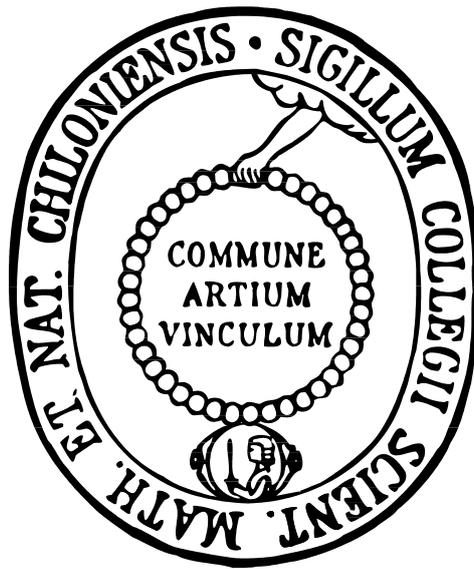


**Einzelmolekül-Kraftspektroskopie an
einem molekularen Azobenzol-Schalter und
Natriumcarboxymethylamylose**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Christian Glockner

Kiel 2011

Referent: Prof. Dr. Martin K. Beyer

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Lüning

Tag der mündlichen Prüfung: 14. September 2011

Zum Druck genehmigt: 14. September 2011

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

Vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von
Prof. Dr. Martin K. Beyer am Institut für Physikalische Chemie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
in der Zeit von März 2008 bis Juni 2011 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht (siehe Seite 116):

*”Simple Coupling Chemistry Linking Carboxyl-Containing Organic Molecules to Silicon
Oxide Surfaces under Acidic Conditions“*

S. W. Schmidt, T. Christ, C. Glockner, M. K. Beyer, H. Clausen-Schaumann
Langmuir **2010**, *26*, 15333–15338.

Posterpräsentationen:

Sonderforschungsbereich (SFB) 677 – „Funktion durch Schalten“

„Summer School“ Salzau 2008

108. Bunsentagung 2009, Köln

SFB 677 – „Funktion durch Schalten“ und SFB 658 – „Elementarprozesse in
molekularen Schaltern an Oberflächen“ „Summer School“ Salzau 2009

109. Bunsentagung 2010, Bielefeld

110. Bunsentagung 2011, Berlin

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Einzelmolekül-kraftspektroskopische Messungen am Natriumcarboxymethylamylose-(CMA-)/2-[2-(3-Trimethoxysilylpropylamino)ethylamino]-ethylamin-(DETA-)System sowie am 4,4'-Dicarboxyazobenzol-/PEG-Silan-System durchgeführt. Im experimentellen Aufbau bediente man sich hierbei des neu beschafften Rasterkraftmikroskopes (AFM) „MFP-3D Bio“ der Fa. Asylum Research. Beim Wegfahren des Cantilevers von der Probenoberfläche kann ein einzelnes angebundenes Molekül gestreckt und schließlich die schwächste chemische Bindung in der Molekülkette mechanisch gebrochen werden. Die detektierbaren Kräfte liegen hierbei im Nanonewton-Bereich. Durch Entfernen des Cantilevers mit konstanter Kraftladungsrate dF/dt im Force-Ramp-Modus ließen sich die kinetischen Parameter des Arrhenius-Kinetik-Modells ermitteln. Für eine Zuggeschwindigkeit von $2 \mu\text{m/s}^{-1}$ wurden k_0^{off} und Δx^\ddagger zu $k_0^{\text{off}} = 0.154 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x^\ddagger = 2.081 \cdot 10^{-11} \text{ m}$ bestimmt. Zur Vorbereitung auf das noch nicht beschriebene mechanische Schalten eines einzelnen Mechano-/Chromophors im Rahmen eines optomechanischen Zyklus' war die Messmethode des Force-Clamps an dem AFM zu etablieren. Die Messparameter während der Messung wurden optimiert, um die Detektion des Schaltens eines einzelnen Azobenzol-Moleküls erwarten zu lassen. Der molekulare Schalter 4,4'-Dicarboxyazobenzol wurde im Force-Clamp-Modus über langkettige PEG-Spacer zwischen Cantilever und Objektträger bei konstanter Kraft zwischen 500 pN und 1.70 nN über mehrere Millisekunden und Sekunden gehalten, bis es zum Bindungsbruch kam. Eine Auftragung der Lebensdauer t gegen die Anzahl der beim Bindungsriß intakten Bindungen $N(t)$ zeigte für Azobenzol/PEG-Silan als auch für CMA/DETA bei unterschiedlichen Temperaturen und Haltekräften biexponentielles Verhalten. Bei der während des Bindungsrißes auftretenden chemischen Reaktion handelt es sich wahrscheinlich um die Hydrolyse einer gespannten Bindung. Zur Auswertung der biexponentiellen Kurvenverläufe wurden die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 sowie die Gewichtungsfaktoren A_i bestimmt. Außerdem wurden Arrhenius-Auftragungen bei drei verschiedenen Haltekräften durchgeführt und die Aktivierungsenergien E_a sowie die Arrhenius-Vorfaktoren A bestimmt. Die Moleküllängenverteilungsanalyse ließ die Anbindung von einem und zwei PEG-Silanen erkennen. Beim CMA-/DETA-System wurde in den Experimenten eine Vorzugslänge von ca. 200 nm erhalten.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit der Vorläufer eines Einzelmolekül-Mechanophors Spiropyran synthetisiert.

Abstract

In this work, single-molecule force measurements have been conducted on the sodium carboxymethyl amylose (CMA)/2-[2-(3-trimethoxysilylpropylamino)ethylamino]ethylamine (DETA) system and on the 4,4'-dicarboxyazobenzene/PEG silane system. For the measurements, the new "MFP-3D Bio" atomic force microscope (AFM) by Asylum Research has been used. When the cantilever of the microscope is pulled away from the sample surface, a connected single polymer molecule can be stretched and finally, the weakest bond in the molecular chain breaks mechanically. The forces necessary to break a molecular bond are in the nanonewton regime. Moving away the cantilever with a constant force-loading rate dF/dt in force-ramp mode, the kinetic parameters of the Arrhenius kinetics model can be derived. For a pulling speed of $2 \mu\text{m/s}^{-1}$, k_0^{off} and Δx^\ddagger have been calculated as $k_0^{\text{off}} = 0.154 \text{ s}^{-1}$ and $\Delta x^\ddagger = 2.081 \cdot 10^{-11} \text{ m}$. To be able to switch a single mechanophor/chromophor in the context of an optomechanical cycle, the force-clamp measuring mode had to be established. The measuring parameters have been optimized with respect to the detection of the switching of a single azobenzene molecule. The molecular switch 4,4'-dicarboxyazobenzene has been covalently anchored between cantilever and sample surface in force-clamp mode via long PEG spacers and kept at constant forces of 500 pN up to 1.70 nN over some milliseconds and seconds until the weakest bond in the chain ruptured. A plot of the lifetime t versus the number of intact bonds at the time when the bond ruptures $N(t)$ showed for both systems, azobenzene/PEG silane and CMA/DETA, biexponential behaviour. The reaction occurring during bond rupture is probably hydrolysis. From the biexponential curves, the rate constants k_1 and k_2 as well as the weighting factors A_i have been derived. Besides, there have been done Arrhenius plots for three different clamping forces and the activation energies E_a and the Arrhenius prefactors A have been determined. The molecular length distribution showed the connection of one and two PEG silanes. For the CMA/DETA system, there could be found a predominant length of about 200 nm.

Besides, in this work there has been synthesized the precursor of the single-molecule mechanophor spiropyrene.

Danksagung

In erster Linie danke ich Prof. Dr. Martin Beyer für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die kontinuierliche Betreuung der Arbeit sowie für das in mich gesetzte Vertrauen.

Den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich sehr für Ihre Unterstützung, ohne welche die Anfertigung dieser Arbeit nur schwer möglich gewesen wäre.

Hierbei möchte ich mich sehr herzlich bei Robert Höckendorf für die Unterstützung und zahlreiche interessante Gespräche, häufig zu verschiedenen kulturellen Themen abseits der Chemie, bedanken.

Bei Doreen Schütze, meiner Nachfolgerin in der Kraftspektroskopie, bedanke ich mich sehr für zahlreiche fachliche und nicht-fachliche Gespräche und Diskussionen.

Bei Dr. Petru Balaj möchte ich mich ebenfalls für seine stetige Hilfsbereitschaft und Kollegialität bedanken.

Weiterhin danke ich Christian van der Linde und Sieglinde Kastaun für ihre fortwährende Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Hauke Clausen-Schaumann und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme während meiner Forschungsaufenthalte in München bedanken. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Sebastian Schmidt, für die zahlreichen interessanten und hilfreichen Diskussionen in Kiel und München zum Thema Mechanochemie und darüber hinaus. Unsere Treffen in Kiel und München haben mir immer viel Spaß gemacht. Außerdem bedanke ich mich bei Björn Hellenkamp und Timo Christ für die Einführung in den AFM-Bau.

Den Mitarbeitern des Instituts für Physikalische Chemie danke ich für zahlreiche Hilfestellungen, besonders dem Werkstattleiter Herrn Will. Weiterhin danke ich den spektroskopischen Abteilungen des Otto-Diels-Institutes sowie des Instituts für Anorganische Chemie für die Aufnahme der Spektren.

Dem SFB 677 „Funktion durch Schalten“ bin ich für die Finanzierung von Teilen dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Abkürzungsverzeichnis

AFM	<i>Atomic Force Microscope</i> (dt. Rasterkraftmikroskop)
BFP	<i>Biomembrane Force Probe</i> (dt. Biomembran als Kraftsensor)
CFM	<i>Chemical Force Microscopy</i> (dt. Chemische Kraftmikroskopie)
CMA	Natriumcarboxymethylamylose
COGEF	<i>Constrained Geometries Simulate External Force</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DETA	2-[2-(3-Trimethoxysilylpropylamino)ethylamino]ethylamin
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid
EFEI	<i>External Force Explicitly Included</i>
FFM	<i>Friction Force Microscopy</i> (dt. Reibungskraftmikroskopie)
InvolS	<i>Inverted Optical Lever Sensitivity</i>
IR	Infrarot
MFM	<i>Magnetic Force Microscopy</i> (dt. Magnetkraftmikroskopie)
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (dt. Kernmagnetische Resonanz)
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (dt. Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PEG	Polyethylenglycol
ppm	<i>Parts Per Million</i> (dt. Teile pro Million)
RGT-Regel	Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel
STM	<i>Scanning Tunneling Microscopy</i> (dt. Rastertunnelmikroskopie)
TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i>
UV	Ultraviolett
XPS	<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> (dt. Röntgen-Photoelektronenspektroskopie)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Mechanochemie	1
1.1.1	Makroskopische Phänomene.....	1
1.1.2	Einzelmolekül-Techniken.....	3
1.2	Das Rasterkraftmikroskop (AFM)	7
1.3	Molekulare Schalter	9
2	Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mit dem AFM.....	13
2.1	Einführung.....	13
2.2	Funktionalisierungsprotokolle.....	16
2.2.1	Reinigung vor der Silanisierung.....	16
2.2.2	Silanisierung.....	17
2.2.3	Das Funktionalisierungsprotokoll bei pH 7.4	20
2.2.4	Das Funktionalisierungsprotokoll bei pH 2.0	23
2.3	Force-Ramp-Spektroskopie.....	26
2.3.1	Prinzip	26
2.3.2	Theorie	29
2.3.3	Auswertung	35
2.4	Force-Clamp-Spektroskopie.....	37
2.4.1	Prinzip	37
2.4.2	Der mechanische Einzelmolekül-Schalter	43
2.4.3	Auswertung	48
2.4.3.1	4,4'-Dicarboxyazobenzol, PEG-Silan	49
	Messungen bei Zimmertemperatur.....	50
	Messungen bei 500 pN Haltekraft und Temperaturen von 35.0 °C, 40.0 °C, 45.0 °C, 50.0 °C	56
	Messungen bei 750 pN Haltekraft und Temperaturen von 30.0 °C, 35.0 °C, 40.0 °C, 45.0 °C, 50.0 °C.....	59
	Vergleich Wasser/PBS-Puffer-Lösung bei 750 pN Haltekraft und $T = 45.0$ °C.....	63
	Kontrollmessung ohne Zugabe von Azobenzol	68
	Messungen bei 1.00 nN Haltekraft und Temperaturen von 35.0 °C, 40.0 °C,	

45.0 °C, 50.0 °C	69
Übersicht aller Arrhenius-Parameter.....	75
Auftragung der ersten und zweiten Hälfte der Messpunkte.....	75
Moleküllängenverteilungen.....	79
2.4.3.2 Carboxymethylamylose, DETA.....	82
Messungen bei Zimmertemperatur.....	82
Messungen bei 1.00 nN Haltekraft und Temperaturen von 30.0 °C, 40.0 °C.....	86
Auftragung der ersten und zweiten Hälfte der Messpunkte.....	88
Moleküllängenverteilung	90
2.5 Messparameter	91
2.6 Kalibrierung des Cantilevers.....	94
2.7 Verwendete Software	98
3 Synthesen	99
4 Zusammenfassung und Ausblick	103
5 Experimentelle Vorbereitung der Messungen.....	108
5.1 Reinigung vor der Silanisierung.....	108
5.2 Silanisierung.....	108
5.3 Reaktionsprotokoll bei pH 7.4	108
5.4 Reaktionsprotokoll bei pH 2.0	109
6 Synthesevorschriften	110
Verwendete Chemikalien	110
In der organischen Analytik eingesetzte Spektrometer.....	111
6.1 4-Iodsalicylaldehyd (2)	112
6.2 4-Iod-5-nitrosalicylaldehyd (3)	112
6.3 Benzyltriethylammoniumdichloriodat (8) (Syntheseweg I).....	113
6.4 Einfach iodiertes Spiropyran ohne Nitrogruppe (6).....	113
6.5 Zweifach iodiertes Spiropyran (9).....	114
6.6 Versuch der Synthese des zweifach iodierten Spiropyrans (9) mit 4-Vinylben-	

	zoesäure (10)	115
7	<i>Einfache Kopplungschemie zur Anbindung von Carbonsäuren an Siliciumdioxid-Oberflächen unter sauren Bedingungen</i>	116
8	Literaturverzeichnis.....	123

1 Einleitung

1.1 Mechanochemie

1.1.1 Makroskopische Phänomene

Wenn in der Gegenwart von chemischen Reaktionen gesprochen wird, ist meist die Rede von Thermochemie, Photochemie oder Elektrochemie. Die vierte Möglichkeit zur Aktivierung chemischer Reaktionen, die Mechanochemie,^[1,2] findet dabei häufig keine Erwähnung. Dabei sind mechanochemische Reaktionen, das innige mechanische Verreiben fester Chemikalien mit Hilfe von Mörser und Pistill, bereits seit vielen Hundert Jahren bekannt. Heutzutage werden in der Festkörperchemie Kugelmühlen benutzt, und chemische Reaktionen verlaufen hierbei nicht nur mit anorganischen Feststoffen, sondern auch die organische Chemie macht Gebrauch davon.^[3,4] So lassen sich verschiedene chemische Reaktionen, wie z. B. die Aldolreaktion, ohne die Zugabe eines Lösungsmittels in hoher Ausbeute in Kugelmühlen durchführen.^[5] Der Begriff „Mechanochemie“ geht jedoch über die reine Festkörperchemie hinaus. Eine weitere Möglichkeit, mechanische Kräfte auf Moleküle auszuüben, ist die Sonochemie, die sich der im Ultraschallbad auftretenden Kräfte bedient.^[6,7] Die Kräfte entstehen dabei nach gängiger Theorie durch das Implodieren von Kavitationsblasen in der Flüssigkeit, welche auf benachbarte Polymerketten solvodynamische Scherkräfte ausüben.^[8] Werden Polymere wie Polypropylen diesen Kräften ausgesetzt, akkumuliert sich die Kraft in der zentralen Bindung, was schließlich zum homolytischen Bindungsbruch führt. Die dabei entstehenden Radikale wurden ESR-spektroskopisch nachgewiesen.^[9] Viel beachtet sind die Arbeiten von Moore^[10,11] auf dem Gebiet der Sonochemie. Dieser schaffte es, die mechanische Kraft auf die zentrale Bindung im Molekül zu übertragen und damit chemische Reaktionen durchzuführen, die nach den Woodward-Hoffmann-Regeln^[12] verboten sind (siehe Abb. 1).

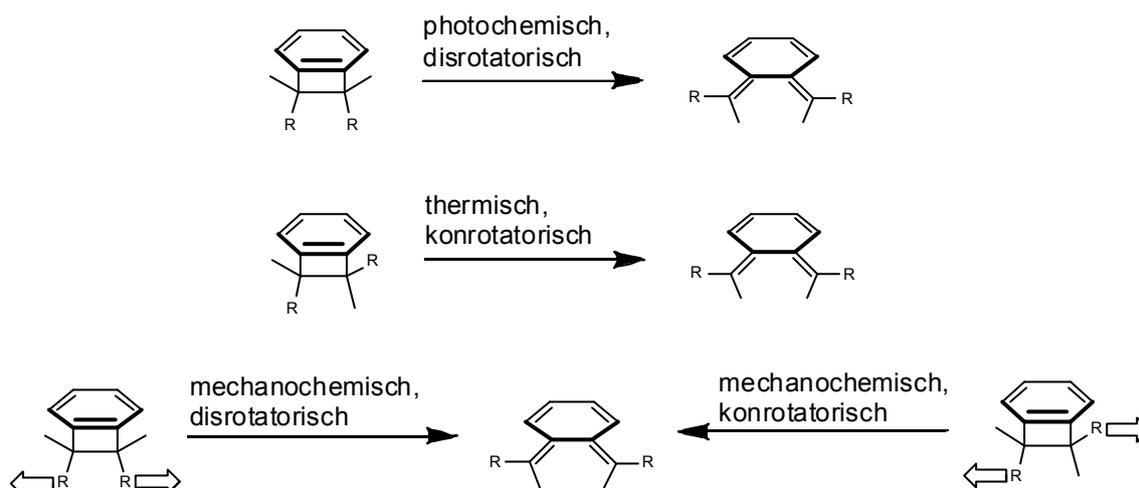


Abb. 1. Der Mechanophor Benzocyclobuten wurde mit langen Polyethylenglycol-(PEG-)Spacern (Reste R) funktionalisiert, welche die mechanischen Zugkräfte im Ultraschallbad (Pfeile) auf die zentrale Doppelbindung des Moleküls übertragen. Beide obere Darstellungen: Nach den Woodward-Hoffmann-Regeln kann die photochemische electrocyclische Ringöffnung zum *E,E*-Isomer nur durch disrotatorische, die thermische Ringöffnung nur durch konrotatorische Drehung erfolgen. Unten: Die Reaktion zum *E,E*-Isomer ist sowohl aus der *cis*- als auch aus der *trans*-Konfiguration des Benzocyclobutens mechanochemisch erlaubt.^[10,11]

Das Gebiet der selbstheilenden Materialien basiert ebenfalls auf mechanochemischen Prozessen, da die auftretenden Radikale beim mechanischen Bindungsriß z. B. eine Polymerisationsreaktion einleiten können, die zum Schließen des entstandenen Risses führt.^[2,13] Eine weitere Umgebung, in der mechanische Kräfte auf Moleküle übertragen werden, die schließlich zum Bindungsbruch führen, ist in Extrudern gegeben, wie sie in der Kunststoffproduktion^[14,15] oder der Lebensmitteltechnologie^[16,17] verwendet werden.

Da Kraft eine vektorielle Größe ist und sich auf Molekülensembles im Allgemeinen nur heterogen anwenden lässt, wurden verschiedene Verfahren entwickelt, welche die kraftspektroskopische Untersuchung am einzelnen Molekül ermöglichen. Die Spektroskopie mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) (siehe Abschn. 2) nimmt hierbei eine besondere Stellung ein.

1.1.2 Einzelmolekül-Techniken

Ein Problem bei der Untersuchung mechanochemischer makroskopischer Phänomene ist die zufällige Orientierung der Moleküle in Lösung oder in der Gasphase, wohingegen eine anliegende Kraft eine vektorielle Größe darstellt. Das Problem der heterogenen Anwendung der Kraft wird bei Einzelmolekül-Methoden umgangen, da hier nur jeweils ein einziges Molekül einer gerichteten Kraft ausgesetzt wird.

Zur kraftspektroskopischen Untersuchung einzelner Moleküle wurden verschiedene Methoden entwickelt, die jeweils einen bestimmten Kraftbereich mit unterschiedlicher Präzision abdecken. In Abb. 2 sind die Kraftbereiche dargestellt, welche in der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie von Interesse sind.

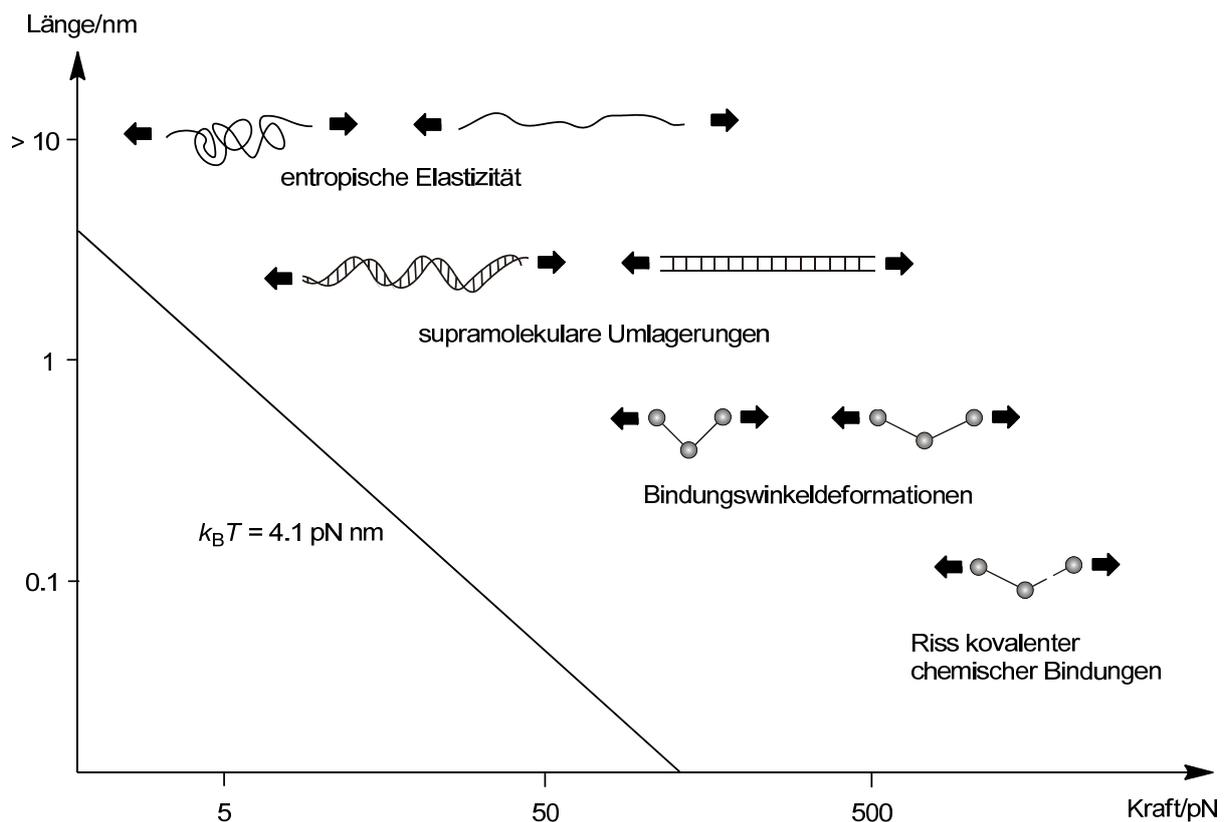


Abb. 2. Darstellung des mit der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie experimentell zugänglichen Kraftbereiches. Die untere Grenze wird bei Zimmertemperatur durch die thermische Energie $k_B T = 4.1 \text{ pN nm}$ gegeben, die obere Grenze wird mit wenigen Nanonewton durch die mechanische Stabilität der kovalenten chemischen Bindung definiert.^[18]

Bei Kraftmessungen mit der Optischen Pinzette,^[19,20] die erstmals 1970 von Ashkin beschrieben wurde, wird der Effekt ausgenutzt, dass ein gebündelter, fokussierter Laserstrahl eine Kraft auf ein mikroskopisches Objekt ausüben kann (siehe Abb. 3). Ein einzelnes Molekül kann hiermit isoliert und mechanisch bewegt werden, indem dieser Effekt in drei Dimensionen als optische Falle^[21,22] konzipiert wird. Für diese Entwicklung wurde, zusammen mit der Entdeckung der Laserkühlung,^[21,23] 1997 der Nobelpreis für Physik verliehen. Die Kraftauflösung bei diesem Verfahren geht bis in den Femtonewton-Bereich.^[24]

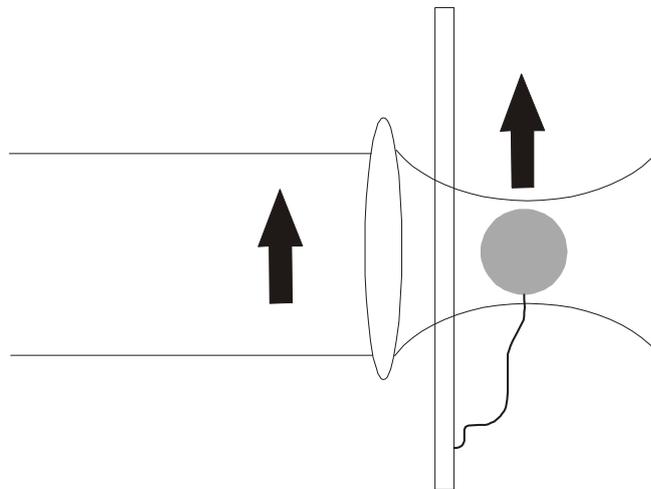


Abb. 3. Schematische Darstellung einer Optischen Pinzette. Durch Verschieben des Laserstrahls kann das untersuchende Molekül gestreckt werden.

