognition, 2012. **25**(6): p. 344-351.
77. Schurig, V., *Use of derivatized cyclodextrins as chiral selectors for the separation of enantiomers by gas chromatography*. Annales Pharmaceutiques Françaises, 2010. **68**(2): p. 82-98.
78. Weber, A., et al., *Isothermal titration calorimetry of molecularly imprinted polymer nanospheres*. Macromolecular Rapid Communications, 2002. **23**(14): p. 824-828.
79. Mohsen-Nia, M. and H. Amiri, *Measurement and modelling of static dielectric constants of aqueous solutions of methanol, ethanol and acetic acid at T=293.15 K and 91.3 kPa*. The Journal of Chemical Thermodynamics, 2013. **57**(0): p. 67-70.
80. Kolocouris, A., et al., *Comparisons of the influenza virus A M2 channel binding affinities, anti-influenza virus potencies and NMDA antagonistic activities of 2-alkyl-2-*

-
- aminoadamantanes and analogues*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008. **18**(23): p. 6156-6160.
81. Czabotar, P.E., S.R. Martin, and A.J. Hay, *Studies of structural changes in the M2-Proton channel of influenza A virus by tryptophan fluorescence*. Virus Research, 2004. **99**(1): p. 57-61.
82. Gkeka, P., et al., *Free Energy Calculations Reveal the Origin of Binding Preference for Aminoadamantane Blockers of Influenza A/M2TM Pore*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2013. **9**(2): p. 1272-1281.
83. Eleftheratos, S., et al., *Interaction of aminoadamantane derivatives with the influenza A virus M2 channel-Docking using a pore blocking model*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010. **20**(14): p. 4182-4187.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

μ_i	Dipolmoment
1- λ -RIFS	1- λ -Reflectometric Interference Sensing
AFM	Rasterkraftmikroskop
Am	Amantadin
AMD	Aminodextran
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
AS	Aminosäure
BSE	Rückstreuelektronen
c	Lichtgeschwindigkeit innerhalb von Materie, Konzentration, Wisemankonstante
c_0	Lichtgeschwindigkeit im Vakuum
DA-PEG	Diaminopolyethylenglycol
D-BFA	D-Boc-Phenylalaninanilid
ΔG	Freie Enthalpie
ΔG^0	Freie Standardenthalpie
ΔH	Enthalpie
ΔH^0	Standardenthalpie
DMSO	Dimethylsulfoxid
Δnd	Änderung der optischen Schichtdicke
DPC	Dodecylphosphocholin
ΔS	Entropie
ΔS^0	Standardentropie
FEP	Free Energy Perturbation
Gl.	Gleichung
GOPTS	3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
k	Boltzmannkonstante
k_a	Assoziationsratenkonstante
K_A	Assoziationskonstante
k_d	Dissoziationsratenkonstante
K_D	Dissoziationskonstante
λ	Wellenlänge
L	Ligand
L-BFA	L-Boc-Phenylalaninanilid

L-BLA	L-Boc-Leucinanilid
L-BYA	L-Boc-Tyrosinanilid
L_{ges}	Gesamte Stoffmenge an Ligand
LR	Ligand-Rezeptor-Komplex
LOD	Limit of Detection, Nachweisgrenze
LOQ	Limit of quantification, Bestimmungsgrenze
M	mol/L
M2TM	Transmembrandomäne des M2-Protonenkanals
MD	Molekular Dynamische Berechnungen
MeOH	Methanol
MIP	Molekular geprägtes Polymer
n	Brechungsindex
nanoMIP	Molekular geprägte Polymernanopartikel
nanoNIP	Nicht geprägte Polymernanopartikel
NIP	Nicht geprägtes Polymer
PEG	Polyethylenglycol
R	Reflektivität, Gaskonstante, Rezeptor
r	Abstand
REM	Rasterelektronenmikroskop
R_{ges}	Gesamte Stoffmenge an Rezeptor
RIFS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
Rim	Rimantadin
RMS	Mittlere Oberflächenrauigkeit
S	Signal
sdv	Standardabweichung
SE	Sekundärelektronen
T	Temperatur
TM-Komplex	Templat-Monomer Komplex
U	Spannung
V	Potential, Volumen
W	Arbeit
α	Polarisierbarkeit
$\Gamma(t)$	Oberflächenbelegung
Γ_{GG}	Gleichgewichtsbeladung der Oberfläche
Γ_{max}	Maximalbeladung der Oberfläche
ϵ_0	Elektrische Feldkonstante im Vakuum