Bei der Magnetischen Pinzette^[25-27] wird mit einem Elektromagneten eine Kraft auf ein paramagnetisches Teilchen, welches an ein einzelnes Molekül gebunden ist, ausgeübt. Durch Bewegung des Magneten oder Veränderung der magnetischen Feldstärke kann die Kraft auf das Molekül kontrolliert werden (siehe Abb. 4).

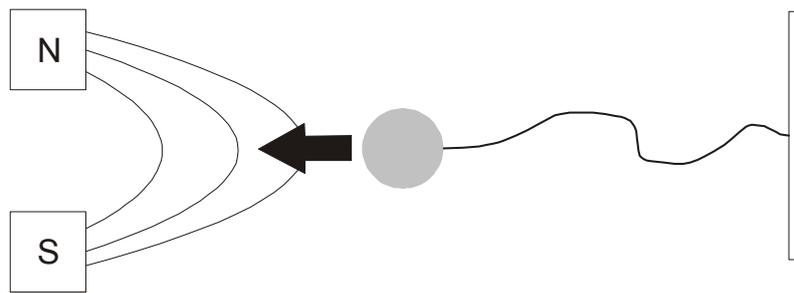


Abb. 4. Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Magnetischen Pinzette. Das interessierende Molekül wird zwischen Oberfläche und einer paramagnetischen Sonde verankert, welche von dem Magnetfeld der Magnetischen Pinzette angezogen wird. Eine Besonderheit der Magnetischen Pinzette ist, dass das angebundene Molekül recht einfach gedreht werden kann, indem der Magnet in Rotation versetzt wird.

Bei Kraftmessungen mit Mikro-Glasnadeln^[28,29] wird das Molekül zwischen zwei feine Glasnadeln gespannt und aus der Verbiegung der Nadeln wird die Kraft berechnet, die auf das einzelne Molekül wirkt (siehe Abb. 5).

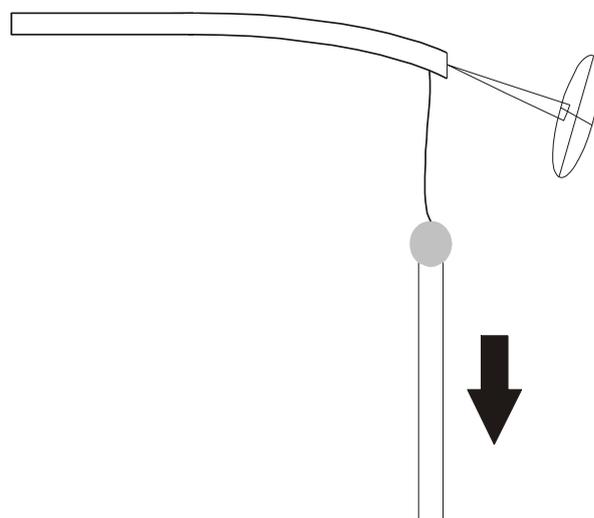


Abb. 5. Schematische Darstellung einer Messung mit Mikro-Glasnadeln. Ein Molekül wird kovalent zwischen zwei Glasnadeln, bzw. wie in der Darstellung zwischen einer Glasnadel und einer feinen Pipette, verankert. Durch Entfernen der Pipette wird eine Kraft auf das Molekül und die Glasnadel ausgeübt. Die Verbiegung kann z. B. durch das Verschieben eines eingekoppelten Lichtstrahls auf einer segmentierten Photodiode (siehe AFM, Abschn. 2) gemessen und in eine Kraft umgerechnet werden.

Bei der Verwendung einer Biomembran als Kraftsensor^[30] wird eine Zelle, die als Kraftsensor fungiert, durch Unterdruck an der Spitze einer feinen Kapillare gehalten, und die auf die Membran wirkende Kraft wird aus der Verbiegung der Zelloberfläche ermittelt (siehe Abb. 6).

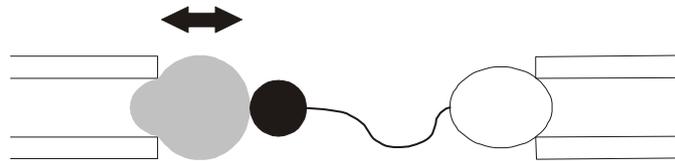


Abb. 6. Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Biomembran als Kraftsensor (BFP). Eine Biomembran (z. B. ein rotes Blutkörperchen, grau dargestellt) wird durch Unterdruck an einer Pipettenspitze fixiert. An der Oberfläche befindet sich die Bindestelle für ein Molekül (schwarz). Über die Beobachtung der Deformation der Zelle kann die auf das angebundene Molekül wirkende Kraft bestimmt werden.

Bei den hydrodynamischen Techniken wird die Kraft auf das Molekül durch hydrodynamischen Fluss oder Änderung der Oberflächenspannung übertragen.^[31]

In Tab. 1 sind Kraft- und Dynamikbereich aller Methoden zusammengefasst. Die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM), welche in dieser Arbeit angewendet wurde, nimmt eine besondere Stellung ein, denn mit dieser Methode ist es, neben der Kraftmessung mit Mikro-Glasnadeln, möglich, die zum Riss einer kovalenten chemischen Bindung notwendige Kraft von wenigen Nanonewton aufzubringen bei gleichzeitig ausreichend hoher Kraft- und Ortsauflösung.^[32] Die Kraftspektroskopie mit dem AFM wird in Abschn. 2 detaillierter besprochen.

Tab. 1. Kraft- und Dynamikbereich verschiedener Techniken in der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie.^[1]

Technik	Kraftbereich/pN	Dynamikbereich
Optische Pinzette	0.01–200	≥ 1 ms
Magnetische Pinzette	0.01–100	≥ 1 s
Mikro-Glasnadeln	> 0.1	≥ 100 ms
Biomembran als Kraftsensor (BFP)	0.5–1000	≥ 1 ms
Hydrodynamische Techniken	> 0.1	
Rasterkraftmikroskopie (AFM)	> 3	≥ 10 μ s

1.2 Das Rasterkraftmikroskop (AFM)

Seit der Vorstellung des Rasterkraftmikroskops („Atomic Force Microscope“, AFM) durch Binnig, Quate und Gerber^[33] im Jahre 1986 wurde diese Methode zunächst zur Bilderzeugung auf festen Oberflächen eingesetzt. Zu dem Zeitpunkt war die Abbildung von Oberflächen auf leitende Materialien beschränkt, die mit dem Rastertunnelmikroskop („Scanning Tunneling Microscope“, STM) darstellbar waren. Mit dem AFM wurde die Möglichkeit geschaffen, nun auch nicht-leitende, z. B. biologische Proben wie Zellen, mit hoher Auflösung unter atmosphärischen Bedingungen abzubilden. Abb. 7 zeigt den schematischen Aufbau eines AFMs.

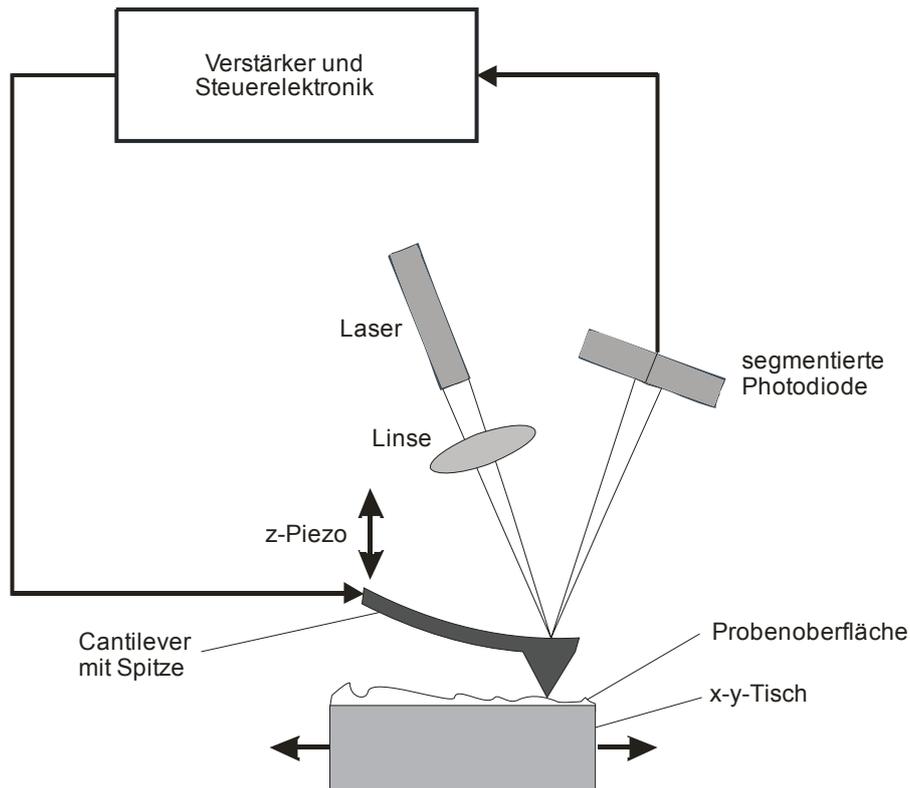


Abb. 7. Funktionsprinzip eines AFMs. Ein Auslegearm (Cantilever) mit einer feinen Spitze wird in einem Raster über die Probenoberfläche geführt. Die Probe ist auf einen x-y-Tisch montiert, der durch Piezostellelemente in x- und y-Richtung bewegt werden kann. Der Cantilever ist an einem z-Piezoelement befestigt. Durch die unterschiedliche Beschaffenheit der Probe wird der Cantilever beim Rastern der Probenoberfläche unterschiedlich stark durchgebogen. Die Biegung des Cantilevers wird durch einen auf der Cantileverrückseite reflektierten Lichtstrahl, der auf eine segmentierte Photodiode fällt, detektiert.

Der Cantilever wird zur Bilderzeugung in unterschiedlichen Modi eingesetzt. Im Kontaktmodus steht der Cantilever in permanentem Kontakt mit der Oberfläche. Hierbei unterscheidet man zwischen dem Modus mit konstanter Höhe des Cantilevers (*constant height mode*) und dem Abbildungsmodus mit konstanter Kraft auf den Cantilever (*constant force mode*). Der *constant height mode* hat geringere Anforderungen an die Regelungstechnik und eignet sich besonders zum schnellen Abbilden relativ glatter Oberflächen mit wenigen Erhebungen. Beim *constant force mode* ist durch die permanente Nachregelung der Cantileverhöhe eine geringere Abbildungsgeschwindigkeit zu erreichen. Ein Nachteil beider Abbildungsmodi ist die stärkere mechanische Beanspruchung der Probe durch den ständigen physikalischen Kontakt mit dem Cantilever.

Im Nicht-Kontakt-Modus (*non contact mode*, auch: *tapping mode*) wird der Cantilever in regelmäßige Oszillationen versetzt und über die Oberfläche geführt. Der Abstand von der Ober-

fläche beträgt meist 5–40 nm, die Cantileverspitze befindet sich dabei im Bereich von Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit der Probenoberfläche.^[34] Die Probe wird hierbei weniger stark mechanisch belastet. Im *non contact mode* wird die höchste Auflösung erreicht, oft wird diese Methode im Vakuum verwendet, so dass bis zu atomare Auflösung erreicht werden kann.

Weitere, speziellere Messmodi^[34] sind die Chemische Kraftmikroskopie^[35-38] (*chemical force microscopy*, CFM), bei welcher die Cantileveroberfläche einheitlich mit (organischen) Molekülen, meist Thiolen oder Silanen, funktionalisiert wird. Die Wechselwirkungen der funktionalisierten Cantileverspitze mit der Probe lassen Rückschlüsse auf die chemische Beschaffenheit der Oberfläche, z. B. von Zellen, zu.

Bei der Magnetkraftmikroskopie (*magnetic force microscopy*, MFM) werden ferromagnetische Cantilever benutzt, die über eine magnetische Oberfläche geführt werden und Informationen über die lokale Magnetfeldstärke der Probe liefern.

Eine weitere Methode ist die Reibungskraftmessung (*friction force microscopy*, FFM), bei der die seitliche Verkipfung des Cantilevers beim Fahren über die Probe gemessen wird.

Weiterhin kann das AFM in einem Modus ähnlich dem eines STMs betrieben werden, indem zwischen der Probe und dem elektrisch leitenden Cantilever eine Spannung angelegt und der entstehende Stromfluss gemessen wird.

1.3 Molekulare Schalter

Das Design neuer molekularer Schalter im Informationszeitalter wird nicht zuletzt durch die Suche nach neuen Möglichkeiten der Datenspeicherung beflügelt. Um als molekularer Schalter zu dienen, werden verschiedene Anforderungen an ein Molekül gestellt. Es muss mindestens zwei stabile oder metastabile Zustände aufweisen. Das Molekül muss viele Male ermüdungsfrei zwischen beiden Zuständen schaltbar sein, ohne seine Schalteigenschaften zu verlieren. Das Schalten muss möglichst einfach detektierbar sein, ohne das Molekül zu zerstören. Eine kurze Ansprechzeit und eine hohe Quantenausbeute beim Schalten sind weitere wünschenswerte Eigenschaften.

Das Schalten zwischen den Zuständen erfolgt durch einen externen Stimulus. Hierbei kann es sich z. B. um Licht, elektrischen Strom, pH-Wert-Änderung oder Zuführung von Wärme handeln. Das Schalten zwischen den unterschiedlichen Zuständen ist mit einer Konformations-

änderung des Schaltermoleküls verbunden, und eine messbare physikalische Größe muss sich bei diesem Prozess ändern. Photochrome Verbindungen gehen durch Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge in einen stabilen Zustand über, der ein von der Ursprungsform abweichendes Absorptionsspektrum aufweist. Durch dieses Phänomen der Photochromie kann der vorliegende Schaltzustand ausgelesen werden.

Ein in dieser Arbeit synthetisierter molekularer Schalter ist das Spiropyran,^[39,40] das zwischen Spiro- und Merocyanin-Form thermisch bzw. photochemisch geschaltet werden kann (siehe Abb. 8). Die Merocyanin-Form ist planar und weist eine zwitterionische Struktur auf, welche erwartungsgemäß besonders in polaren Lösungsmitteln stabilisiert wird. Die geöffnete Molekülform weist aufgrund ihres ausgedehnten chromophoren Systems eine intensive Farbe auf, wohingegen die Spiroform meist nur schwach gefärbt ist.

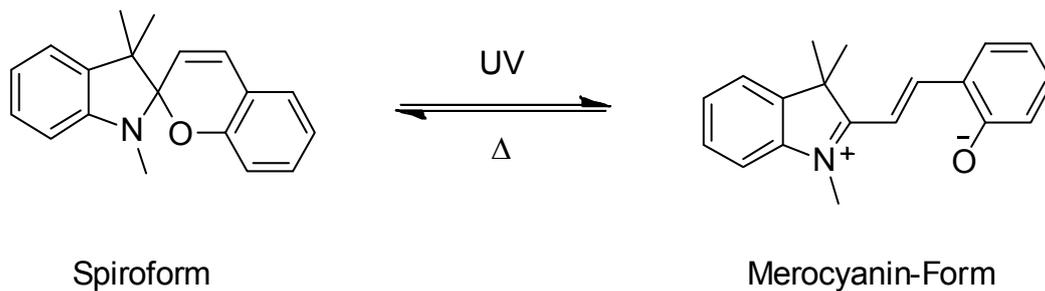


Abb. 8. Reversibles Schalten eines Spiropyran-Moleküls zwischen Spiro- und Merocyanin-Form durch photochemische/thermische Reaktion.

Das Azobenzol ist ein molekularer Schalter, der durch Lichteinstrahlung geeigneter Wellenlänge zwischen *cis*- und *trans*-Konformation geschaltet werden kann (siehe Abb. 9). Das *cis*-Isomer ist thermisch stabil genug, um chromatographisch vom *trans*-Isomer abgetrennt werden zu können.^[41]

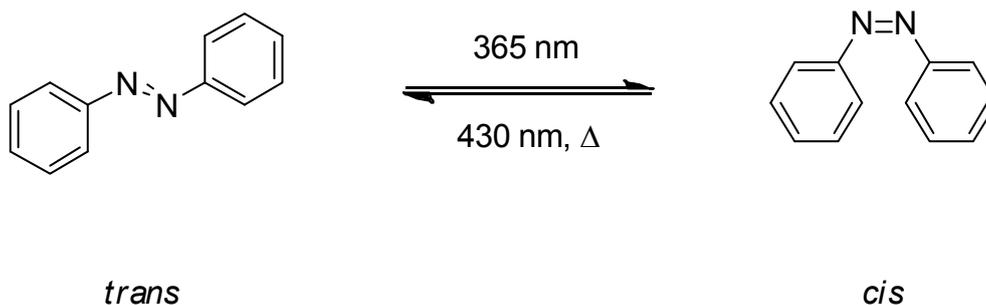


Abb. 9. Reversibles Schalten eines Azobenzol-Moleküls zwischen *trans*- und *cis*-Form.

Fulgide^[42] (ebenso die verwandte Stoffklasse der Fulgimide) führen beim Bestrahlen mit UV-Licht eine electrocyclische Ringschlussreaktion durch und können beim Bestrahlen mit sichtbarem Licht in ihre Ausgangsform zurückgeschaltet werden. Auch diese Stoffklasse eignet sich zur Verwendung als molekularer Schalter. Die Rückreaktion ist bei den Fulgiden nur photochemisch und nicht thermisch möglich.

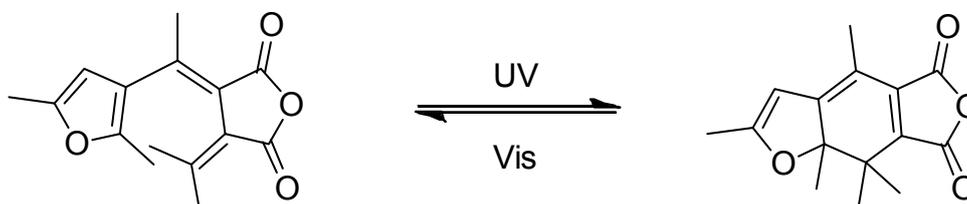


Abb. 10. Photoreversibles Schalten eines Fulgids durch electrocyclische Ringschluss- bzw. -öffnungsreaktion.

Neben oben genannten Vertretern molekularer Schalter gibt es noch eine Vielzahl weiterer Moleküle, die als Schalter dienen können,^[43] wie Diarylethene^[44] u. a.

Abseits der Photochromie existiert auch die Möglichkeit, Moleküle durch Anlegen einer Kraft zwischen zwei Zuständen unter Änderung ihres Absorptionsspektrums zu schalten. Dieses Phänomen wird Mechanochromie, das betreffende Molekül Mechanophor genannt (siehe Abb. 11).^[1] In dieser Arbeit wurden Vorarbeiten sowohl für ein Azobenzol- als auch ein Spiropyran als Einzelmolekül-Mechanophor geleistet, die mechano- bzw. photochemisch/thermisch geschaltet werden sollen (siehe Abschn. 2.4.2). Die Anwendung eines mechanochromen Spiropyrans im Rahmen eines Molekülensembles als „Mechanoindikator“ in

einer Polymermatrix wurde von Moore^[45] beschrieben. Durch mechanisches, makroskopisches Ziehen an dem Polymer werden die Spiropyran-Moleküle in den Polymersträngen in die Merocyanin-Form überführt, und das Material verfärbt sich von gelb nach rot. Eine weitergehende Anwendung dieses Effektes zur Sichtbarmachung von Materialermüdungserscheinungen ist denkbar.

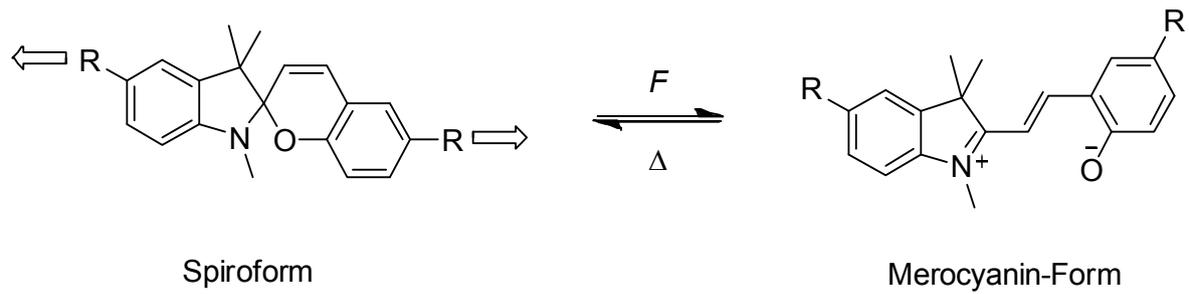


Abb. 11. Spiropyran als Mechanophor. Durch Anlegen einer Kraft (Pfeile) an die Reste R findet eine mechanische Ringöffnung zur Merocyanin-Form statt.

2 Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mit dem AFM

2.1 Einführung

Das AFM eignet sich wegen seiner Möglichkeit, Kräfte im Nanonewton-Bereich bei gleichzeitig hoher Kraft- und Ortsauflösung auf Moleküle ausüben zu können, als ideales Instrument für kraftspektroskopische Untersuchungen. Seit dem Aufkommen der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie mit dem AFM in den 1990er Jahren wurde diese Art der Spektroskopie zunächst zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor^[46], auf die Entfaltung von Proteinen^[47] oder die Untersuchung der Elastizität von Polymeren wie z. B. Polysacchariden^[48] angewendet. Die ersten kraftspektroskopischen Experimente mit dem AFM, in denen der Bindungsbruch einzelner kovalenter chemischer Bindungen gelang, wurden 1999 von Grandbois et al.^[49] beschrieben. Abb. 12 zeigt das Prinzip einer Einzelmolekül-kraftspektroskopischen Messung.

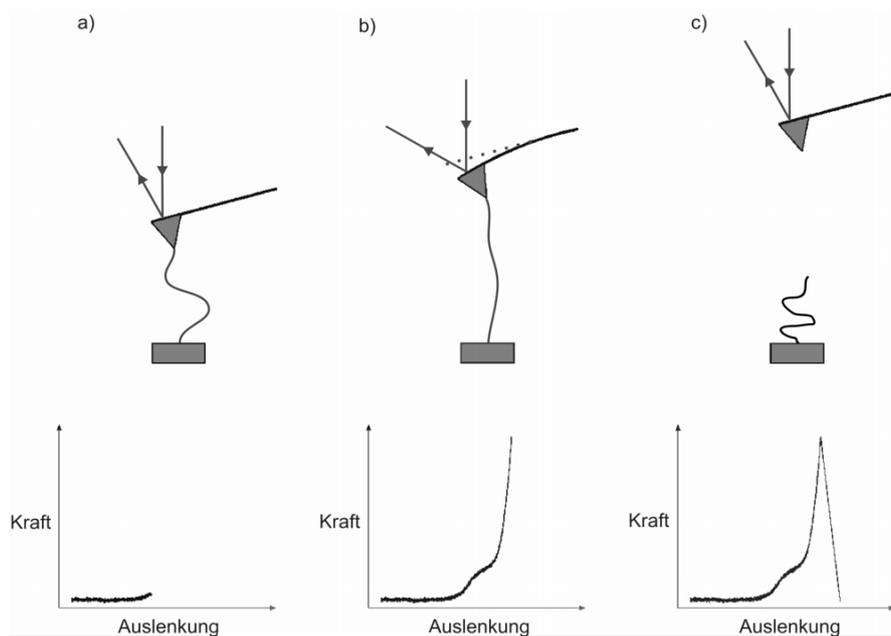


Abb. 12. Schematische Darstellung eines Einzelmolekül-kraftspektroskopischen Experimentes mit einem AFM mit zugehöriger Kraft-Auslenkungs-Kurve („Force-Ramp“-Modus).^[1] a) Das an Cantilever und Oberfläche angebundene Polymer wird gestreckt. b) Durch die auf das Molekül wirkende Kraft wird der Cantilever verbogen. Die Verbiegung wird durch einen auf der Cantilerverrückseite reflektierten Laserstrahl gemessen. Da die Federkonstante des Cantilevers bekannt ist, lässt sich durch den Grad der Verbiegung die auf das Molekül wirkende Kraft berechnen. c) Wird die Stärke der schwächsten chemischen Bindung im Molekül überschritten, reißt das Molekül und der Cantilever geht in seine Ausgangsposition zurück.

Zur Durchführung einer Messung werden zunächst Moleküle wie z. B. Silane oder Thiole auf den Siliciumdioxid- oder Goldoberflächen von Cantilever und Substrat verankert. Diese Moleküle tragen funktionelle Gruppen, z. B. Aminofunktionen, über die im nächsten Schritt eine Reaktion mit dem überbrückenden Molekül, im Idealfall einem langkettigen Polymer wie z. B. Carboxymethylamylose, hergestellt werden kann. Die Verwendung langkettiger Spacer ist notwendig, um aus dem Bereich der Wechselwirkungskräfte (elektrostatische Kräfte, Van-der-Waals-Kräfte) zwischen Oberfläche und Cantilever zu kommen. Die Verankerung zwischen Cantilever und Substrat wird in zwei Schritten durchgeführt (Beispiel Messung mit Carboxymethylamylose).^[50] Zuerst wird die Carboxymethylamylose auf der Substratoberfläche verankert, indem die Carboxygruppen mit einem Carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) (siehe Abschn. 2.2.3) aktiviert und mit den Aminogruppen der Glasoberfläche zur Reaktion gebracht werden. Die nicht mit der Oberfläche verbundenen Carboxygruppen liegen dann als reaktive NHS-Ester vor. Der so funktionalisierte Glas-Objektträger wird zum AFM gebracht, und in wässriger (PBS-)Lösung wird der aminofunktionalisierte Cantilever im zweiten Schritt wiederholt in physikalischen Kontakt mit der reaktiven Oberfläche gebracht. In etwa 1–5 % der Fälle wird bei einer solchen Annäherung eine Amidbindung zwischen dem über mehrere Stunden reaktiven NHS-Ester der Oberfläche und einer Aminogruppe am Cantilever ausgebildet. In Abb. 13 ist das Anbindungsprotokoll zusammengefasst.

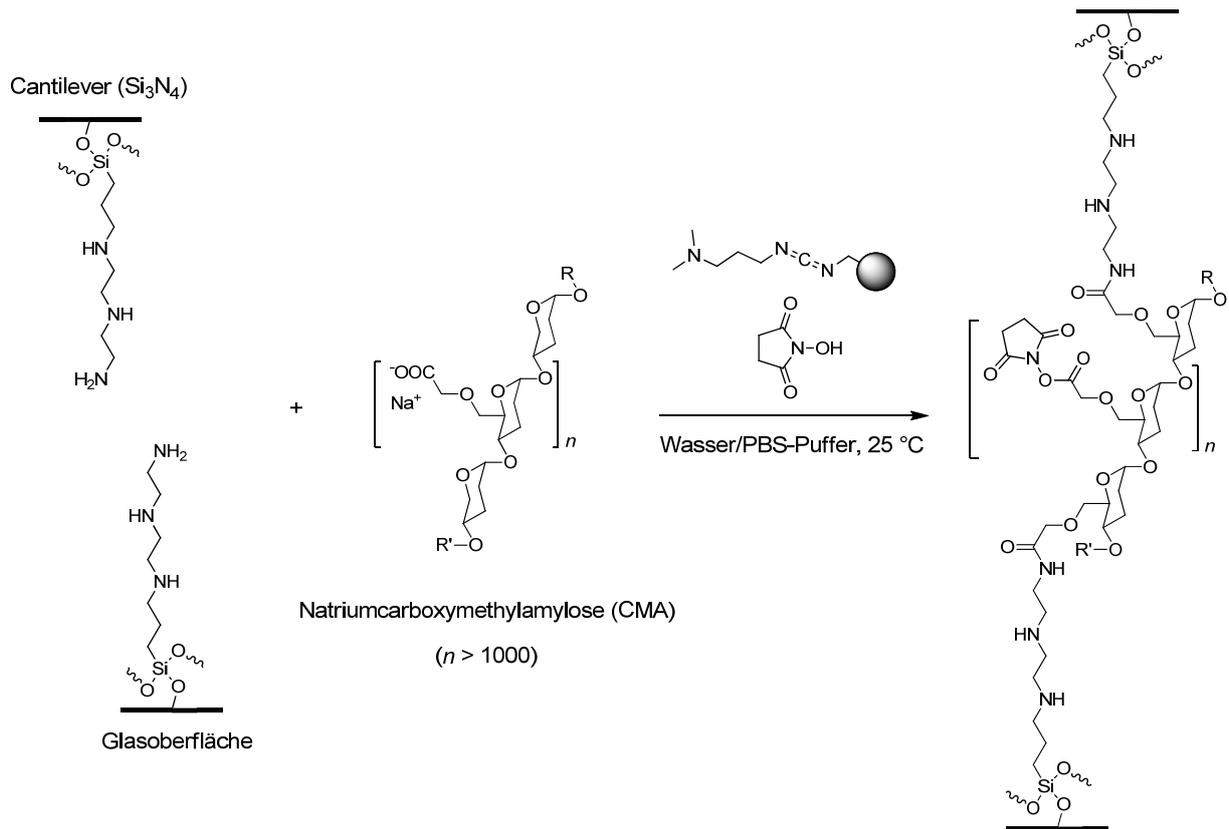


Abb. 13. Gesamte Reaktionsgleichung des Zwei-Schritt-Anbindungsprotokolls einer erfolgreichen Anbindung in einem Einzelmolekül-kraftspektroskopischen Experiment mit dem AFM. Die Ankopplung von Carboxymethylamylose an die Aminogruppen wird mit einem Carbodiimid (EDC) und dem Hilfsreagenz *N*-Hydrosuccinimid (NHS) in PBS-Puffer oder Wasser durchgeführt (siehe Abschn. 2.2.3).

2.2 Funktionalisierungsprotokolle

2.2.1 Reinigung vor der Silanisierung

Die Cantilever werden 1.5 h unter einer intensitätsstarken UV-Lampe unter atmosphärischen Bedingungen (Ozoneinwirkung) gereinigt.^[51]

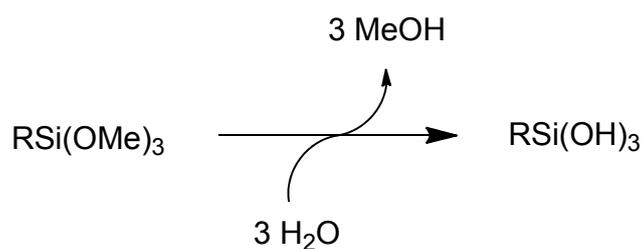
Die Glas-Objektträger werden 1 h mit verdünnter Salzsäure behandelt und anschließend 30 min mit verdünnter Salzsäure im Ultraschallbad gereinigt. Abschließend werden die Objektträger 3 x 10 min mit destilliertem Wasser im Ultraschallbad behandelt und mit destilliertem Wasser abgespült.

Ligler et al.^[52] untersuchten verschiedene Reinigungsmethoden für Glas-Objektträger in Vorbereitung für die Silanisierung mit einem Triethoxysilan, indem sie die Kontaktwinkel von Wasser nach erfolgter Silanisierung verglichen. Hierbei zeigte sich, dass, neben der Behandlung mit Piranha-Lösung, eine Behandlung der Glasoberfläche mit einer 1:1-Mischung von Methanol und konzentrierter Salzsäure sowie anschließendes Waschen mit konzentrierter Schwefelsäure zu einer größtmöglichen Belegung der Oberfläche mit Silan führte. Im Vergleich zu o. g. Reinigungsprotokoll konnte jedoch mit diesem literaturbeschriebenen Reinigungssystem in vorliegender Arbeit keine signifikant höhere Anbindungsrate in der Einzelmolekül-Kraftspektroskopie gefunden werden. Schmidt et al.^[53] verglichen die Anbindungsraten von Carboxymethylamylose mit zuvor im Sauerstoffplasma oder mit Piranha-Lösung gereinigten Objektträgern und konnten ebenfalls keine signifikante Verbesserung der Anbindungsraten in Vergleich zu in dieser Arbeit verwendetem Reinigungsprotokoll feststellen. Nicht zuletzt aufgrund der einfachen Handhabbarkeit und der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit Schmidt et al. wurde daher in dieser Arbeit die etablierte Reinigungsprozedur unverändert beibehalten.

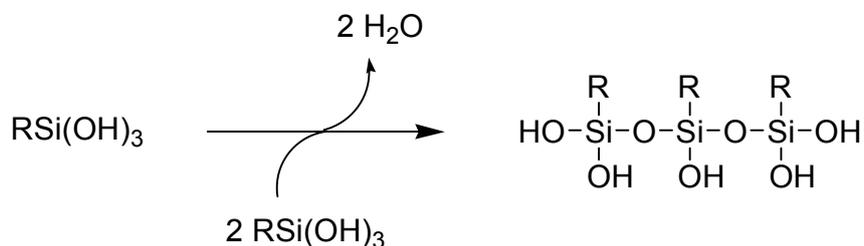
2.2.2 Silanisierung

Die Analytik silanisierter Oberflächen gestaltet sich schwierig, und die Prozesse, die bei der Reaktion organischer Silane mit Silicium oder Siliciumdioxid stattfinden, sind noch nicht vollständig geklärt. Untersuchungen von silanisierter Oberflächen wurden im Wesentlichen mit Kontaktwinkelmessungen, Ellipsometrie und XPS durchgeführt.^[54,55] Eine große Rolle bei der Silanisierung spielt die Anwesenheit von Wasser.^[56] Alle in dieser Arbeit verwendeten Silane wurden aus wasserhaltiger ethanolischer Lösung auf die Oberflächen aufgebracht.

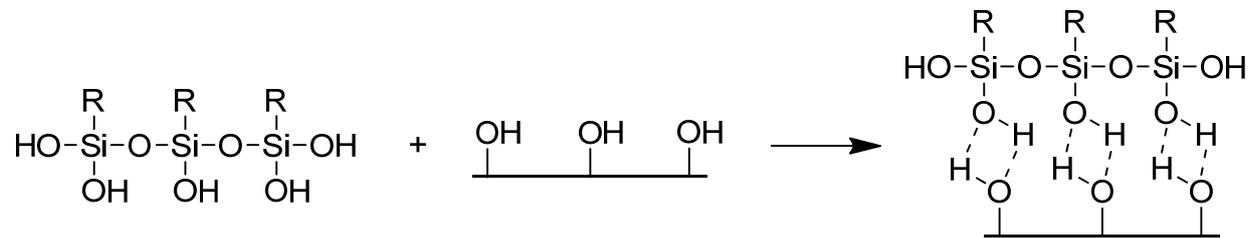
Es werden zwei Modelle bei der Silanisierung aus wässriger Lösung diskutiert. Das Modell von Arkles^[57] geht davon aus, dass die Kondensation zum Siloxan bereits in Lösung stattfindet, im ersten Reaktionsschritt hydrolysiert hierbei das Trialkoxysilan unter Alkoholabspaltung zum Silantriol:



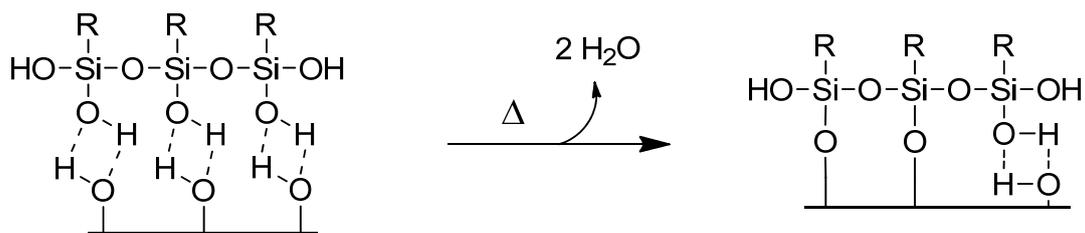
Im zweiten Reaktionsschritt kondensieren mehrere Moleküle Silantriol unter Wasserabspaltung zu einem Siloxan (hier Trisiloxan):



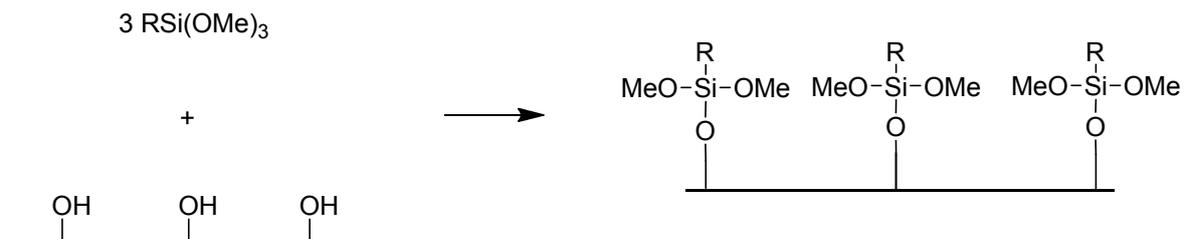
Im dritten Schritt wird das Siloxan über Wasserstoffbrücken an die Oberfläche koordiniert:



Im vierten Reaktionsschritt werden unter Wärmeeinwirkung die kovalenten Bindungen mit der Oberfläche geknüpft. Einige Silanolgruppen gehen dabei keine kovalente Bindung mit der Oberfläche ein, sondern liegen unverändert vor. Je nach Reaktionsdauer und Wassergehalt der Lösung können ggf. noch nicht-hydrolysierte Alkoxygruppen vorliegen (nicht dargestellt).



Eine alternative Route zur Silanisierung wurde von Krasnoslobodtsev et al.^[56] vorgeschlagen. Hierbei wird die Silanisierung in einem Zwei-Stufen-Prozess vorgenommen. Im ersten Schritt wird das Silan aus wasserfreier Lösung auf die Siliciumdioxid-Oberfläche aufgebracht. Hierbei reagiert nur eine Alkoxygruppe pro Silan mit einer Hydroxygruppe der Oberfläche.



Über die auf der Oberfläche vorliegenden freien Hydroxygruppen können bei pH 2.0 weitere Reaktionen stattfinden (siehe Abschn. 2.2.4).

2.2.3 Das Funktionalisierungsprotokoll bei pH 7.4

Um eine Amidbindung herzustellen, muss einer der Reaktionspartner zunächst aktiviert werden. Dies verläuft häufig über die Kupplung der Carbonsäure mit einem Carbodiimid.^[58] In organischen Lösungsmitteln wird meist Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) verwendet, in wässrigem Medium wird aufgrund seiner besseren Löslichkeit 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid (EDC)^[59-62] eingesetzt. Abb. 15 zeigt die Beteiligung von EDC bei der Knüpfung einer Amidbindung.

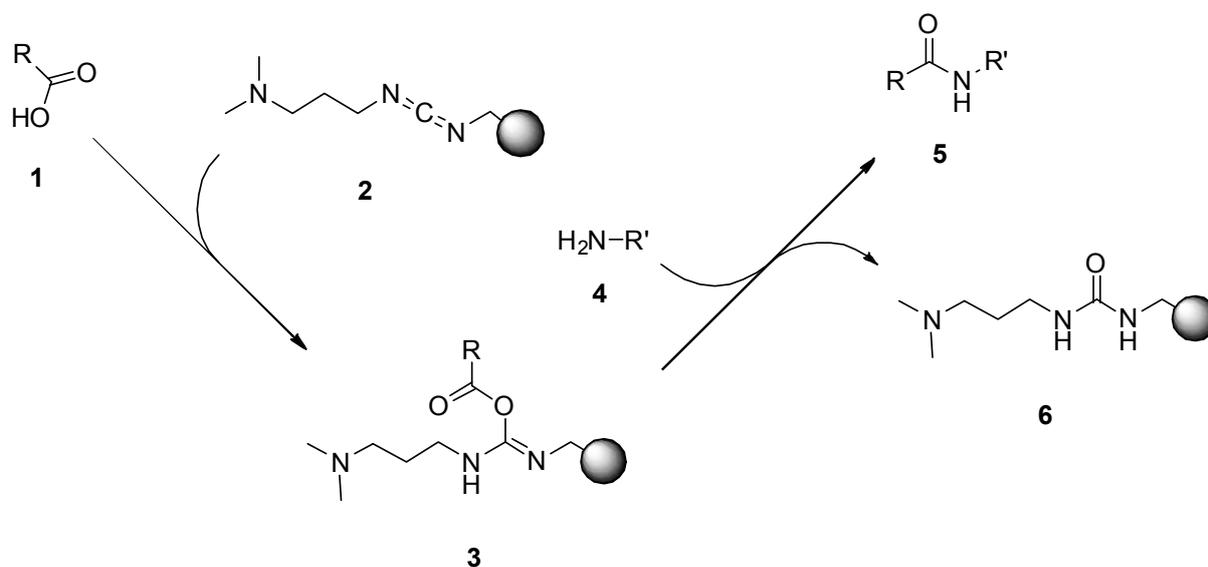


Abb. 15. Die Carbonsäure **1** reagiert mit (polymergebundenem) EDC (**2**) zum intermediären *O*-Acylisoharnstoff **3**. Durch Reaktion mit dem primären Amin **4** entsteht die Amidbindung (Verbindung **5**). Als Nebenprodukt entsteht ein Isoharnstoff-Derivat (**6**).

Ikada^[61] untersuchte die pH-Abhängigkeit der Amidbildung in wässrigem Medium mit EDC und fand, dass die Carboxylataktivierung am effektivsten bei pH 3.4–4.5 stattfindet. Gleichzeitig liegt der optimale pH-Wert für die Ausbildung einer Amidbindung bei pH 4–6. Als Problem bei der Reaktion stellt sich die Reaktivität der intermediären *O*-Acylisoharnstoffverbin-

dung dar, welche nur langsam mit primären Aminen reagiert und demgegenüber besonders in saurem Milieu leicht hydrolysiert (die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Hydrolyse liegt in der Größenordnung weniger Sekunden^[63]). Als optimaler Bereich für die Gesamtreaktion hat sich ein pH-Wert zwischen 4.5 und 7.5 herausgestellt.

Um das Problem der Hydrolyse der reaktiven *O*-Acylisoharnstoffverbindung abzuschwächen, wurde ein Reaktionsweg entwickelt, bei dem das hydrolyseempfindliche Intermediat mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) oder Sulfo-*N*-hydroxysuccinimid als stabilerer NHS-Ester abgefangen wird.^[64] Hierdurch wird eine signifikant höhere Ausbeute an Amidprodukt erreicht.

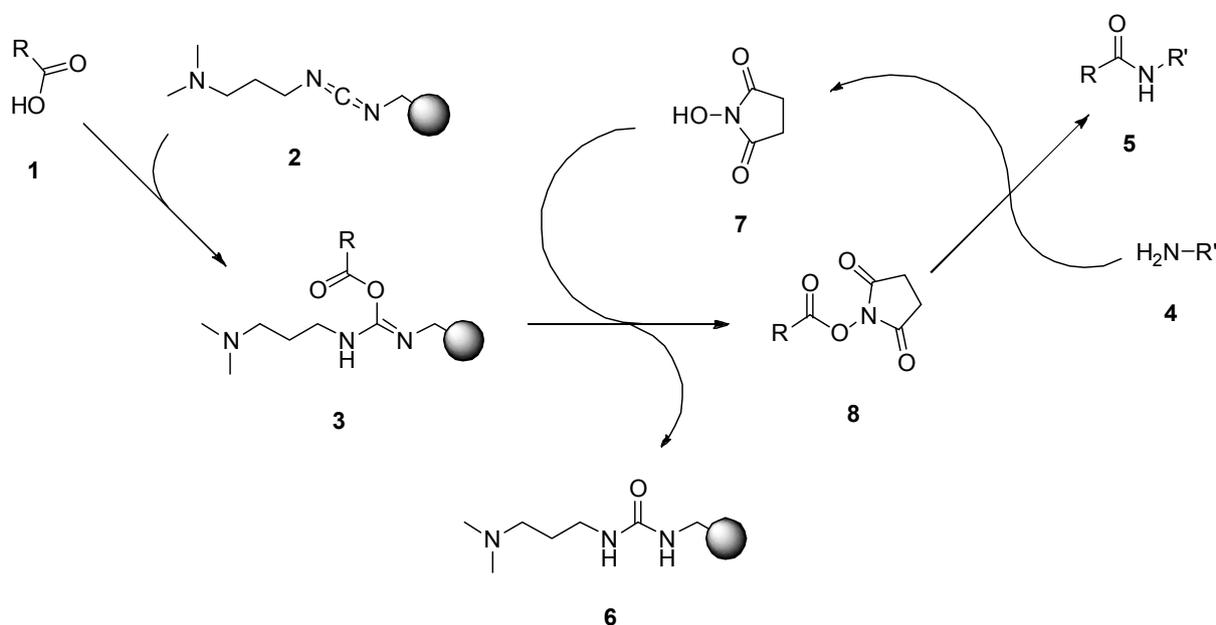


Abb. 16. Der intermediäre *O*-Acylisoharnstoff **3** wird nach Zugabe von *N*-Hydroxysuccinimid (**7**) als reaktiver NHS-Ester (**8**) abgefangen, der eine höhere Hydrolysebeständigkeit aufweist. Zur Löslichkeitsverbesserung kann alternativ Sulfo-*N*-hydroxysuccinimid^[65] eingesetzt werden.