7.2 Veröffentlichungen:

7.2.1 Publikationen

„EUROPT(R)ODE X – Tenth European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors“, Katrin Krieg, Dominik Furin, Christiane Albrecht, Felix Kolarov, Melanie Ewald, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **398**(5): p. 1863-1864

„ANAKON 2011 – German Thoroughness meets Swiss Precision“, Oliver Bleher, Melanie Ewald, Felix Kolarov, Katrin Krieg, Alexander Le Blanc, Sabrina Rau, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **401**(3): p. 871-872

„Eighth advanced study course on optical chemical sensors--ASCOS“, Katrin Krieg; Sabrina Rau, Oliver Bleher, Felix Kolarov, Melanie Ewald, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **401**(10): p. 3037-3038

„Optical sensors with molecularly imprinted nanospheres: a promising approach for robust and label-free detection of small molecules“, Felix Kolarov, Klaus Niedergall, Monika Bach, Günter Tovar, Günter Gauglitz, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **402**(10): p. 3245-3252

„Ein Innovatives Sensorsystem zur Bestimmung von Nanopartikeln in komplexen Matrices“, Julia Widmaier, Felix Kolarov, Dominik Furin, Günter Gauglitz, Dresdner Beiträge zur Sensorik (2013), p. 85-88

7.2.2 Poster

„Covalently immobilized molecularly imprinted nanoparticles as sensitive layer for optical sensors“, Felix Kolarov, Stefanie Jäger, Klaus Niedergall, Günter Tovar, Günter Gauglitz, Europt(r)ode X, 28.3.-31.3.2010, Prag

„Molecularly imprinted nanospheres for optical sensors“ Felix Kolarov, Stefanie Jäger, Klaus Niedergall, Günter Tovar, Günter Gauglitz, 3rd EuChemS Chemistry Congress, 29.8.-2.9.2010, Nürnberg

„Molecularly imprinted nanospheres for optical sensors“ Felix Kolarov, Janina Hirdler, Klaus Niedergall, Günter Tovar, Günter Gauglitz, ANAKON 2011, 22.3.-25.3.2011, Zürich

„Affinity studies of novel antiviral drugs by isothermal microcalorimetry“ Felix Kolarov, Antonios Kolocouris, Günter Gauglitz, EUROanalysis 16, 11.9.-15.9.2011, Belgrad

„INSTANT – Innovative sensor for the fast analysis of nanoparticles in selected target products“ Felix Kolarov, Jennifer Adam, Dominik Furin, Günther Proll, Günter Gauglitz, Analytica 2012, 17.-20.4.2012, München

„BIO-MIP Biomimetischer Sensor zur inline Prozessanalytik“ Felix Kolarov, Günter Tovar, Monika Bach, Günter Gauglitz, ProcessNet Jahressagung, 10.-13.9.2012, Karlsruhe

„Molekular geprägte Polymere in der Sensorik. Woher kommen Selektivität und Prägeeffekt?“ Felix Kolarov, Günter Tovar, Günter Gauglitz, ANAKON 2013, 4.3.-7.3.2013, Essen

„Molecularly imprinted polymers as recognition element in optical sensors“, Felix Kolarov, Günter Tovar, Günter Gauglitz, 125. BASF Summercourse, 20.7.-8.8.2013, Ludwigshafen