In den durchgeführten Messungen (Beispiel Carboxymethylamylose) wird somit außerhalb des AFMs zunächst der hydrolysestabilere NHS-Ester gebildet (Abb. 17):

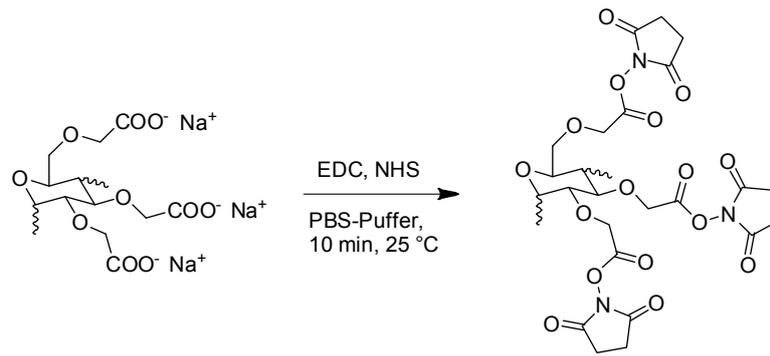


Abb. 17. Durch Reaktion mit EDC und NHS werden die Carboxylgruppen der Carboxymethylamylose in reaktive, hydrolysestabilere NHS-Estergruppen überführt.

Im nächsten Schritt des Messprotokolls wird der reaktive NHS-Ester auf der Objektträger-Oberfläche verankert (Abb. 18):

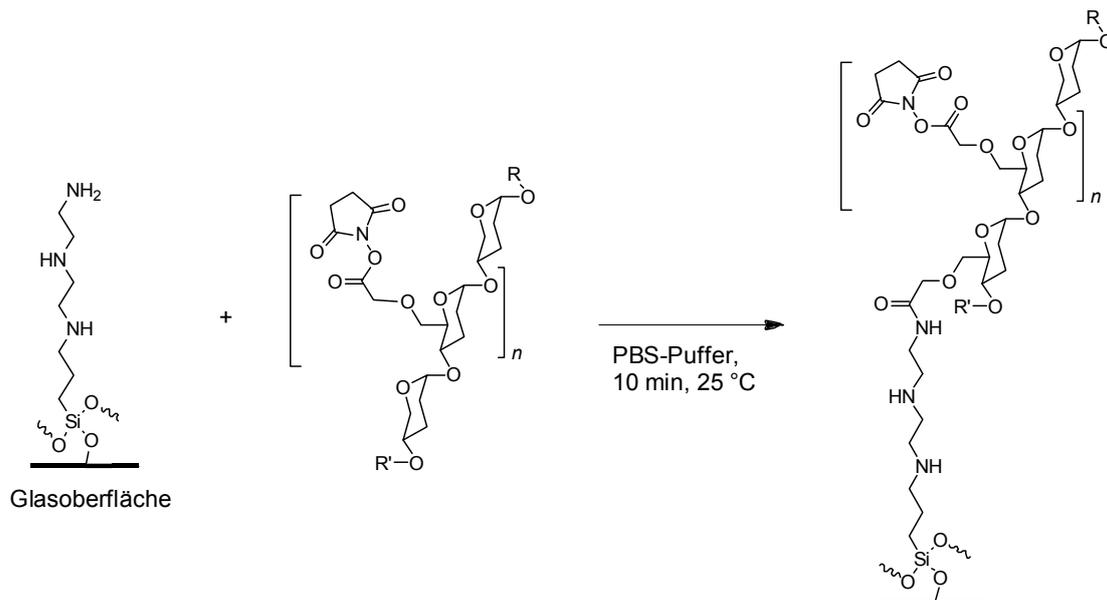


Abb. 18. Der reaktive NHS-Ester reagiert mit einer Aminogruppe an der Oberfläche des Glas-Objektträgers unter Ausbildung einer Amidbindung.

Im abschließenden Schritt findet die Messung am AFM statt (Abb. 19). Der NHS-Ester ist reaktiv und hydrolysestabil genug, so dass über mehrere Stunden Anbindungen an den Cantilever erhalten werden können:

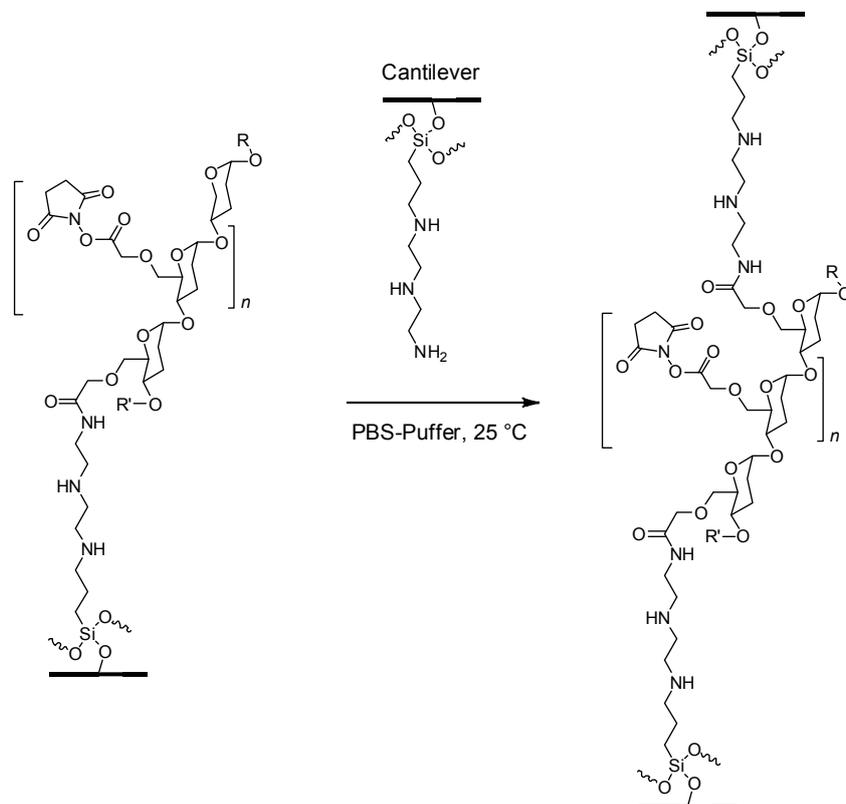


Abb. 19. Der Cantilever wird der Glasoberfläche angenähert und in ca. 1–5 % aller Annäherungen geht eine NHS-Ester-Gruppe eine Reaktion mit einer Aminogruppe auf dem Cantilever ein.

2.2.4 Das Funktionalisierungsprotokoll bei pH 2.0

Es wurde die Beobachtung gemacht, dass bei einem pH-Wert von 2.0, in Abwesenheit von EDC und NHS, im Vergleich zur Ankopplung mit EDC/NHS bei pH 7.4 mehr erfolgreiche Anbindungen an den Cantilever erzielt werden können.^[53] Zur Erklärung dieses Phänomens wird davon ausgegangen, dass die Anbindung der Carboxymethylamylose über Esterbindungen stattfindet. Hierbei müssen bei Verwendung einer Säure als der anzukoppelnden Verbindung auf der Oberfläche freie Hydroxygruppen vorhanden sein, welche die säurekatalysierte Esterbindung eingehen können. Wird das Silan 2-[2-(3-Trimethoxysilylpropylamino)ethyl-

amino]ethylamin (DETA) in wässrigem Milieu auf eine Siliciumdioxid-Oberfläche aufgebracht, so findet, wie in Abschn. 2.2.2 beschrieben, eine (zumindest teilweise) Hydrolyse der Methoxygruppen zu Silanolgruppen statt, welche für die Esterbindung zur Verfügung stehen können (siehe Abb. 20).^[56,66]

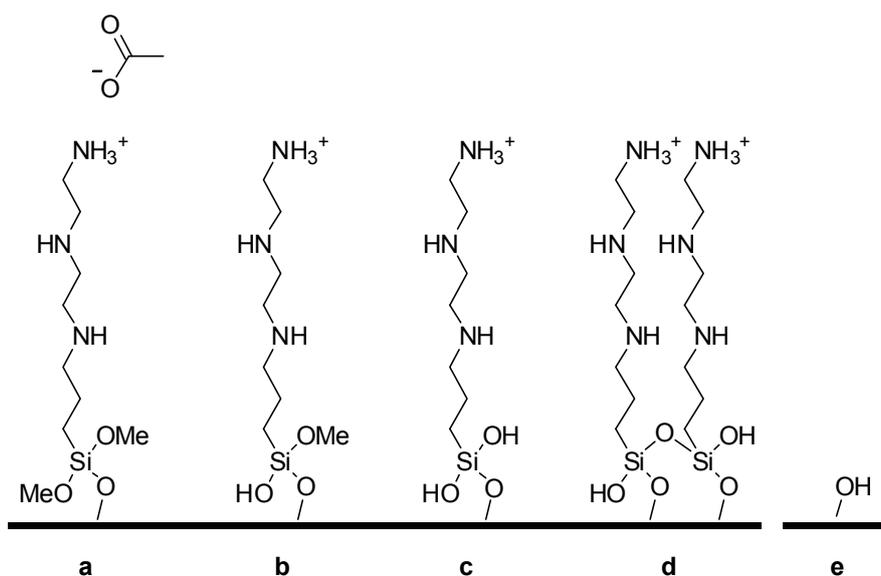


Abb. 20. Verschiedene molekulare Spezies auf einer Siliciumdioxid-Oberfläche nach einer Funktionalisierung mit DETA. a) DETA bindet an die Oberfläche, die beiden übrigen Silanolgruppen sind in Form von Methoxygruppen blockiert. b) Eine Methoxygruppe ist hydrolysiert, und eine Silanolgruppe steht zur Esterbildung zur Verfügung. c) Beide Silanolgruppen sind frei. d) Zwei benachbarte Silanolgruppen sind über eine Disiloxanbindung miteinander verknüpft. Die beiden freien Silanolgruppen stehen zur Esterbildung zur Verfügung. e) Auch auf gereinigten Siliciumdioxid-Oberflächen sind stets freie Silanolgruppen vorhanden, die ebenfalls eine Esterbindung eingehen können.

Entsprechend den möglichen Angriffspunkten für eine Esterbindung auf der Oberfläche analog Abb. 20 ergeben sich folgende drei Möglichkeiten, eine Esterbindung einzugehen (Abb. 21):

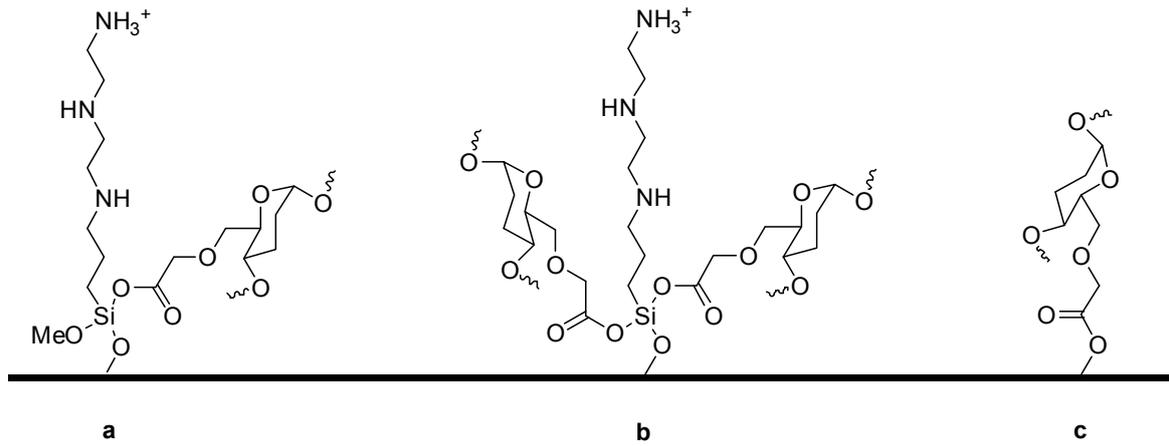


Abb. 21. Verschiedene Möglichkeiten, Amylose bei pH 2.0 kovalent an einer DETA-funktionalisierten Oberfläche zu verankern. a) Reaktion mit einer freien Silanolgruppe am DETA-Molekül. b) Reaktion mit zwei freien Silanolgruppen am DETA-Molekül. c) Reaktion mit einer freien Silanolgruppe an der Oberfläche.

2.3 Force-Ramp-Spektroskopie

2.3.1 Prinzip

Bei der Force-Ramp-Spektroskopie, auch dynamische Kraftspektroskopie genannt, werden die Kräfte gemessen, die notwendig sind, um eine einzelne chemische Bindung zum mechanischen Zerreißen zu bringen. Die Zuggeschwindigkeit des z-Piezos wird während der Messung konstant gehalten („constant velocity mode“), so dass man eine konstante Kraftladungsrate dF/dt erhält, d. h., die auf das angebundene Molekül ausgeübte Kraft nimmt linear zu. Die Kraftladungsrate ergibt sich aus dem Produkt aus (effektiver) Federkonstante (d. h. Federkonstante von Cantilever mit angebundenem Molekül) und Zuggeschwindigkeit (Gl. 16, siehe Seite 33).^[36]

Der Bindungsbruch ist ein kinetischer Prozess, so dass man eine Abrisskraftverteilung erhält. Zur Auswertung wird die Abrisskraft F gegen die Kraftladungsrate dF/dt aufgetragen, und die Parameter aus dem Arrhenius-Kinetikmodell nach Evans und Ritchie^[50,67] (siehe Abschn. 2.3.2) werden extrahiert.

Abb. 22 zeigt eine einzelne, typische Kraft-Auslenkungs-Kurve aus einer Force-Ramp-Messreihe, bei der die auf das Molekül wirkende Kraft gegen die z-Piezo-Position aufgetragen ist. Der Grund dafür, dass Hin- und Wegfahrkurve nicht aufeinander liegen, ist durch die Stokesche Reibung, welche auf den Cantilever während der Bewegung des z-Piezos, besonders beim schnellen Wegfahren nach dem Bindungsriß, wirkt, gegeben.^[36] Dieser hydrodynamische Effekt lässt sich auch zur Bestimmung von Flüssigkeits-Viskositäten nutzen.^[68]

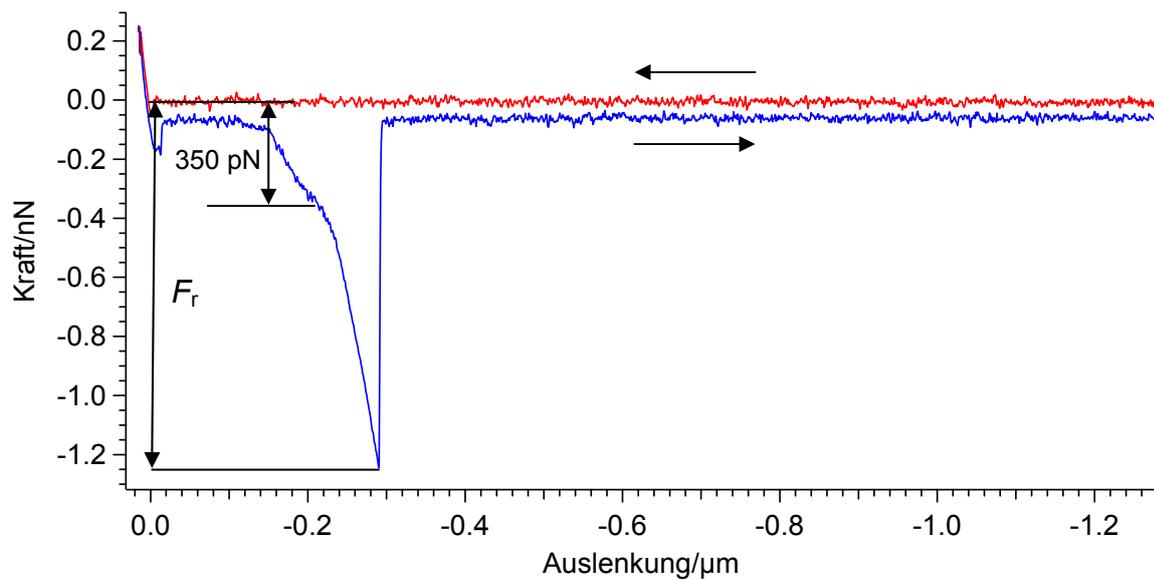


Abb. 22. Kraft-Auslenkungs-Kurve von CMA bei pH 2.0 (PBS), Zuggeschwindigkeit $4 \mu\text{m/s}$, Federkonstante 19.7 pN/nm (Cantilever: Olympus TR400PSA), Sample Rate 20 kHz . Rot: Anfahrkurve des Cantilevers an die Oberfläche. Der Cantilever drückt mit einer nur geringen Kraft von 200 pN in die Oberfläche ein und verweilt dort wenige Sekunden, um ein einzelnes Molekül anbinden zu lassen. Blau: Der Cantilever entfernt sich mit dem angebundenen Molekül von der Oberfläche. Die Kurve weist das für Amylose typische Plateau bei ca. 350 pN auf. Das Plateau wird durch den Übergang der Glucoseringe von der Sessel- in die Wannenform während des Streckvorgangs verursacht^[48] und dient als interne Referenz, dass nur ein einzelnes Amylosemolekül angebunden wurde. Die Abrisskraft F_r in dem Beispiel beträgt etwa 1.23 nN .

Besonders bei erhöhten Temperaturen erhält man häufig gleichzeitig mehrere Anbindungen an den Cantilever, die jedoch erkannt und aussortiert werden können (siehe Abb. 23, 24).

Bei den Messungen mit Amylose ist das charakteristische Plateau bei ca. 350 pN ein Indikator dafür, dass nur ein einzelnes Molekül angebunden ist, da das Plateau bei übereinander liegenden Mehrfachanbindungen verschwindet.

Einige Mehrfachanbindungen lassen sich jedoch noch auswerten, wenn diese nicht übereinander liegen (Abb. 23):

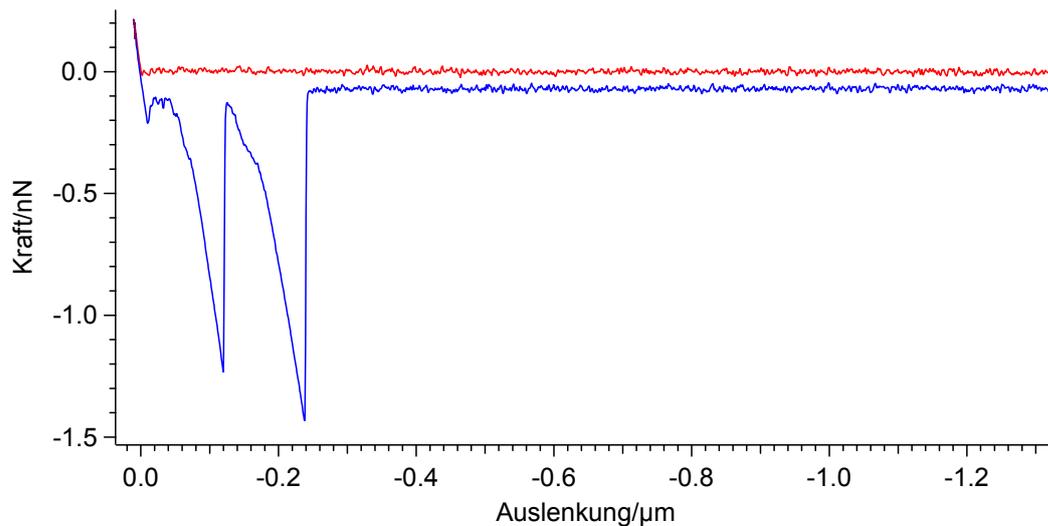


Abb. 23. Nicht übereinander liegende, noch auswertbare Zweifach-Anbindung von CMA bei pH 2.0, Zuggeschwindigkeit 4 $\mu\text{m/s}$, Federkonstante 19.7 pN/nm (Olympus TR400PSA). Hierbei ist nur die zweite Anbindung noch auswertbar, da beim ersten angebondenen Molekül das später abreißende Molekül mit gestreckt worden sein muss, was zu einer Verfälschung der Abrisskraft für das erste vollständig gestreckte Molekül geführt haben kann. Die Fahrtstrecke des z-Piezos ist nach dem zweiten Bindungsriß groß genug, um zu gewährleisten, dass nicht etwa eine Dreifachanbindung vorliegt.

Liegen die Anbindungen jedoch übereinander, lässt sich keine Abrisskraft mehr bestimmen (Abb. 24):

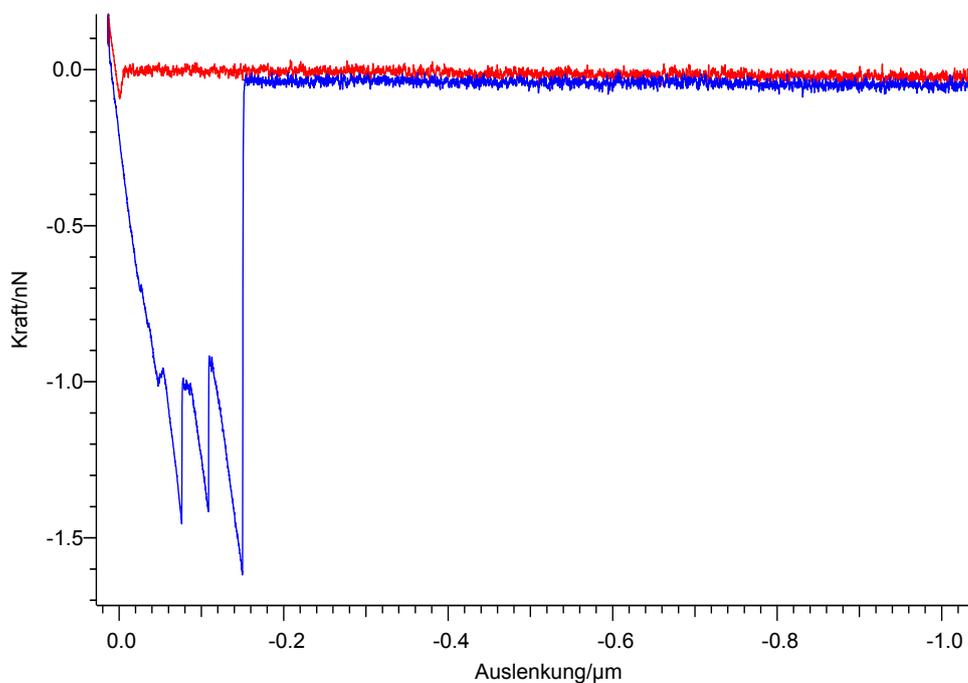


Abb. 24. Dreifachanbindung von CMA bei pH 2.0, Zuggeschwindigkeit 2 $\mu\text{m/s}$, Federkonstante 24.1 pN/nm (Olympus TR400PSA). Keine der drei Anbindungen ist auswertbar.