7.2.3 Vorträge

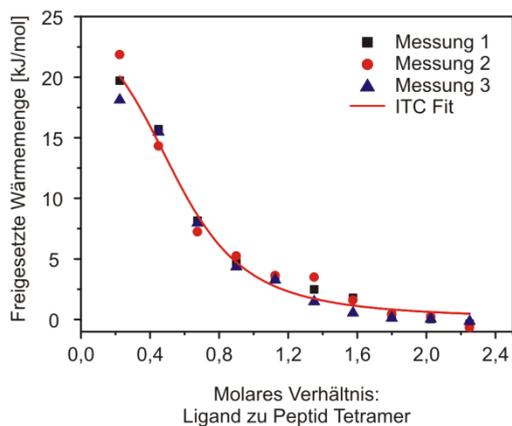
„Geprägte Nanopartikel für die optische Sensorik“, Felix Kolarov, 4. Interdisziplinäres Doktorandenseminar, 21.2.-23.2.2010, Attendorn

7.3 Akademische Lehrer

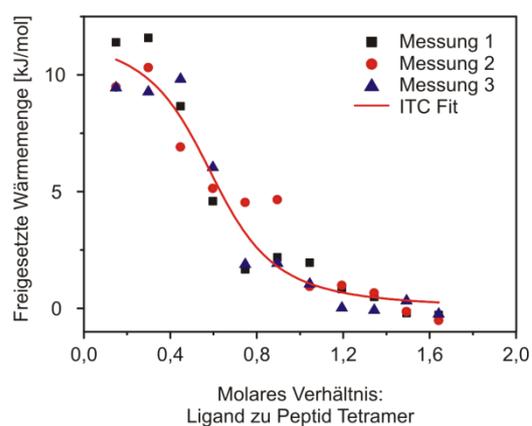
Prof. Dr. K. Albert, Prof. Dr. T. Chasse, Prof. Dr. D. Christen, Prof. Dr. H. Eckstein, Prof. Dr. G. Gauglitz, Prof. Dr. Ihringer, Prof. Dr. W. Jäger, PD Dr. Mack, Prof. Dr. M. Maier, Prof. Dr. H. Mayer, Prof. Dr. A. Meixner, Prof. Dr. H.J. Meyer, Prof. Dr. U. Nagel, Prof. Dr. Oberhammer, Prof. Dr. C. Ochsenfeld, PD Dr. Peisert, PD Dr. H. Pommer, Prof. Dr. V. Schurig, Prof. Dr. Schwarz, Prof. Dr. E. Schweda, Prof. Dr. B. Speiser, Prof. Dr. U. Weimar, Prof. Dr. L. Wesemann, Prof. Dr. K.P. Zeller, Prof. Dr. T. Ziegler