2.3.2 Theorie

In dem von Bell^[69-72] vorgeschlagenen Kinetik-Modell, das für die Wechselwirkungen zwischen Zellen entwickelt wurde, muss zur Dissoziation am Übergangszustand eine Energiebarriere ΔG^\ddagger überwunden werden. Durch Anlegen einer äußeren konstanten Kraft wird diese Energiebarriere um den Betrag $F \cdot \Delta x^\ddagger$ verringert, wobei Δx^\ddagger dem Abstand zwischen Ausgangspunkt und Maximum der Energiebarriere entspricht (siehe Abb. 25).

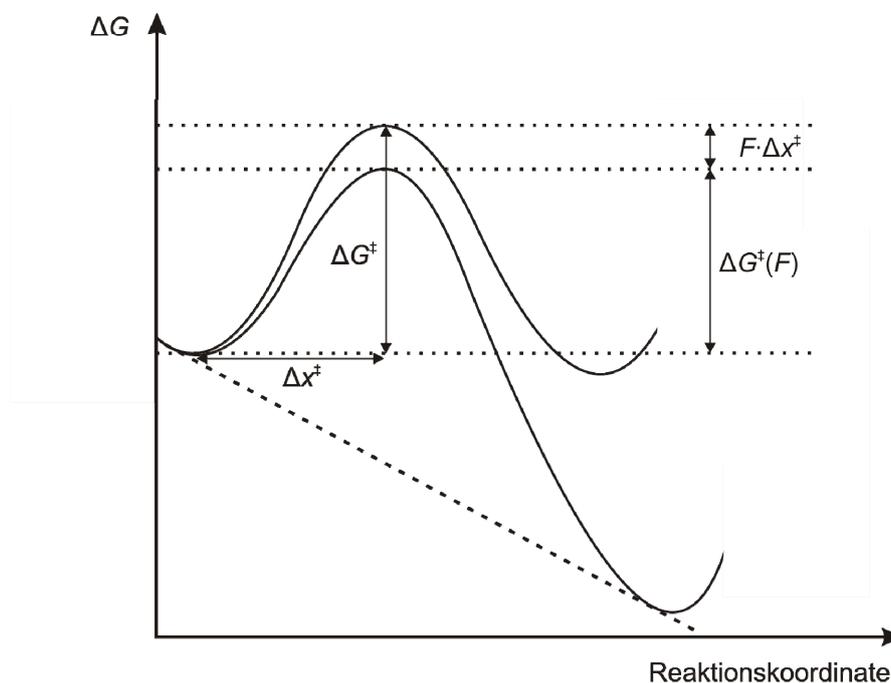


Abb. 25. Einfluss einer äußeren angelegten Kraft (gestrichelte Linie) auf die Energiebarriere im Übergangszustand. Die freie Reaktionsenthalpie des Übergangszustands ΔG^\ddagger wird um den Betrag $F \cdot \Delta x^\ddagger$ verringert.^[72,73]

Es gilt somit:

$$\Delta G(F)^\ddagger = \Delta G^\ddagger - F \Delta x^\ddagger \quad (1)$$

Weiterhin ergibt sich die Gleichgewichtskonstante K der Dissoziation des Komplexes zu

$$K = \frac{k^{\text{on}}}{k^{\text{off}}} \quad (2)$$

Hierbei stellt k^{on} die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation und k^{off} die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Komplexes dar.

Für k^{off} lässt sich mit dem Arrheniusfaktor A schreiben (Eyring-Gleichung):

$$k^{\text{off}} = A \cdot e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}} \quad (3)$$

Die Geschwindigkeitskonstante bei Einfluss einer äußeren Kraft ergibt sich mit Gl. 1 zu:

$$k^{\text{off}}(F) = A \cdot e^{-\frac{\Delta G(F)^\ddagger}{k_B T}} = A \cdot e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}} \cdot e^{\frac{F \Delta x^\ddagger}{k_B T}} = k^{\text{off}} \cdot e^{\frac{F \Delta x^\ddagger}{k_B T}} \quad (4)$$

Für die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k^{off} gilt mit der mittleren Lebensdauer τ_0 des Komplexes:

$$k^{\text{off}} = \frac{1}{\tau_0} \quad (5)$$

Zur Überwindung der Energiebarriere ist der Einfluss der thermischen Energie entscheidend, so dass für die mittlere Lebensdauer des Komplexes τ_0 eine Maxwell-Boltzmann-Verteilung gilt:

$$\tau_0 = \tau_{\text{vib}} \cdot e^{\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}} \quad (6)$$

Hierbei steht τ_{vib} für den Kehrwert der natürlichen Schwingungsfrequenz.

Für die mittlere Lebensdauer als Funktion der anliegenden Kraft gilt mit Gl. 4:

$$\tau(F) = \frac{1}{k^{\text{off}}(F)} = \left(k^{\text{off}} \cdot e^{\frac{F \Delta x^\ddagger}{k_B T}} \right)^{-1} \quad (7)$$

Mit Gl. 5 gilt:

$$\tau(F) = \tau_0 \left(e^{\frac{F\Delta x^\ddagger}{k_B T}} \right)^{-1} \quad (8)$$

Mit Gl. 6 gilt:

$$\tau_0(F) = \tau_{\text{vib}} \cdot e^{\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}} \cdot \left(e^{\frac{F\Delta x^\ddagger}{k_B T}} \right)^{-1} = \tau_{\text{vib}} \cdot e^{\frac{\Delta G^\ddagger - F\Delta x^\ddagger}{k_B T}} \quad (9)$$

Umformen von Gl. 6 und Einsetzen in Gl. 9 liefert

$$\tau(F) = \tau_0 \cdot e^{\frac{\Delta G^\ddagger - F\Delta x^\ddagger}{k_B T}} \cdot \left(e^{\frac{\Delta G^\ddagger}{k_B T}} \right)^{-1} = \tau_0 \cdot e^{\frac{-F\Delta x^\ddagger}{k_B T}} \quad (10)$$

Somit wird die Lebensdauer des Komplexes als Funktion der anliegenden Kraft erhalten. Die Kraft F steht im negativen Exponenten, so dass die Lebensdauer mit steigender Kraft exponentiell abfällt.

Ein weitere Ansatz, um die Krafteinwirkung auf eine chemische Bindung zu beschreiben, ist über das Morse-Potential.

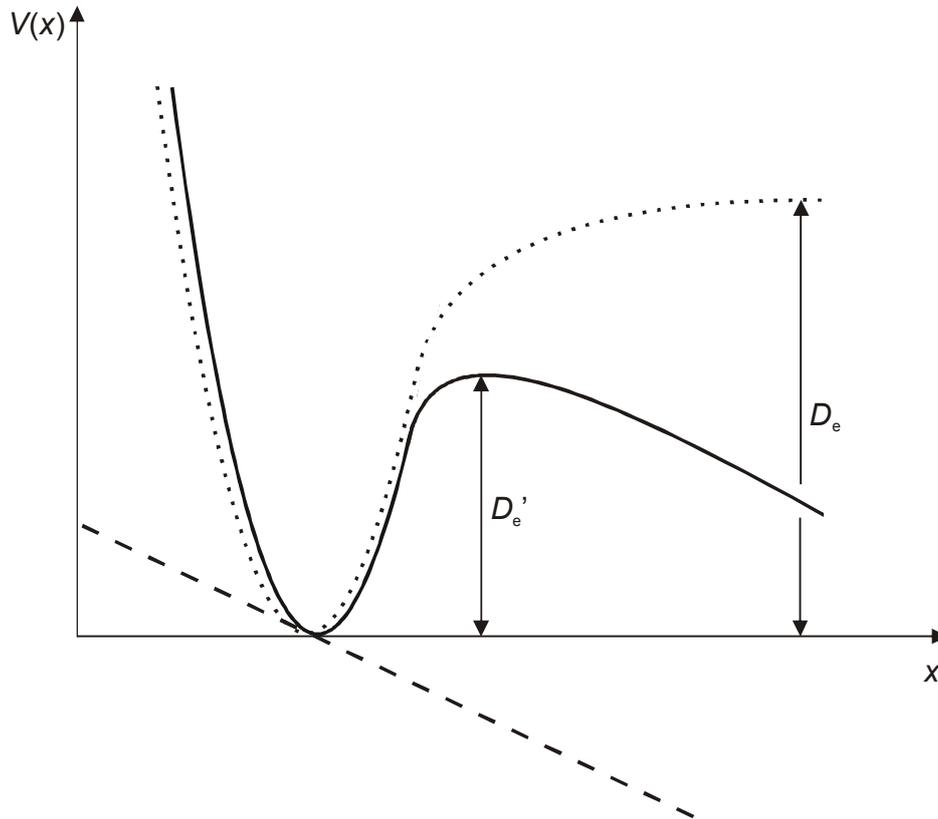


Abb. 26. Morse-Potential unter Kraftereinwirkung (durchgezogene Linie).^[74] Durch das anliegende Kraftpotential (gestrichelte Linie) wird die Dissoziationsenergie der chemischen Bindung von D_e nach D_e' herabgesetzt.

Für das Morse-Potential gilt:

$$V(x) = D_e(1 - e^{-\beta x})^2 \quad (11)$$

$$\beta = \frac{2F_{\max}}{D_e} \quad (12)$$

Hierbei entspricht F_{\max} der Steigung im Wendepunkt der Potentialkurve.

Für das Potential V_{eff} unter Kraftereinwirkung gilt:

$$V_{\text{eff}} = V(x) - F \cdot x = D_e(1 - e^{-\beta x})^2 - F \cdot x \quad (13)$$

Dabei wird davon ausgegangen, dass die anliegende Kraft in Richtung der Reaktionskoordinate verläuft. Auch beim Morse-Potential wird somit durch Krafteinwirkung die Dissoziationsenergie der chemischen Bindung herabgesetzt.

Ein Arrhenius-Kinetik-Modell, das von Evans und Ritchie^[50,67] vorgeschlagen wurde und eine Weiterentwicklung des Bell-Modells^[69] darstellt, geht von der Anwendung einer konstanten Kraftladungsrate dF/dt auf das Molekül aus. Man erhält zunächst eine Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(F)$:

$$P(F) = \frac{k^{\text{off}}}{dF/dt} \exp \left\{ \frac{F \Delta x^\ddagger}{k_B T} + \frac{k^{\text{off}} k_B T}{\Delta x^\ddagger (dF/dt)} \left[1 - \exp \left(-\frac{F \Delta x^\ddagger}{k_B T} \right) \right] \right\} \quad (14)$$

Die Bestimmung des Maximums der Verteilungsfunktion führt zu der wahrscheinlichsten Abrißkraft der Bindung F_{mp} :

$$F_{\text{mp}} = \frac{k_B T}{\Delta x^\ddagger} \ln \left(\frac{dF}{dt} \frac{\Delta x^\ddagger}{k_0^{\text{off}} k_B T} \right) \quad (15)$$

Hierbei ist k_0^{off} die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation bei nicht-anliegender Kraft, dF/dt ist die Kraftladungsrate.

Die beiden freien Parameter in dem Modell sind Δx^\ddagger und k_0^{off} .

Für die Kraftladungsrate gilt mit k_s als Federkonstante des Cantilevers und v der Zuggeschwindigkeit:

$$\frac{dF}{dt} = k_s v \quad (16)$$

Für das Modell wurden verschiedene Vereinfachungen angenommen. Es wird davon ausgegangen, dass die Kraftladungsrate während der gesamten Messung konstant bleibt, dass sich die Kraftkoordinate mit der Reaktionskoordinate deckt und dass Δx^\ddagger unabhängig von der anliegenden Kraft ist. Weiterhin muss sichergestellt sein, dass nur eine einzige Bindung gleichzeitig gebrochen wird, und eine Rückreaktion nach dem Bindungsbruch wird nicht berück-

sichtigt. Bei diesem Modell erweist sich besonders die Annahme, dass die Kraftladungsrate während des gesamten Experiments konstant bleibt, als Problem.^[50,70]

Weiterhin ist eine quantenchemische Berechnung von Abrisskräften mittels Dichtefunktionaltheorie(-DFT)-Rechnungen möglich. Von Beyer^[71] wurde hierfür das „COGEF“-Modell vorgeschlagen („constrained geometries simulate external force“), bei dem der Abstand beider Modellatome als variabler Parameter schrittweise vergrößert und in jedem Schritt eine vollständig relaxierte Geometrieoptimierung vorgenommen wird. Mittels COGEF-Rechnungen konnte schließlich die Bindung ermittelt werden, die bei Kraftexperimenten mit CMA/DETA reißt: Die schwächste Bindung in der Kette ist demnach die Silicium-Kohlenstoff-Bindung.^[71] Von Beyer wurde hierfür ein Wert für die Dissoziationsenergie von 337.4 kJ/mol berechnet (siehe Tab. 2).^[71]

Tab. 2. Von Beyer^[71] berechnete Bindungsdissoziationsenergien für den Bindungsbruch unter Krafteinwirkung sowie die maximalen Abrisskräfte F_{\max} (Theorielevel: B3LYP/D95(d,p)).

Bindung	$D_e/\text{kJ mol}^{-1}$	F_{\max}/nN
C–C	370.8	6.92
C–N	338.9	7.24
C–O	344.5	7.56
Si–C	337.4	4.78
Si–N	373.2	4.70
Si–O	425.6	5.20
Si–Si	296.1	3.28

Eine Weiterentwicklung des COGEF-Konzepts stellt das „EFEI“-Modell („external force explicitly included“) von Marx^[75] dar.

2.3.3 Auswertung

Die Auswertung wird nach dem Arrheniuskinetik-Modell von Evans und Ritchie^[50,67] durchgeführt. Hierbei wird Gl. 15 (siehe Abschn. 2.3.2) in der Software „Igor Pro“ an die Messpunkte angepasst. Man erhält die beiden freien Parameter in dem Modell, den Abstand zwischen Ausgangspunkt und Maximum der Energiebarriere Δx^\ddagger sowie die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation der Bindung bei nicht-anliegender Kraft, k_0^{off} .

Zunächst wurden die Messergebnisse der Force-Ramp-Messungen bei pH 2.0 und einer Zuggeschwindigkeit von $2 \mu\text{m/s}$ bei beiden AFMs, dem „NanoWizard“ der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Clausen-Schaumann in München und dem „MFP-3D Bio“ in Kiel, miteinander verglichen, um sicherzustellen, dass Ergebnisse auf beiden AFMs reproduzierbar erhalten werden.

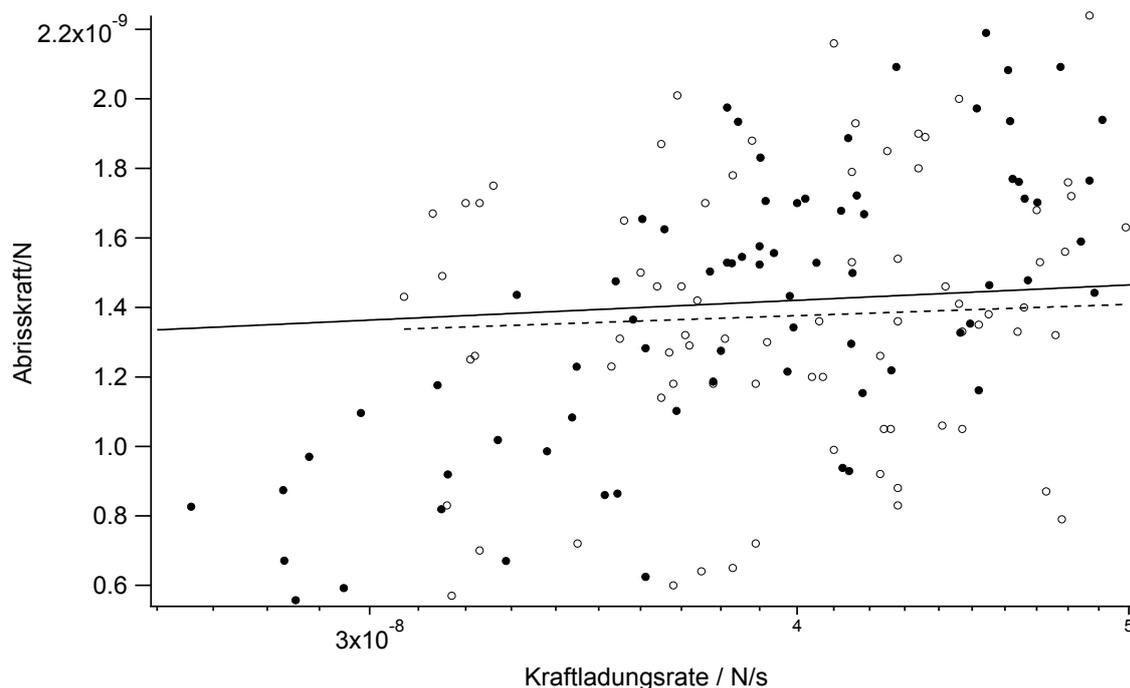


Abb. 27. Vergleich der AFMs in Kiel und München über Force-Ramp-Messungen (CMA in PBS bei pH 2.0, Zuggeschwindigkeit $2 \mu\text{m/s}$). Ausgefüllte Punkte/durchgezogene Linie: „MFP-3D Bio“ Kiel, Fa. Asylum Research, Santa Barbara; unausgefüllte Punkte/gestrichelte Linie: „NanoWizard“ München, Fa. JPK Instruments AG, Berlin. Die Ergebnisse liegen in guter Übereinstimmung.

Tab. 3. Vergleich der Force-Ramp-Messungen zwischen dem Asylum Research „MFP-3D Bio“ und dem JPK „NanoWizard“ (CMA bei pH 2.0, Zuggeschwindigkeit: 2 $\mu\text{m/s}$, $T \approx 25$ °C).

AFM	$k_0^{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	$\Delta x^\ddagger / \text{m}$
„MFP-3D Bio“	0.154	$2.081 \cdot 10^{-11}$
„NanoWizard“	0.022	$2.816 \cdot 10^{-11}$

Man erhält Ergebnisse, die bei beiden AFMs in der gleichen Größenordnung liegen. Da die Temperatur mit in Gl. 15 eingeht, die Messungen jedoch nicht in temperaturgeregelten Zellen, sondern bei Zimmertemperatur durchgeführt wurden, ist die relativ geringe Abweichung der Messergebnisse voneinander möglicherweise hierdurch begründet. Für beide Messreihen wurde für das Kinetikmodell eine konstante Temperatur von 298 K angenommen.

Es wurden weitere Messungen an CMA bei pH 2.0 und einer Zuggeschwindigkeit von 20 $\mu\text{m/s}$ durchgeführt (siehe Abb. 28). Hierbei erhielt man Werte für $k_0^{\text{off}} = 0.116 \text{ s}^{-1}$ und $\Delta x^\ddagger = 2.553 \cdot 10^{-11} \text{ m}$. Zur Auswertung wurde wiederum eine konstante Temperatur von 298 K angenommen.

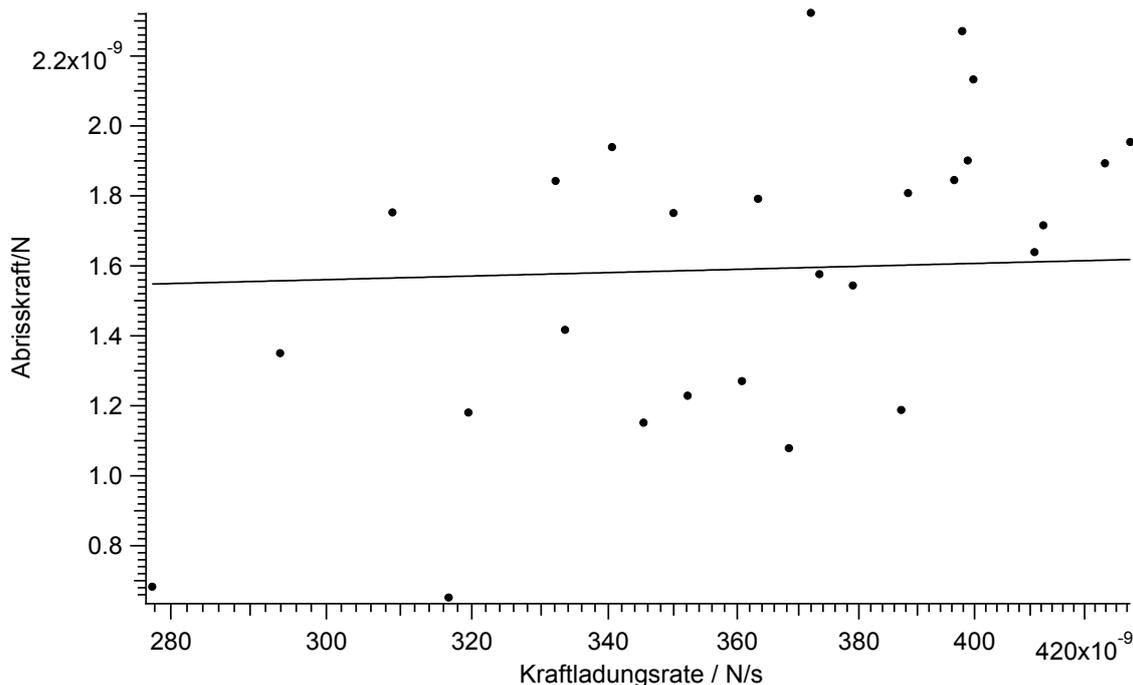


Abb. 28. Force-Ramp-Messung von CMA bei pH 2.0 (PBS), Zuggeschwindigkeit: 20 $\mu\text{m/s}$. Die Kurvenanpassung wurde nach dem Modell von Evans und Ritchie^[50,67] durchgeführt (erhaltene Parameter siehe oben).

2.4 Force-Clamp-Spektroskopie

2.4.1 Prinzip

Bei der Force-Clamp-Spektroskopie („constant force mode“) wird die Kraft auf das angebundene Molekül durch einen aktiven Regelmechanismus des z-Piezos konstant gehalten und die Zeit gemessen, bis die schwächste Bindung in der angebundenen Molekülkette reißt. Zunächst wurde die Methode des Force-Clamp von Fernandez^[76] auf die Entfaltung von Proteinen angewendet, um Informationen über Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur zu gewinnen. Hierbei erhält man einen charakteristischen stufenweisen Anstieg der Moleküllänge im zeitlichen Verlauf, da bei anliegender, vergleichsweise schwacher Kraft, nach und nach sämtliche intramolekularen Kräfte im Protein überwunden werden. Die Kraft-Auslenkungs-Kurve zeigt ein charakteristisches „Sägezahn“-Muster.^[76]

Die erste Force-Clamp-Messung zur Spaltung kovalenter chemischer Bindungen in einer bimolekularen Reaktion wurden von Fernandez^[73,77] 2006 beschrieben. Hierbei wurden die

Disulfidbindungen einer Polypeptidkette durch Zugabe eines Reduktionsmittels bei einer Haltekraft von 130 pN gespalten (Prinzip siehe Abb. 29).

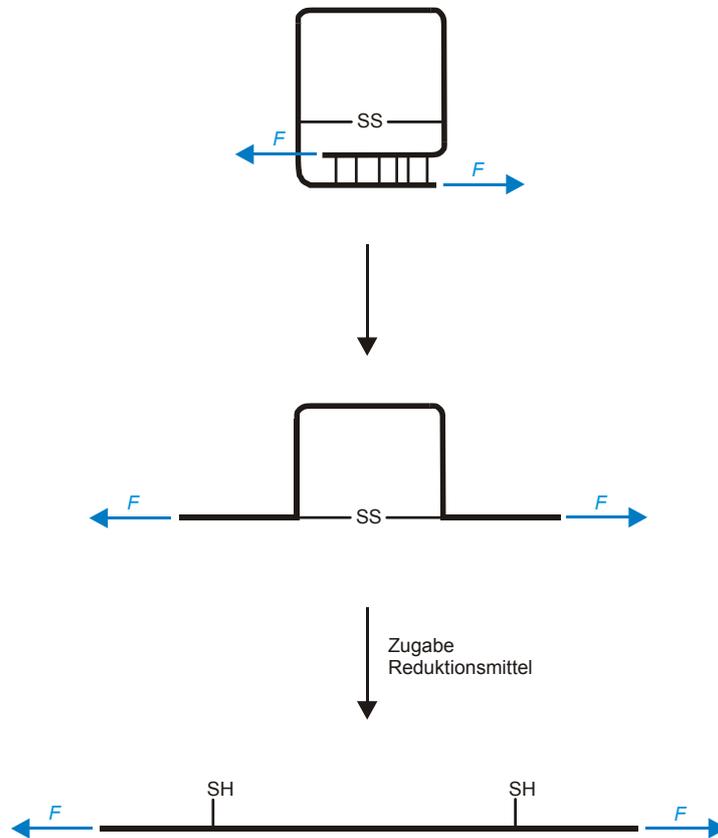


Abb. 29. Prinzip der Entfaltung eines einzelnen Peptids nach Fernandez et al.^[73] in einem Force-Clamp-Experiment. Oben: Die Tertiärstruktur des Peptids wird durch intramolekulare Kräfte wie z. B. Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten. Mitte: Alle nicht-kovalenten intramolekularen Wechselwirkungen wurden mechanisch überwunden. Die Zugspannung liegt an der Disulfidbrücke im Molekül an. Unten: Nach Zugabe des Reduktionsmittels DTT wird die Disulfidbrücke aufgebrochen, und das Peptid wird auf seine volle Länge gestreckt. Die Längenänderung entspricht hierbei genau der Länge der „Schleife“ hinter der Disulfidfunktion.

Der Mechanismus der Reaktion mit dem von Fernandez eingesetzten Reduktionsmittel 1,4-Dithiothreitol (DTT) stellt sich wie folgt dar:^[78]

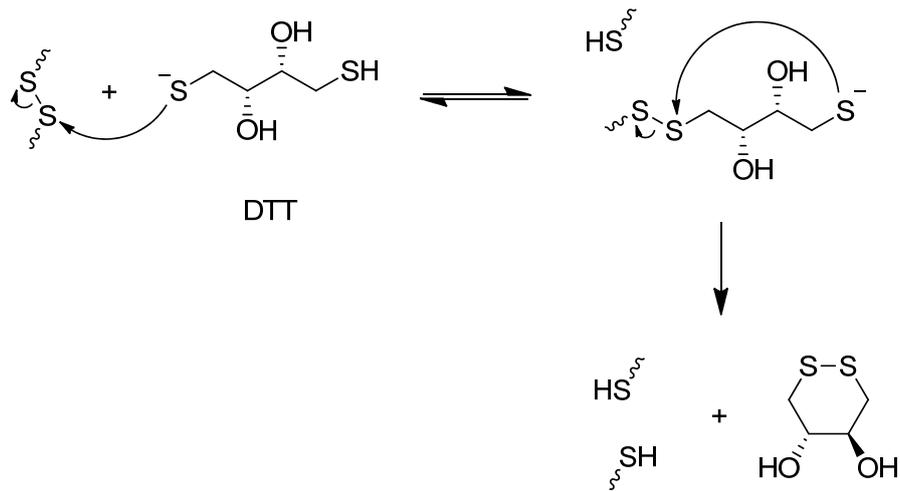


Abb. 30. Mechanismus der Reduktion einer Disulfidbrücke mit dem Reduktionsmittel 1,4-Dithiothreitol (DTT) durch S_N2 -Reaktion.^[78]

Mit dem Schlaufenkonzept von Fernandez (siehe Abb. 29) ist es möglich, direkt durch das Experiment zu erfahren, welche Bindung im Molekül gerissen ist. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Systemen CMA/DETA bzw. Azobenzol/PEG-Silan kann die gerissene Bindung nur durch quantenchemische Rechnungen, bisher jedoch nicht direkt aus dem Experiment bestimmt werden.

Abb. 31 zeigt eine Kraft-Auslenkungs-Kurve eines Force-Clamp-Experiments mit PEG-Silan/Azobenzol:

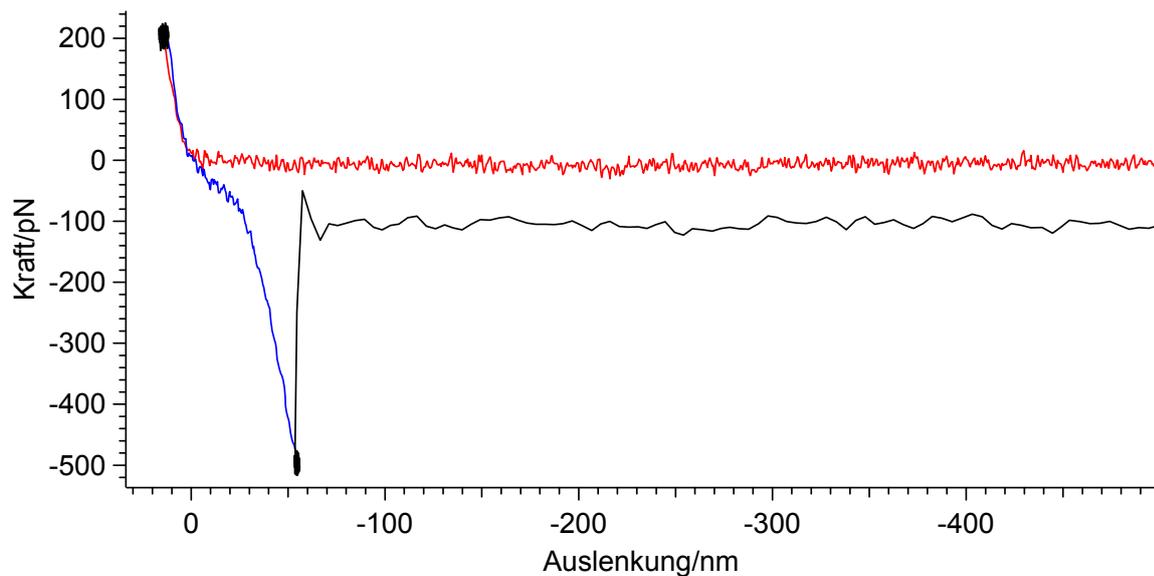


Abb. 31. Kraft-Auslenkungs-Kurve eines Force-Clamp-Experimentes mit Azobenzol/PEG-Silan in Wasser (Haltekraft 500 pN, Temperatur: 35.0 °C, Integral Gain = 3, Sample Rate = 2 kHz, Zuggeschwindigkeit = 1 $\mu\text{m/s}$, Dwell Time = 1.5 s, Cantilever: Olympus TR400PSA, Federkonstante = 21.4 pN/nm). Die Kurve ähnelt einer Messkurve aus einem Force-Ramp-Experiment und unterscheidet sich im Wesentlichen nur durch die durch Rauschen verbreiterten Messpunkte bei 200 pN Eindrückkraft (Verweilen an der Oberfläche) und -500 pN Haltekraft (Halten des Moleküls über ca. 0.5 s).

Hin- und Wegfahrkurve der Force-Clamp-Messung liegen auch hier deutlich verschoben und nicht etwa aufeinander.

Die Geschwindigkeit des Wegfahrens nach dem Bindungsriß lässt sich softwareseitig nicht kontrollieren, wohl jedoch die Geschwindigkeit, mit der das angebundene Molekül gestreckt wird (blaue Linie).

Die zugehörige Kraft-Zeit-Kurve des Experiments aus Abb. 31, aus welcher die Haltezeit ermittelt werden kann, stellt sich wie folgt dar:

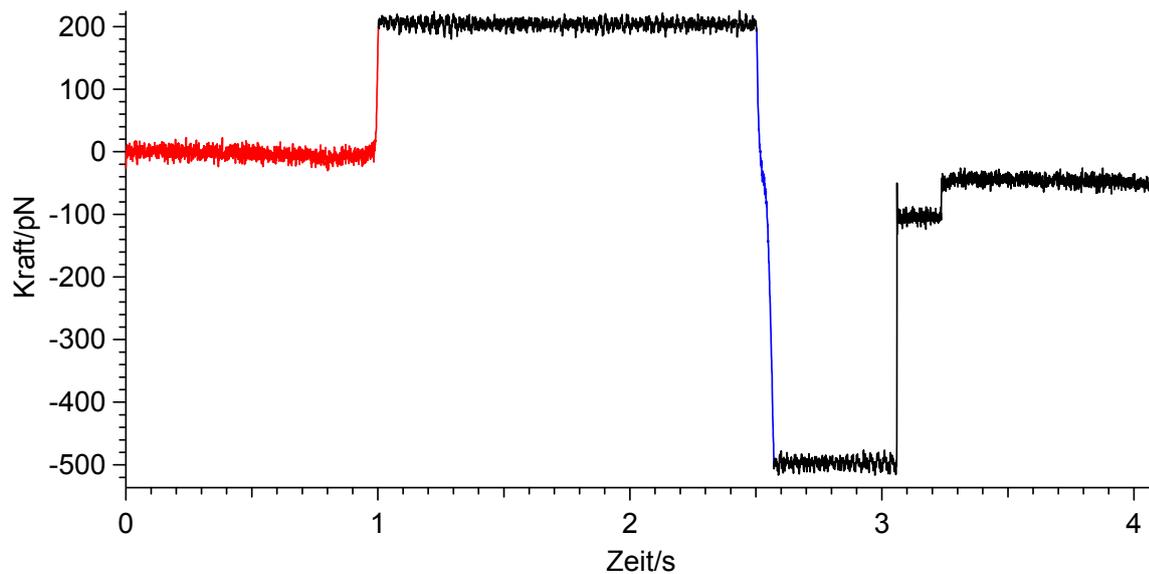


Abb. 32. Durchführung eines Force-Clamp-Experiments mit dem AFM im zeitlichen Verlauf (Messparameter wie bei Abb. 31). Rote Linie: Anfahren des z-Piezos an die Oberfläche. Schwarze Linie: Aufsetzen (mit 200 pN Andruckkraft) und Verweilen auf der Oberfläche für 1,5 s, um ein Molekül kovalent anbinden zu lassen. Blaue Kurve: Entfaltung des angebundenen Moleküls bis zur voreingestellten Haltekraft (500 pN). Schwarz: Halten des Moleküls, bis die schwächste Bindung in der Molekülkette reißt. Nachdem das Molekül gerissen ist, fährt der z-Piezo in die Ausgangsposition zurück. Aus der Kraft-Zeit-Kurve wird in der Software „Igor Pro“ die Haltezeit des Moleküls für jede Anbindung einzeln bestimmt.

Die Auslenkungs-Zeit-Kurve (siehe Abb. 33) macht deutlich, dass die Molekülstreckung (blau) im Vergleich zum Gesamt-Fahrtweg des z-Piezos nur eine relativ kurze Strecke einnimmt. Weiterhin ist der Kurve zu entnehmen, dass das Wegfahren des Piezos nach dem Abriss des Moleküls mit einer vergleichsweise hohen Geschwindigkeit erfolgt. Dies ist, wie oben beschrieben, der Grund für die hohe Stokesche Reibung, die auf den Cantilever besonders während des Wegfahrens wirkt.

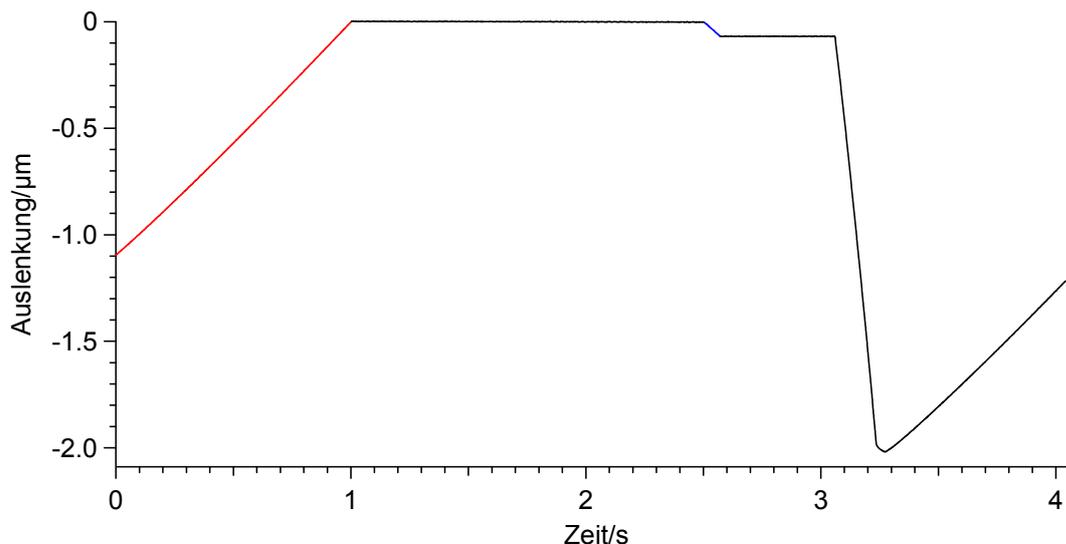


Abb. 33. Auslenkungs-Zeit-Kurve eines Force-Clamp-Experiments (zugehörige Kraft-Auslenkungs-Kurve siehe Abb. 31). Auch hier zeigen sich die aufeinanderfolgenden Schritte Anfahren an die Oberfläche (rot), Verweilen auf der Oberfläche (schwarz), Entfaltung des Moleküls (blau), Halten des Moleküls (schwarz) und schnelles Wegfahren von der Oberfläche nach dem Bindungsriß mit Anfahren der Ausgangsposition.

Besonders bei höheren Messtemperaturen zeigt sich auch in der Force-Clamp-Spektroskopie, dass mehr als ein Molekül gleichzeitig an den Cantilever angebunden werden kann. Eine Steuerungsmöglichkeit, dieses Phänomen zu verringern, ist die Änderung der Verweilzeit auf der Oberfläche auf einen geringeren Wert (typisch 1 s). Abb. 34 zeigt die Kraft-Auslenkungs-Kurve einer Doppelanbindung in einem Force-Clamp-Experiment:

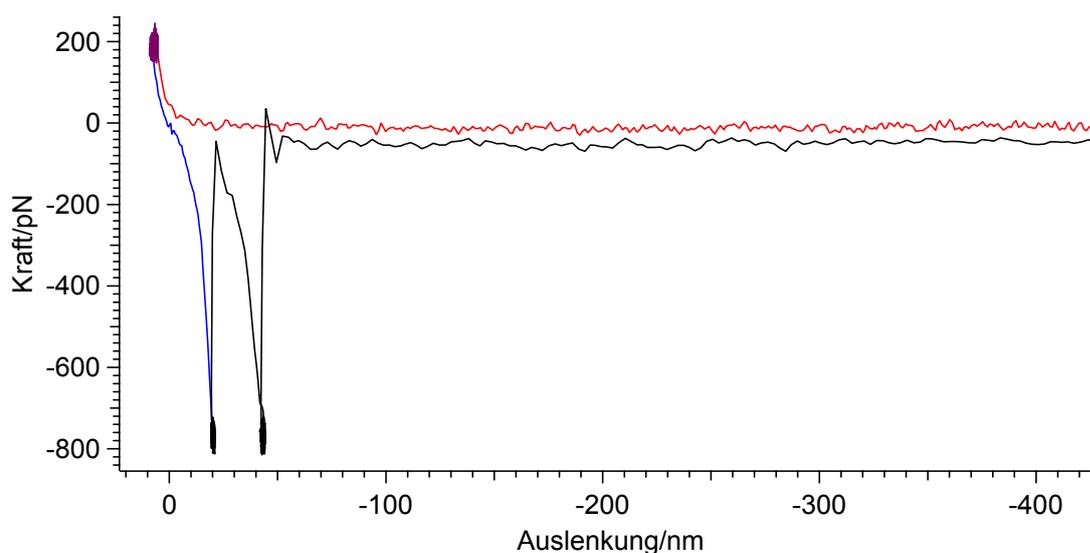


Abb. 34. Doppelanbindung während eines Force-Clamp-Experiments. Nur die zweite Anbindung ist noch auswertbar (Messparameter wie bei Abb. 31).

Das Nachregeln des Piezos lässt sich in der Kraft-Zeit-Kurve ablesen. Die Zeitspanne zwischen dem Nachregeln und dem Abriss des zweiten angebondenen Moleküls lässt sich noch zur Auswertung nutzen.

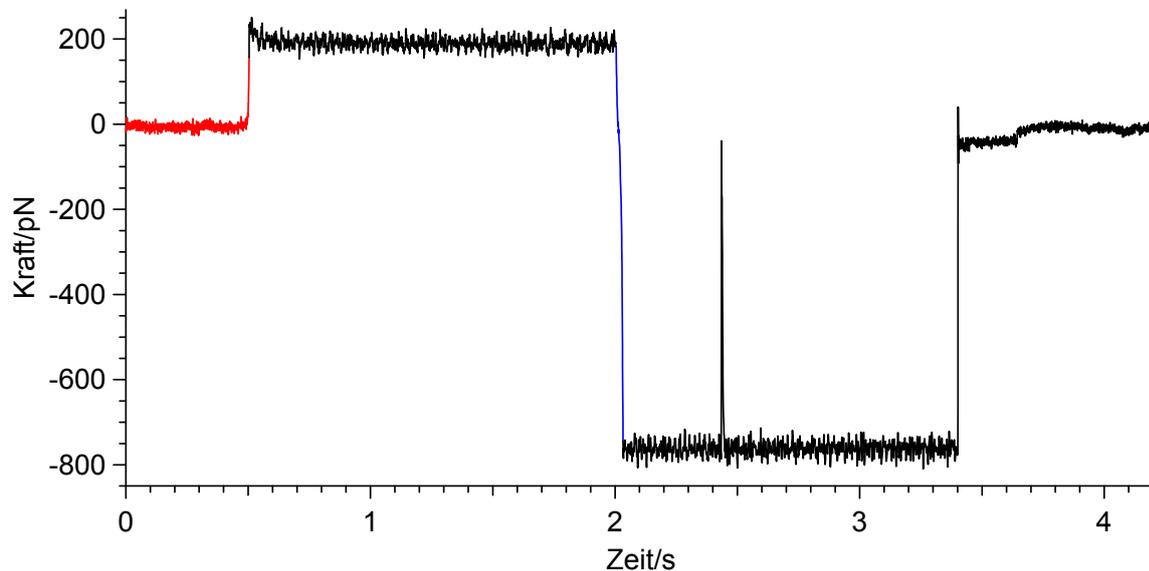


Abb. 35. Identifikation einer Doppelanbindung in einem Force-Clamp-Experiment. Während des Haltevorgangs reißt das kürzere bzw. unter einem kleineren Winkel angebundene Molekül (siehe hierzu Abb. 77). Der z-Piezo regelt sofort nach (Peak bei ca. 2.45 s) und hält das zweite angebundene Molekül, bis es reißt. (Zugehörige Kraft-Auslenkungs-Kurve siehe Abb. 34.)

2.4.2 Der mechanische Einzelmolekül-Schalter

Von Gaub^[79] wurde ein optomechanischer Zyklus vorgestellt, bei dem ein Polyazopeptid über eine Schwefelbindung zwischen goldbeschichteter Oberfläche und Cantilever verankert wird. Das Polymer enthält ca. 50 Azobenzol-Einheiten und kann durch Belichtung mittels TIRF-Aufbaus zwischen überwiegend-*trans*- und überwiegend-*cis*-Konfiguration geschaltet werden. Durch Schalten in die *cis*-Konfiguration, welche eine Verkürzung des Moleküls bedeutet, kann mechanische Arbeit gegen eine äußere anliegende Kraft an dem Molekül verrichtet werden. Es existieren jedoch Nachteile bei dem Konzept von Gaub. So ist der Schwefelanker zu schwach, um größeren Kräften standzuhalten. Dementsprechend wurden in den Arbeiten von Gaub nur Kräfte von wenigen Hundert Piconewton aufgewendet, die zu schwach waren, um den *cis*- zu *trans*-Übergang mechanisch durchführen zu können. Demgegenüber zeigt sich der

in vorliegender Arbeit verwendete Silan-Anker auch bei Kräften von mindestens 1.7 nN bei Haltezeiten von > 0.3 s stabil. Weiterhin ist nicht klar, wie viele Azobenzol-Monomere in jedem Schaltzyklus zwischen *cis*- und *trans*-Konfiguration geschaltet werden.

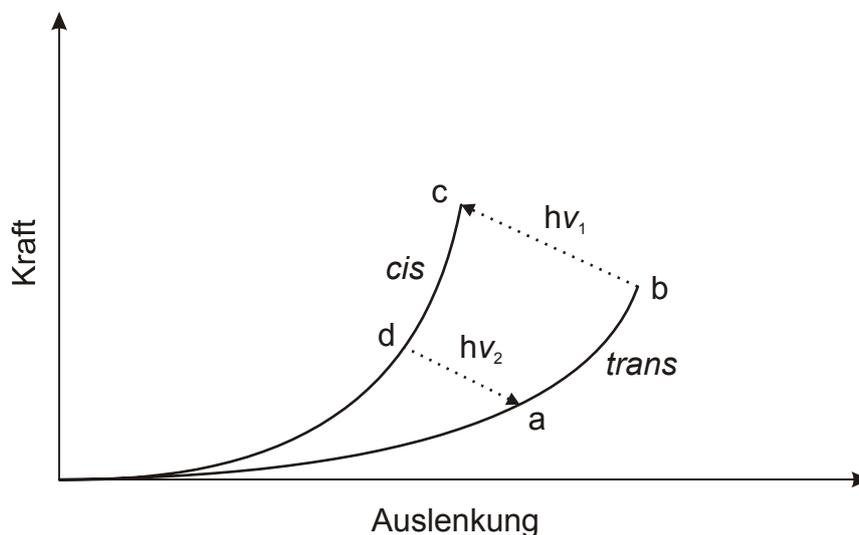


Abb. 36. Schematische Darstellung des optomechanischen Zyklus' nach Gaub.^[79] a) Das Polymer befindet sich in seiner längeren Poly-*trans*-Konfiguration und wird gestreckt bis zum Punkt b. b) An diesem Punkt wird Licht der Wellenlänge ν_1 eingestrahlt, wodurch die Poly-*trans*-Azobenzolkette in die verkürzte Poly-*cis*-Konfiguration übergeht. c) Das Polymer wird entspannt und geht in den Zustand d über. d) Beim Bestrahlen mit Licht der Wellenlänge ν_2 wird das Molekül wieder zurück in die Poly-*trans*-Konfiguration geschaltet.