7.4 Titrationskurven der ITC-Messungen

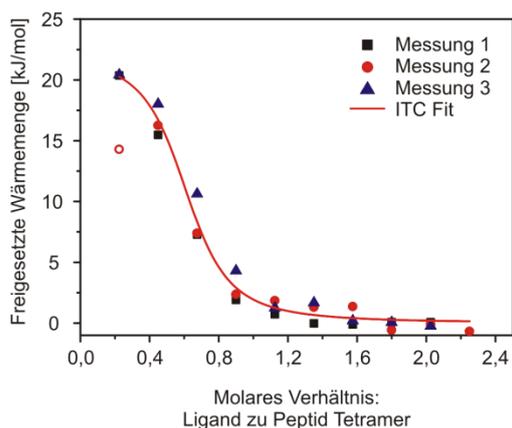
Udorn mit Amantadin



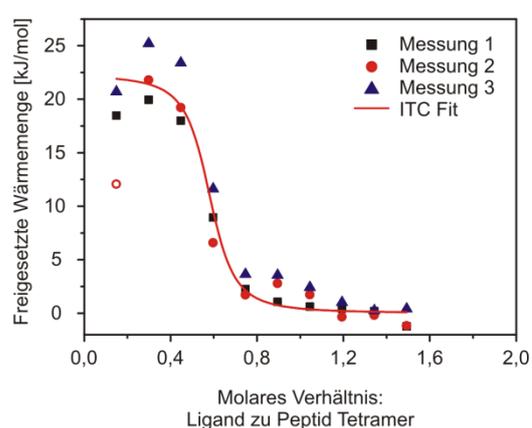
Weybridge mit Amantadin



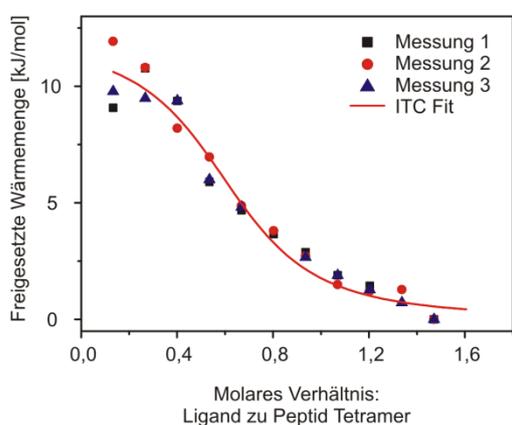
Udorn mit Rimantadin



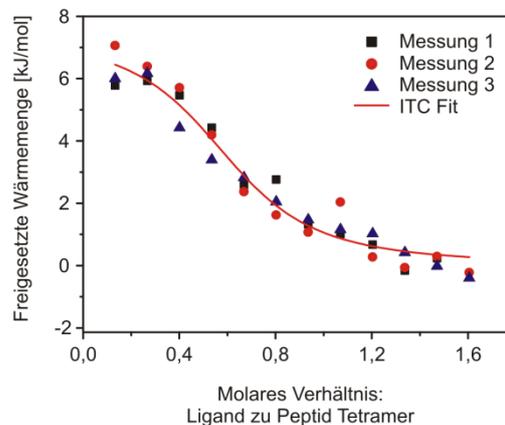
Weybridge mit Rimantadin