In dieser Arbeit wurde das Anbindungsprotokoll für einen mechanischen Einzelmolekül-Schalter, ein Azobenzol, entwickelt. Die Kopplung mit Oberfläche und Cantilever erfolgt dabei mit der gleichen Reaktionsmethode wie bei Carboxymethylamylose, d. h., es wird ein Dicarboxyazobenzol eingesetzt, das die benötigte Carboxy-Funktionalität trägt. Das Azobenzol sollte dabei zusätzlich langkettige Spacer tragen, um aus dem Bereich der (Van-der-Waals-)Wechselwirkungen zwischen Oberfläche und Probe zu kommen. Die Kopplung an die Oberfläche sollte über ein Silan erfolgen, um eine höhere Stabilität der Bindung als bei der Verwendung von z. B. einem Thiolanker aufzuweisen. Da die Einheit aus Silan und PEG-Spacer mit Aminoterminus kommerziell erhältlich ist (Fa. Nanocs, New York), kann das kurzkettige, kommerziell erhältliche 4,4'-Dicarboxyazobenzol (Fa. ABCR, Karlsruhe) direkt mit dem langkettigen PEG-Amin mit EDC/NHS verknüpft werden (siehe Abb. 37).

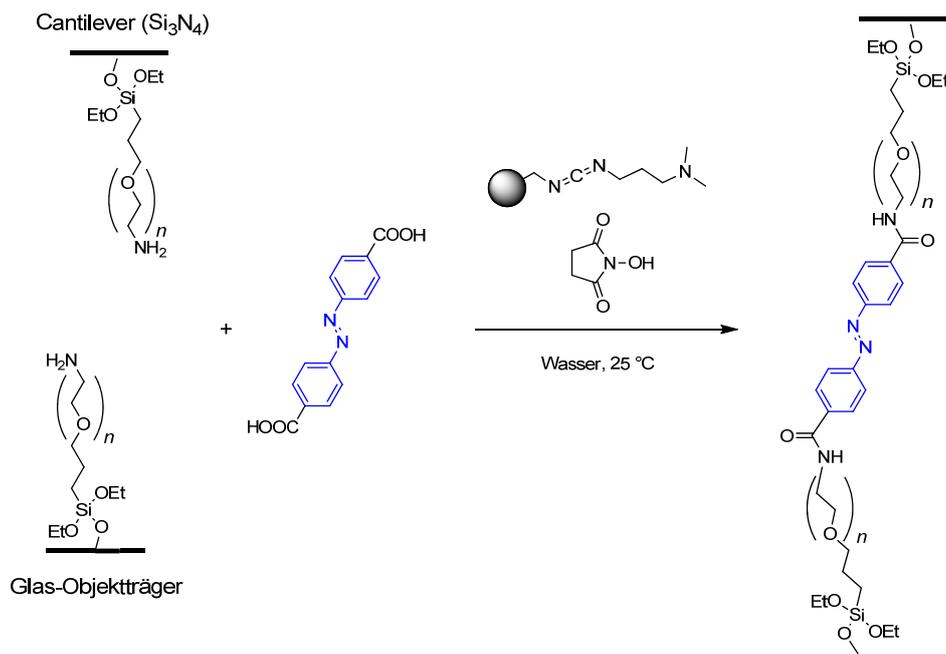


Abb. 37. Die Anbindung des Azobenzols (blau) als Dicarbonsäure erfolgt wie beim System CMA/DETA als mit EDC vermittelter NHS-Ester. Die notwendigen langen PEG-Spacer befinden sich hierbei in der Silankomponente ($n \approx 72$).

Ist der Azobenzolschalter angebunden, wird das Molekül im Force-Clamp-Modus gehalten, und durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge kann ein Schaltprozess von *trans* nach *cis* und umgekehrt erfolgen. Die erfolgte Längenänderung sollte mit ausreichend hoher Empfindlichkeit detektierbar sein. Abb. 38 zeigt den Schaltprozess:

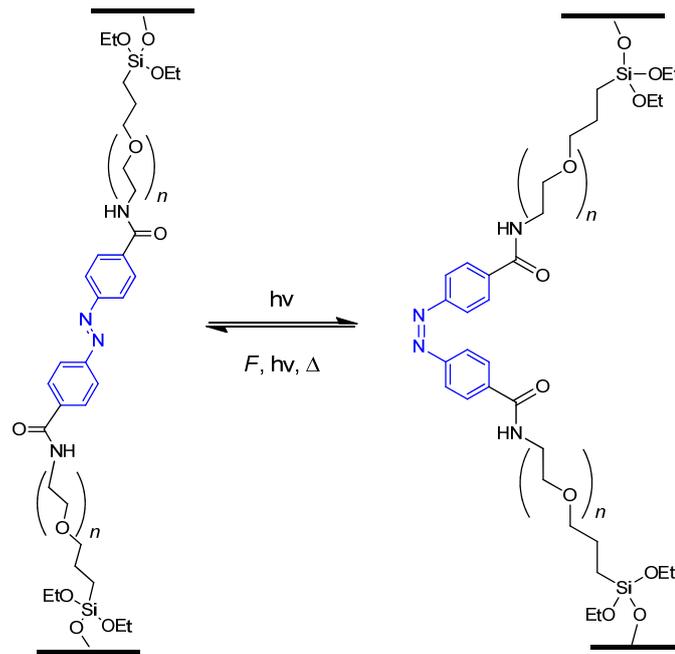


Abb. 38. Das einzelne Azobenzolmolekül ist angebunden und kann photochemisch in die *cis*-Konfiguration geschaltet werden. Rückreaktion in die *trans*-Form ist mechanochemisch, photochemisch (mit größerer Wellenlänge als beim Hinschalten) oder thermisch möglich ($n \approx 72$).

Um das Rauschen während der Messungen zur optimalen Detektion des Schaltprozesses zu minimieren, wurden verschiedene AFM-Einstellungen variiert (zur Bedeutung der einzelnen Messparameter siehe auch Abschn. 2.5). Ziel war es, eine möglichst genaue Längenkontrolle des angebundenen Moleküls zu erreichen, um den Schaltvorgang am einzelnen Molekül nachweisen zu können.

Eine zentrale Größe ist der Integral Gain, mit dem die Regelgeschwindigkeit des z-Piezos kontrolliert wird. Es wurden hierbei verschiedene Werte von 0.1 bis 5 variiert und der Einfluss auf das Rauschen untersucht. Ein Wert von 3 zeigt dabei einen guten Kompromiss aus Regelgeschwindigkeit und Rauschen, wobei jedoch nur eine recht starke Abweichung von diesem Wert einen deutlichen Einfluss auf das Rauschen hat, der Integral Gain also relativ frei zwischen ca. 2–5 gewählt werden kann. Der in der Software dimensionslos angegebene Integral Gain stellt außerdem eine relative Größe dar und ist somit je nach verwendetem Cantilever verschieden.

Eine weitere Größe, die Einfluss auf das Rauschen während der Messung nimmt, ist der Feedback Filter. Hierbei zeigte sich zunächst die Voreinstellung von 1 kHz als optimal.

Weiterhin kann das Rauschen über die Sample Rate beeinflusst werden. Dieser Parameter scheint nicht nur die Anzahl der aufzuzeichnenden Datenpunkte während der Messung anzu-

geben, sondern auch Einfluss auf den Regelkreis zu nehmen. Es zeigte sich ein Wert von 2 kHz als geeignet, da eine z. B. um den Faktor zehn höhere Sample Rate zu deutlich gesteigertem Rauschen führt.

Ein signifikanter Einfluss der Verwendung entweder des kleinen oder des großen Cantilevers auf dem meistverwendeten Olympus-TR400PSA-Cantileverchip auf das Rauschen konnte nicht festgestellt werden.

Das AFM wird bereits auf einem aktiv schwingungsgedämpften Tisch zum Schutz vor Vibrationen betrieben; für eine Abschirmung des Akustikschalleintrages während der Messung zur weiteren Verringerung des Rauschens ist ggf. die Verwendung einer Schallschutzhaube über dem AFM sinnvoll, da der Einfluss des Akustikschalls durch Sprechen oder auch Geräusche außerhalb des Labors z. T. in Form von Ausschlägen in den Kraftkurven sichtbar ist.

Das Rauschen während einer Messung sollte mit den optimierten Parametern gering genug sein, um das Schalten eines einzelnen Azobenzolmoleküls detektieren zu können. Das Kraft-rauschen beträgt etwa ± 20 pN (siehe Abb. 39). Eine Längenänderung während des Schaltens von ca. 0.3 nm, wie für ein einzelnes Azobenzolmolekül zu erwarten ist, sollte mit den verwendeten Messparametern detektierbar sein (siehe zu Abb. 39 gehörige Auslenkungs-Zeit-Kurve, Abb. 40).

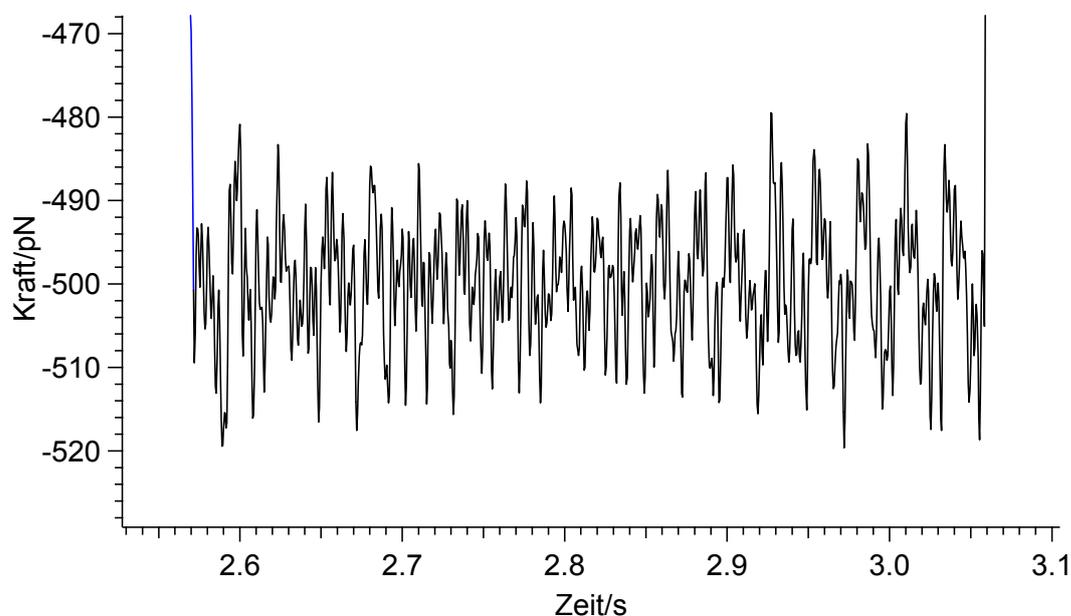


Abb. 39. Vergrößerung des Haltebereichs der Kurve von Abb. 31. Das Rauschen beträgt etwa ± 20 pN ohne Verwendung einer Schallschutzhaube über dem AFM. Messparameter: Temperatur: 35.0 °C, Integral Gain = 3, Sample Rate = 2 kHz, Zuggeschwindigkeit = 1 μ m/s, Feedback Filter = 1 kHz, Cantilever: Olympus TR400PSA, Federkonstante: 21.4 pN/nm.

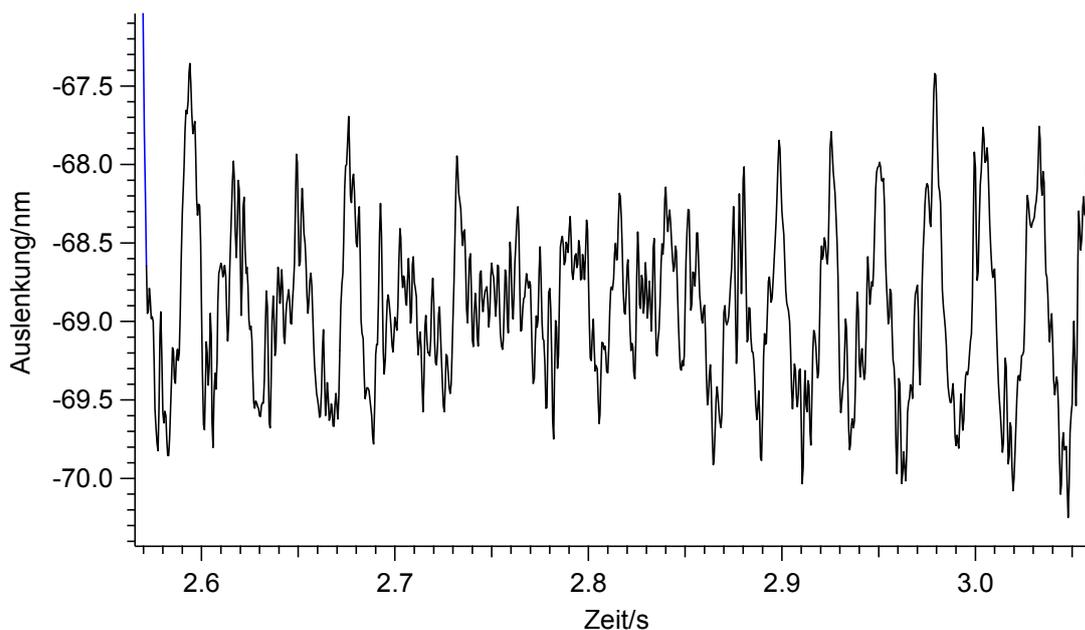


Abb. 40. Vergrößerung der Auslenkungs-Zeit-Kurve der Messung von Abb. 31. Das Längenrauschen beträgt etwa ± 0.75 nm, damit sollte eine Längenänderung durch Schalten eines einzelnen Azobenzolmoleküls in der Größenordnung von ca. 0.3 nm – zumindest durch Verschieben des Rauschens – detektierbar sein. Die Verwendung einer Schallschutzhaube sollte auch hier noch zu einer merklichen Verbesserung führen.

2.4.3 Auswertung

Zur Auswertung von Force-Clamp-Messungen wird stets die Lebensdauer der chemischen Bindung unter Krafteinwirkung, t , gegen die Anzahl der bei der Zeit t intakten Bindungen $N(t)$ aufgetragen (Zerfallsgesetz). Aus der erhaltenen Kurve lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten der Prozesse, die zum Bindungsbruch führen, durch biexponentielle Kurvenanpassung oder nach dem „Maximum Likelihood“-Schätzverfahren^[80] ermitteln.

Ein biexponentielles Modell scheint am Besten zur Beschreibung der in dieser Arbeit erhaltenen Messkurven geeignet zu sein (Formel siehe Tab. 4); man erhält daher in der Konsequenz zwei Geschwindigkeitskonstanten, k_1 und k_2 , denen zwei unterschiedliche Isomere zuzuordnen sind. Dabei könnte es sich zum Beispiel um zwei unterschiedliche Verankerungen der untersuchten Moleküle auf der Oberfläche handeln (siehe Abschn. 2.2.2).

Beim Bindungsriss bricht wahrscheinlich die Silicium-Kohlenstoff-Bindung im Anker, wie von Beyer^[71] in der Gasphase berechnet ($D_e = 337.4$ kJ mol⁻¹); eine mögliche andere Bin-

dung, die unter Zugspannung reißt, könnte die Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung mit einer Dissoziationsenergie von ca. $338.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ sein (siehe Tab. 2).

Ein möglicher Mechanismus, nach dem der Bindungsriß an einer dieser beiden Bindungen oder der Silicium-Sauerstoff-Bindung im Molekül abläuft, ist eine Hydrolyse durch Wassermoleküle der umgebenden wässrigen (PBS-)Lösung.^[81] Eine andere Reaktion könnte z. B. der homolytische Bindungsbruch durch Krafteinwirkung oder die Anlagerung eines Sauerstoffradikals^[1] an die gestreckte Bindung sein.

2.4.3.1 4,4'-Dicarboxyazobenzol, PEG-Silan

Für die Messungen wurden folgende Parameter verwendet:

Pull Off = 0 nm

Surface Trigger = 200 pN

Wegfahrgeschwindigkeit von der Oberfläche = $1 \mu\text{m/s}$

Verweilzeit auf der Oberfläche („dwell time“) = 1–2 s

Sample Rate = 2–20 kHz

Integral Gain = 2–5

Lösungsmittel: Wasser oder wässr. PBS-Pufferlösung

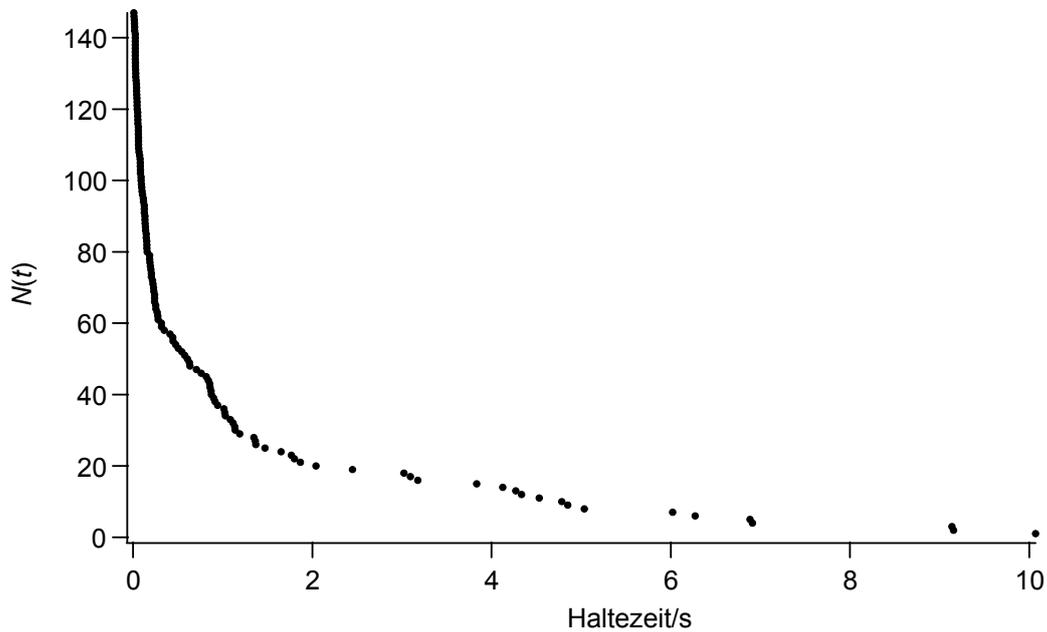
Messungen bei Zimmertemperatur:**600 pN Haltekraft:**

Abb. 41. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 600 pN Haltekraft und Zimmertemperatur. Federkonstanten: 87.3 pN/nm, 23.7 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gains = 2, 3. Es wurden zwei Messreihen in einer Kurve zusammengefasst. Bei beiden Messreihen erhielt man insgesamt ca. 10 Anbindungen, die auch nach 30 s nicht rissen (nicht dargestellt).

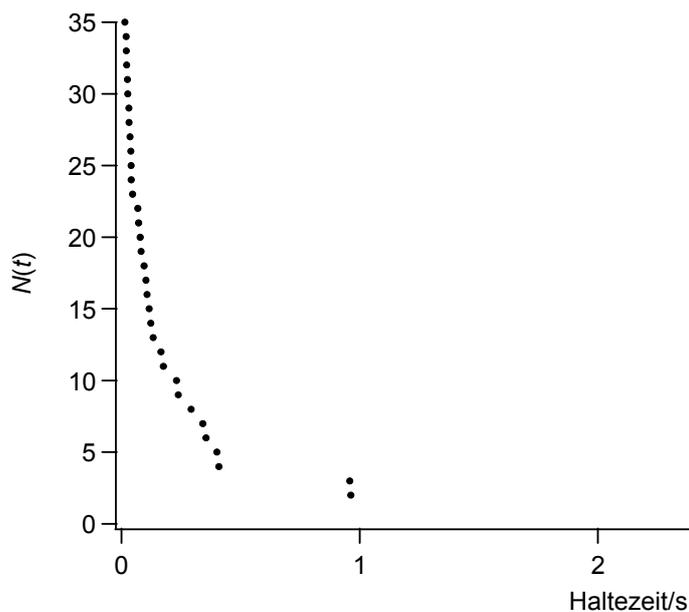
800 pN Haltekraft:

Abb. 42. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 800 pN Haltekraft und Zimmertemperatur. Federkonstanten: 84.3 pN/nm, 84.0 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gains = 3, 5.

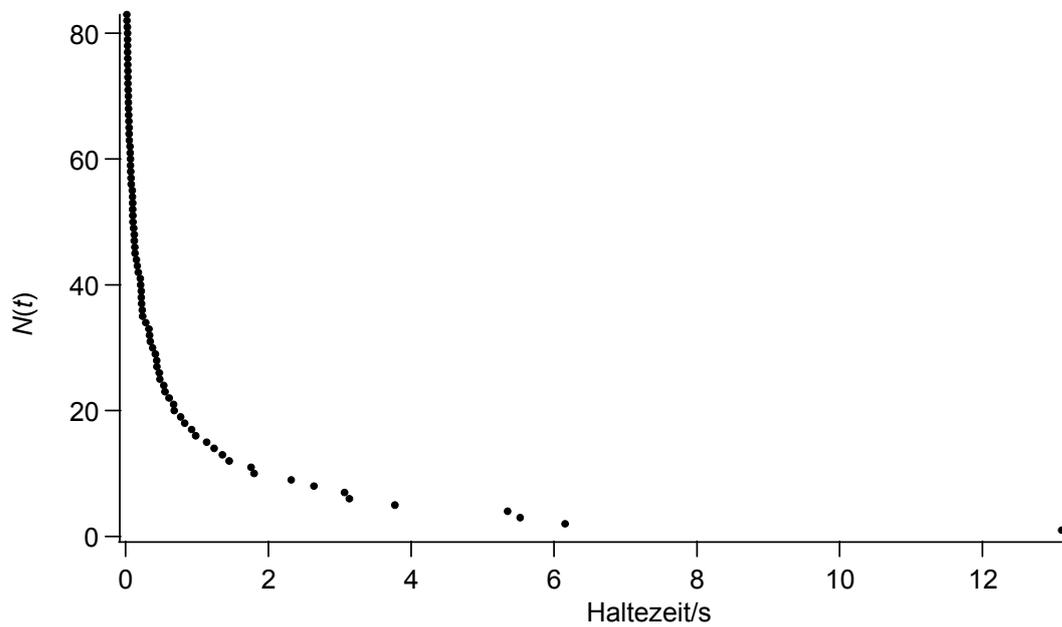
1.00 nN Haltekraft:

Abb. 43. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 1.00 nN Haltekraft und Zimmertemperatur. Federkonstanten: 84.0 pN/nm, 79.4 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gains = 3, 5.