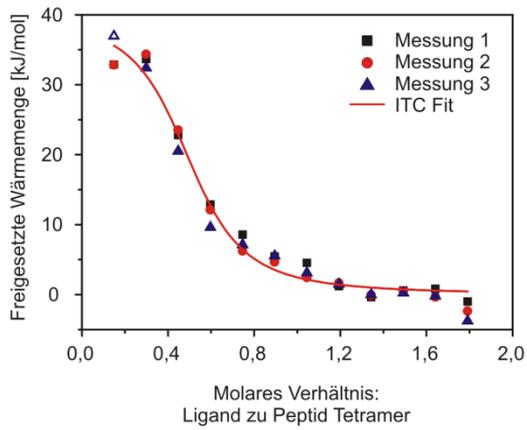
Udorn mit Ligand 24



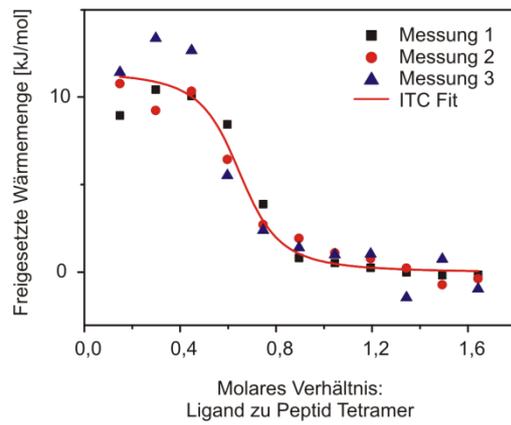
Weybridge mit Ligand 24



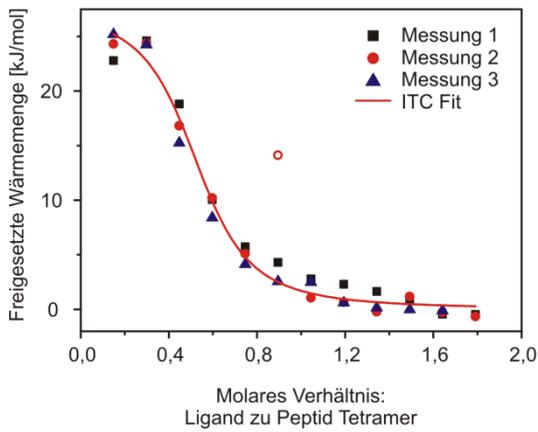
Udorn mit Ligand 8



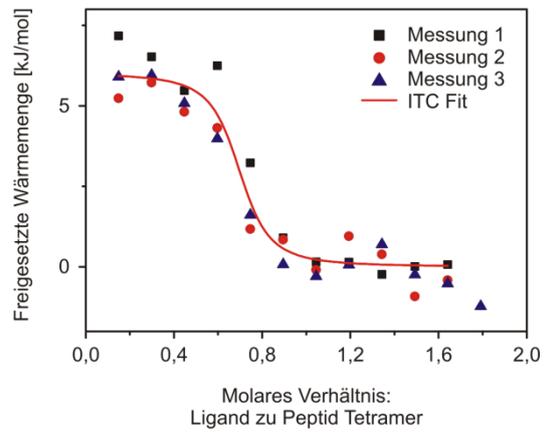
Weybridge mit Ligand 8



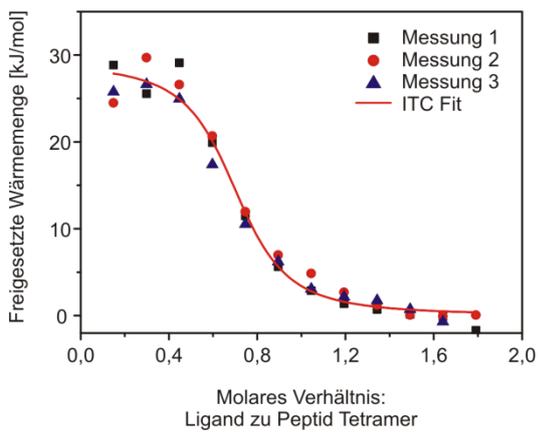
Udorn mit Ligand 9



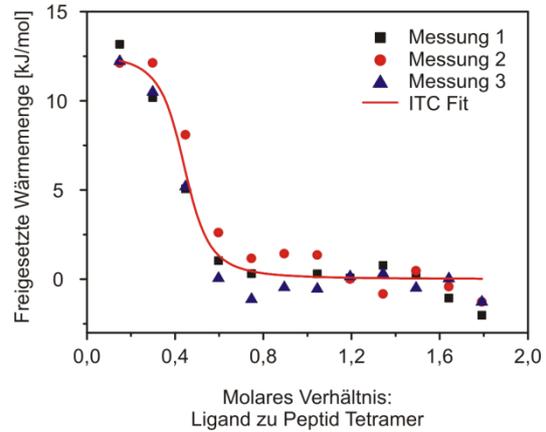
Weybridge mit Ligand 9

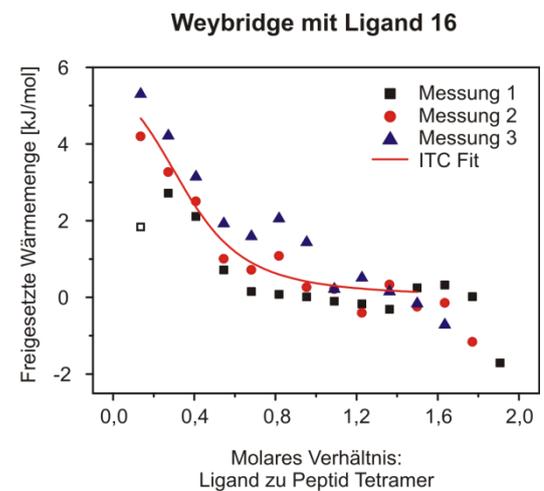
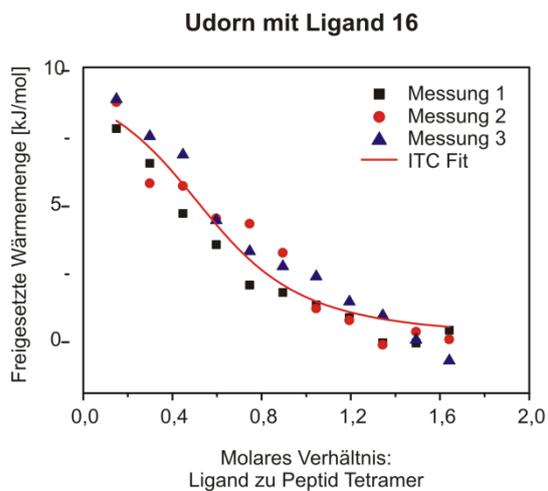
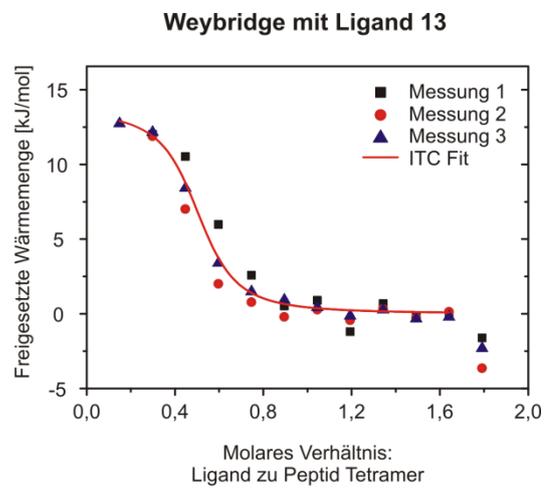
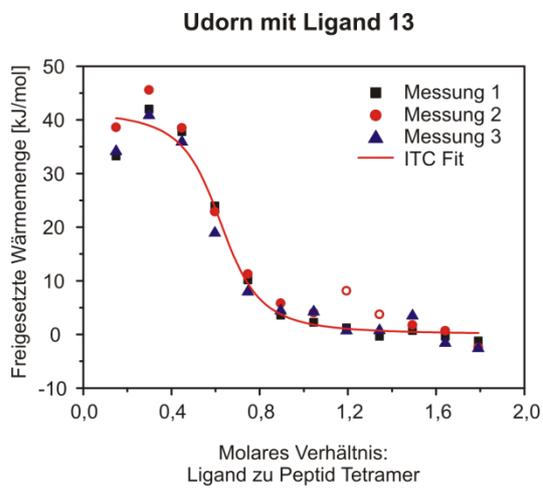
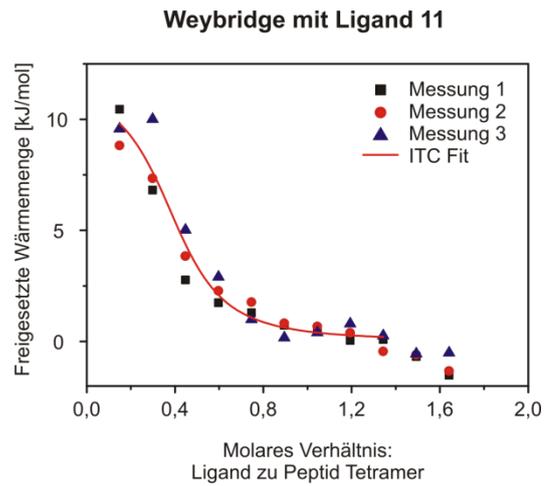
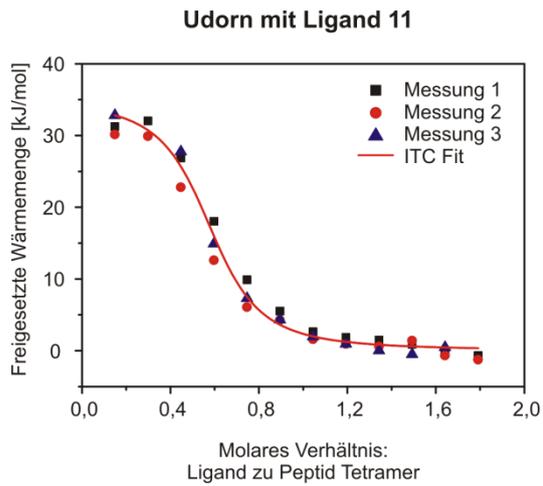


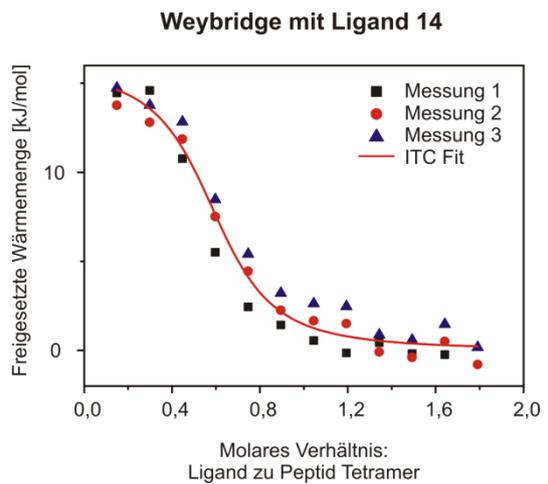
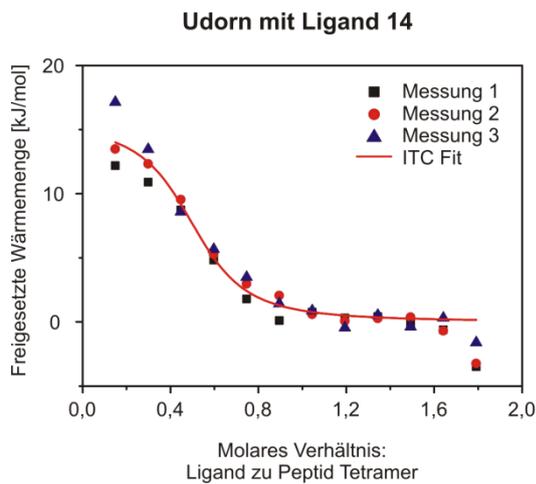
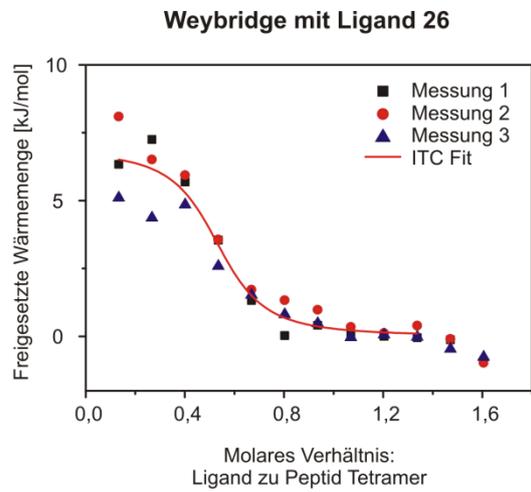
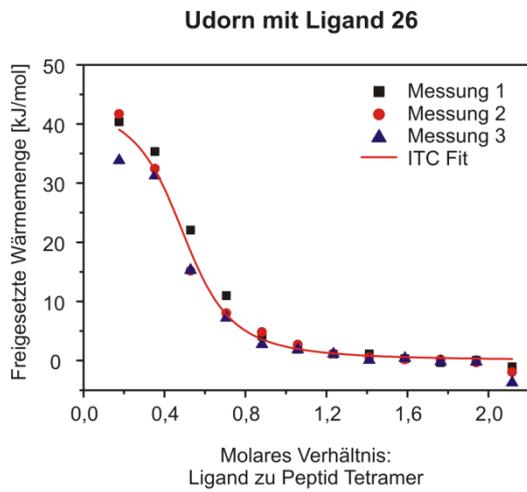
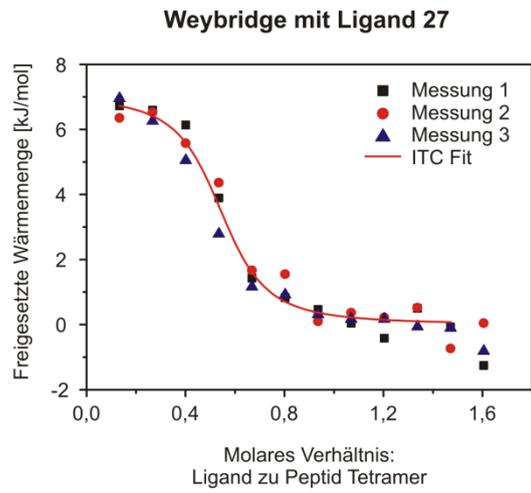
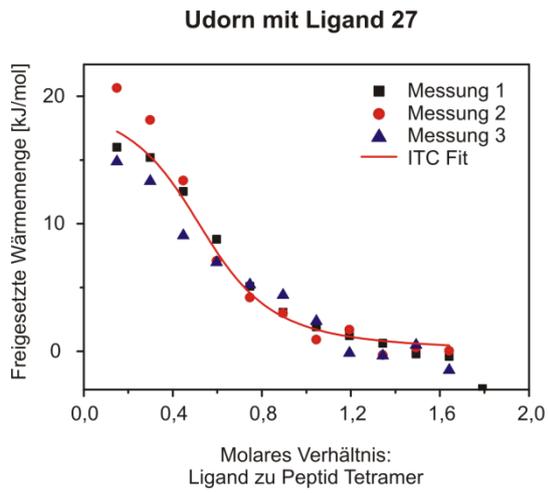
Udorn mit Ligand 10



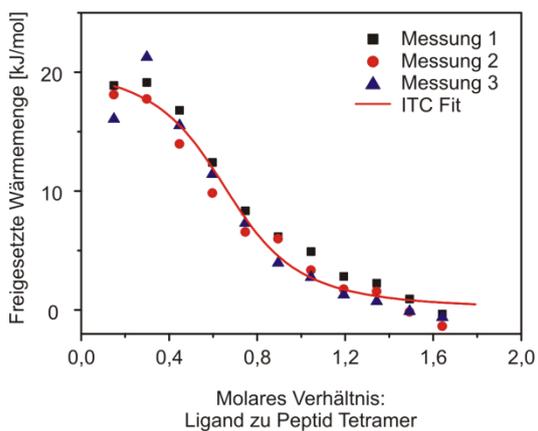
Weybridge mit Ligand 10



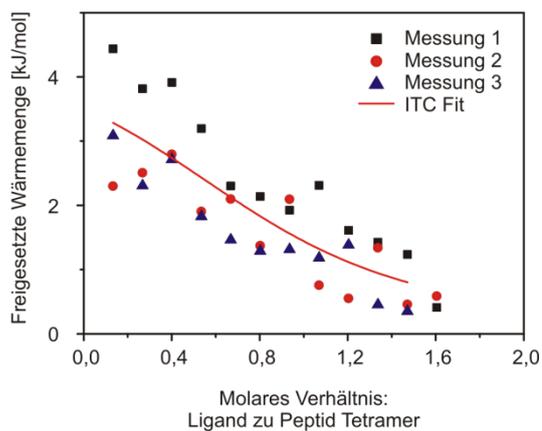




Udorn mit Ligand 18



Weybridge mit Ligand 18



Udorn mit Ligand 17