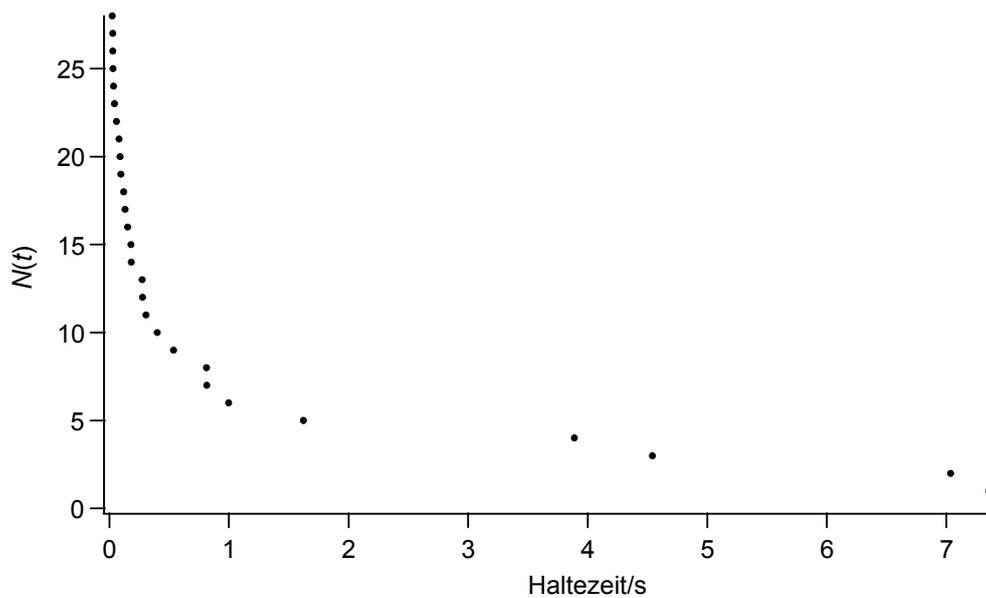
1.20 nN Haltekraft:

Abb. 44. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 1.20 nN Haltekraft und Zimmertemperatur. Federkonstanten: 89.9 pN/nm, 24.2 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

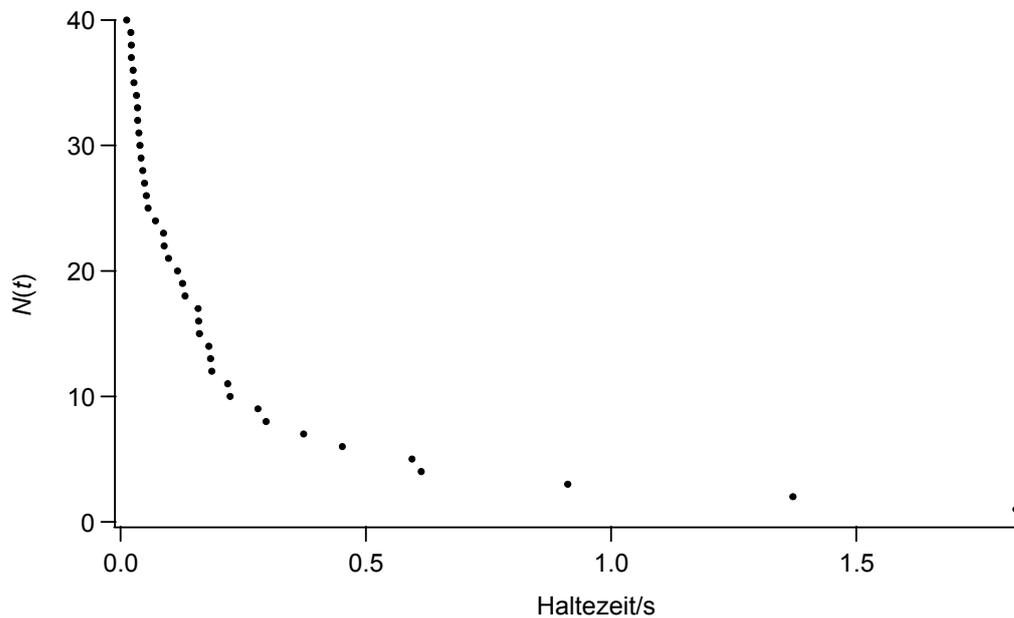
1.50 nN Haltekraft:

Abb. 45. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 1.50 nN Haltekraft und Zimmertemperatur. Federkonstanten: 10.1 pN/nm, 9.36 pN/nm (Veeco MLCT); Integral Gain = 3.

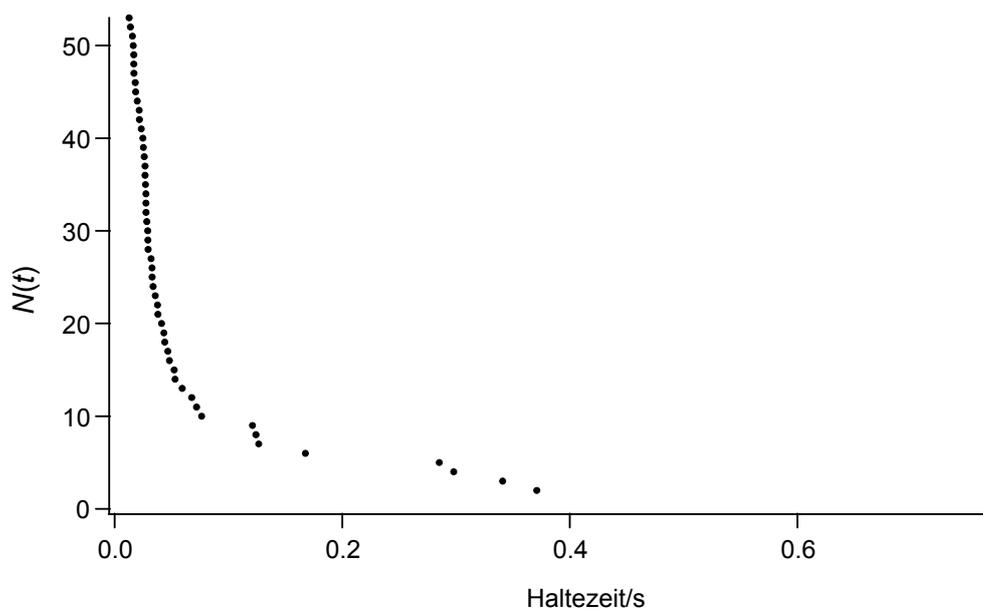
1.70 nN Haltekraft:

Abb. 46. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 1.70 nN Haltekraft und Zimmertemperatur. Federkonstanten: 60.4 pN/nm, 58.0 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3. Wie bei einer recht hohen Kraft von 1.70 nN zu erwarten ist, werden nur relativ kurze Anbindungen < 1 s erhalten.

Die Messwerte wurden zunächst mit dem literaturbeschriebenen „Maximum Likelihood“-Verfahren^[80] in „Excel“ ausgewertet. Hiermit wurden der Gewichtungsfaktor AI und die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 ermittelt (siehe Tab. 4, Werte „(1)“). Die so erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend als Startwerte für eine biexponentielle Kurvenanpassung mit der „Least Squares“-Methode in „Origin“ verwendet (siehe Tab. 4, Werte „(2)“).

Tab. 4. Ergebnisse der „Maximum Likelihood“-Auswertungen und der biexponentiellen Kurvenanpassungen in „Origin“ bei sechs verschiedenen Haltekräften und Zimmertemperatur.

Die Formel für die Kurvenanpassung nach dem „Least Squares“-Verfahren lautet: $f(x) = AI \cdot e^{-k_1 x} + A2 \cdot e^{-k_2 x}$. Die Werte $AI+A2$ sind auf 1 normiert.

Aus der Auswertung erhält man die beiden Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 . Der Gewichtungsfaktor AI zeigt den Beitrag der ersten Reaktion zum Dissoziationsprozess an. (1): „Maximum Likelihood“, (2): „Least Squares“-Kurvenanpassung.

Haltekraft/nN	k_1/s^{-1} (1)	k_2/s^{-1} (1)	AI (1)	k_1/s^{-1} (2)	k_2/s^{-1} (2)	AI (2)
0.60	0.44	8.01	0.43	0.47	8.22	0.42
0.80	0.75	8.29	0.13	0.91	8.58	0.13
1.00	0.43	6.10	0.31	0.49	7.15	0.31
1.20	0.32	5.73	0.30	0.33	5.99	0.30
1.50	1.60	9.21	0.25	1.63	9.10	0.25
1.70	3.97	26.0	0.18	4.01	26.0	0.18

Der Vergleich beider Auswerteverfahren, „Maximum Likelihood“- und „Least Squares“-Methode, zeigt nur eine recht geringe Abweichung der Ergebnisse von meist wenigen Zehntel. Der Gewichtungsfaktor AI hat hier höchstens eine Abweichung von einem Hundertstel; k_2 ist stets größer als k_1 .

Offensichtlich ist eine biexponentielle Kurvenanpassung, die auch für die Auswertung der Amylosemessungen zum Zuge kommt (siehe Abschn. 2.4.3.2), am Besten zur Beschreibung der Messkurven geeignet, wie aus Abb. 47 (s. u.) als Beispiel im Vergleich etwa zu einer monoexponentiellen Kurvenanpassung (Abb. 48) ersichtlich ist.

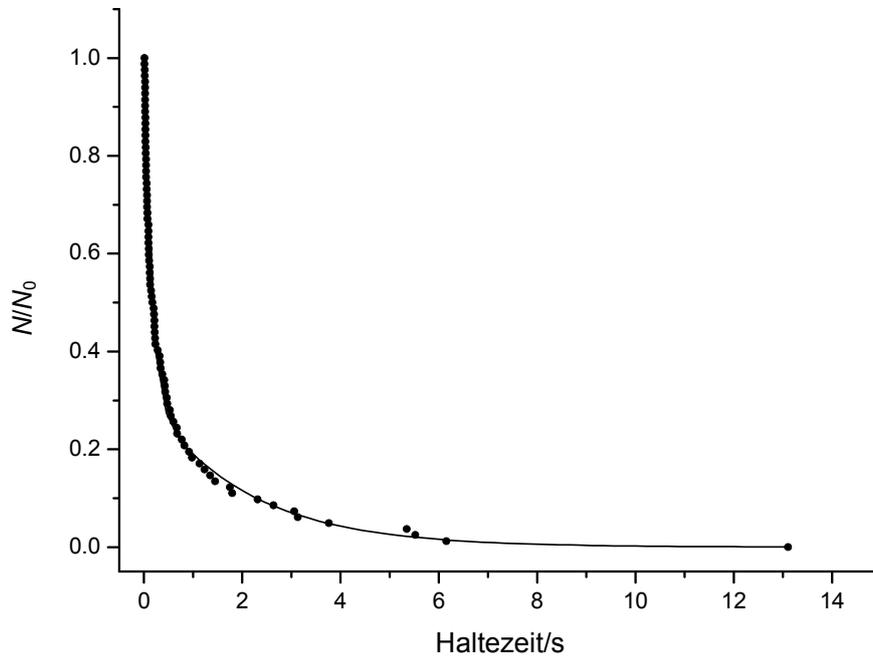
Vergleich mono- und biexponentielle Kurvenanpassung:**biexponentiell:**

Abb. 47. Auswertung der Messung bei 1.00 nN Haltekraft des Azobenzol-/PEG-Silan-Systems in Wasser (siehe Abb. 43) mit exemplarischer biexponentieller Kurvenanpassung in „Origin“. Der Kurvenverlauf wird besser als bei Auswertung mit einer monoexponentiellen Kurvenanpassung wiedergegeben (siehe hierzu Abb. 48).

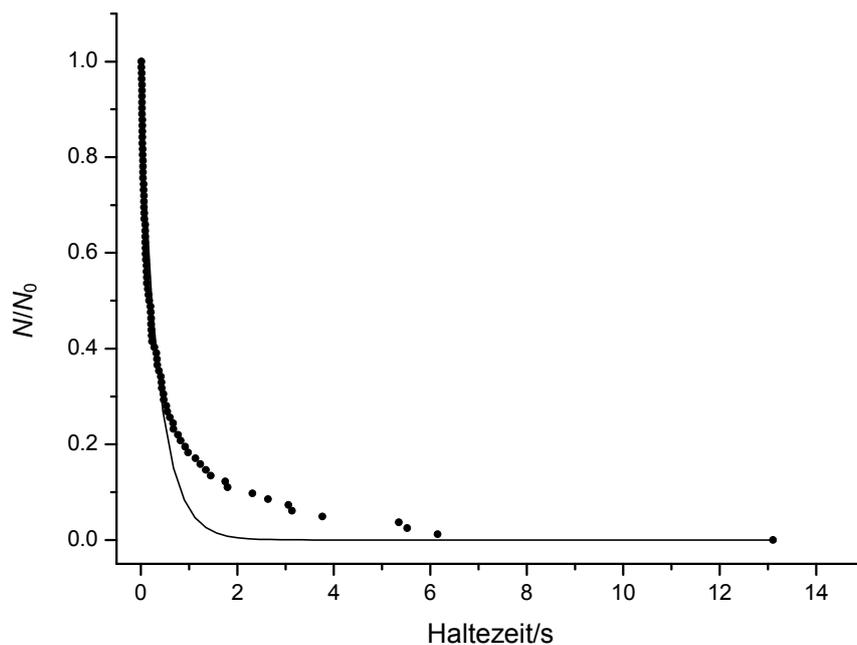
monoexponentiell:

Abb. 48. Monoexponentielle Kurvenanpassung an die Messwerte aus Abb. 43. Die erhaltenen Werte werden durch die Kurvenanpassung nur schlecht wiedergegeben.

Im Folgenden wurden die Haltekräfte gegen die natürlichen Logarithmen der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 grafisch aufgetragen (Abb. 49 und 50). Dazu wurden Regressionsgeraden durch die Datenpunkte gelegt. Aus der Steigung der Regressionsgeraden ist ersichtlich, dass der natürliche Logarithmus beider Geschwindigkeitskonstanten, sowohl k_1 als auch k_2 , im Mittel mit steigender Haltekraft zunimmt. Dieses Verhalten ist erwartet, da die Geschwindigkeitskonstanten sowohl bei steigender Temperatur als auch bei steigender Haltekraft zunehmen sollten; das bedeutet, dass der Bindungsriß bei steigender Haltekraft schneller erfolgen sollte.

Die Werte unterliegen dabei allerdings recht großen Schwankungen, dies ist möglicherweise (auch) auf Temperaturschwankungen während der Messungen zurückzuführen, da sämtliche Messungen ohne Temperaturregelung bei Zimmertemperatur durchgeführt wurden.

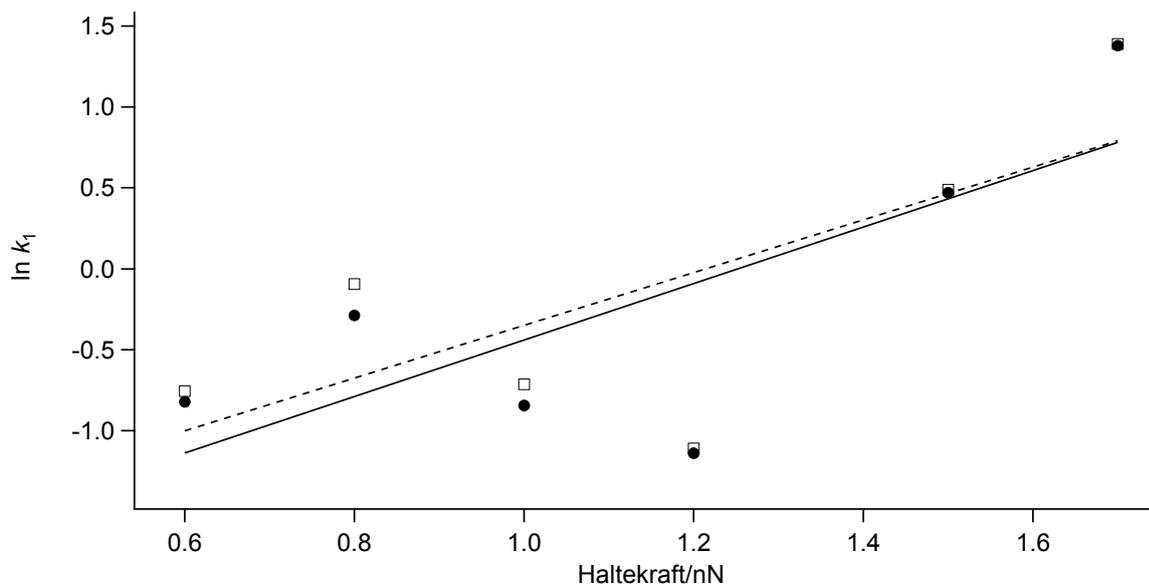


Abb. 49. Auftragung von $\ln k_1$ gegen die Haltekraft für sechs verschiedene Haltekräfte bei Zimmertemperatur (siehe Tab. 4). Quadrate/gestrichelte Linie: „Least Squares“-Kurvenanpassung, Punkte/durchgezogene Linie: „Maximum Likelihood“-Schätzverfahren.

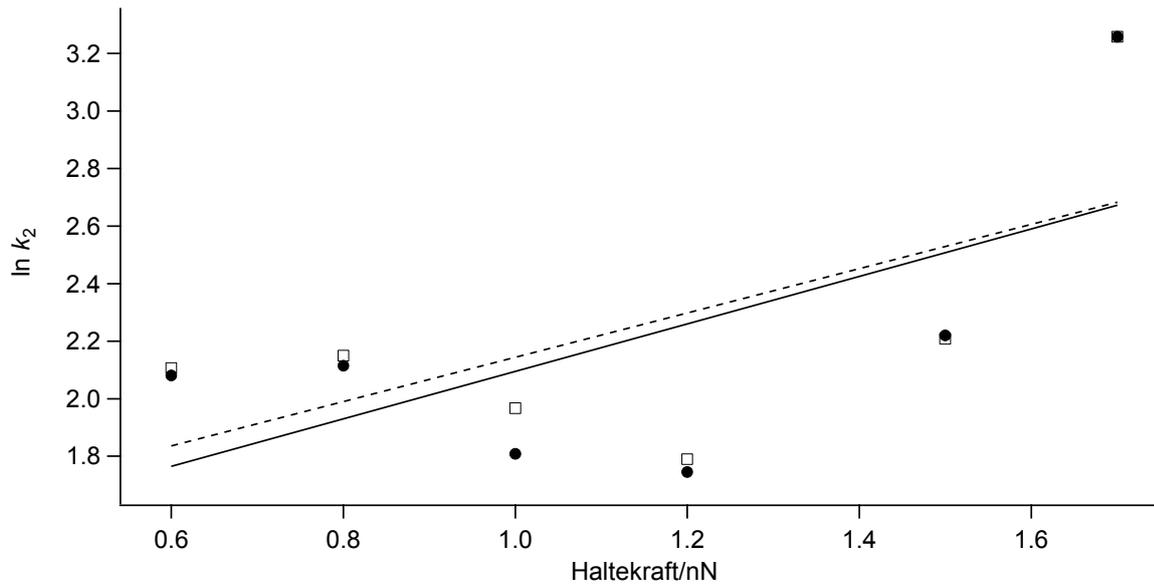


Abb. 50. Auftragung von $\ln k_2$ gegen die Haltekraft für sechs verschiedene Haltekraften bei Zimmertemperatur (siehe Tab. 4). Quadrate/gestrichelte Linie: „Least Squares“-Kurvenanpassung, Punkte/durchgezogene Linie: „Maximum Likelihood“.

Messungen bei 500 pN Haltekraft und Temperaturen von 35.0 °C, 40.0 °C, 45.0 °C, 50.0 °C:

35.0 °C:

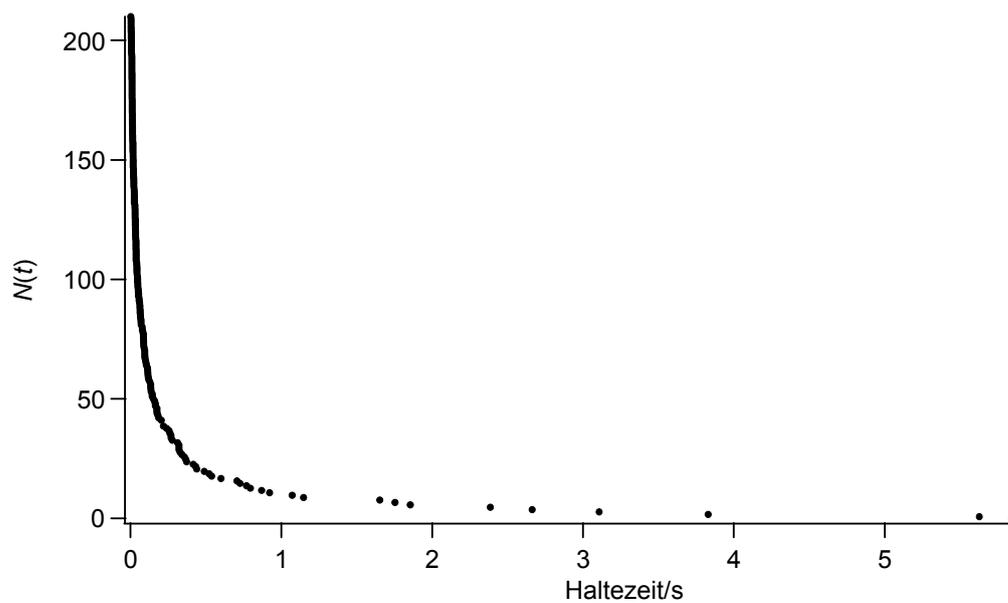


Abb. 51. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 500 pN Haltekraft und einer Temperatur von 35.0 °C. Federkonstante: 26.5 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

40.0 °C:

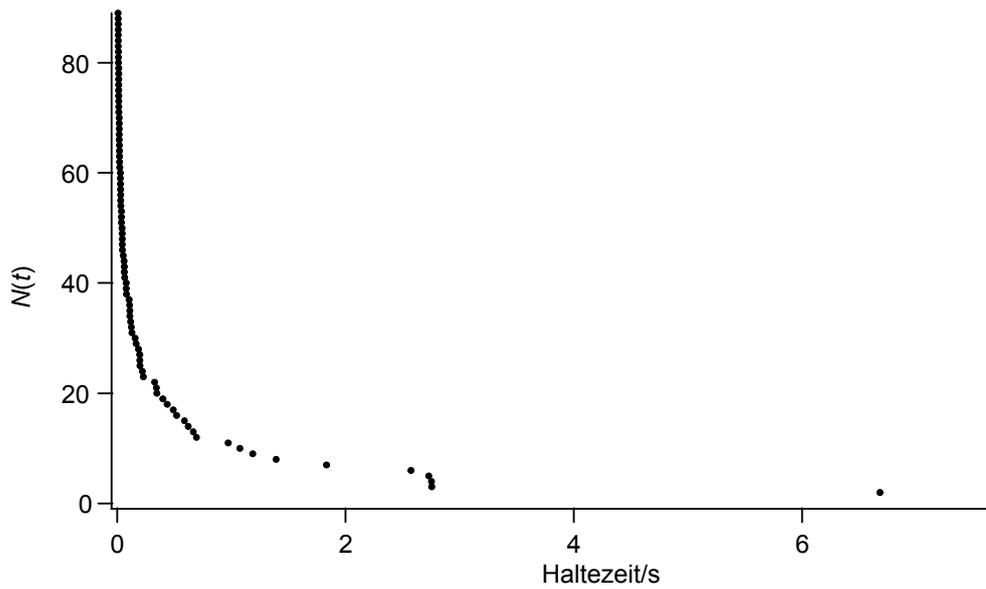


Abb. 52. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 500 pN Haltekraft und einer Temperatur von 40.0 °C. Federkonstante: 93.9 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

45.0 °C:

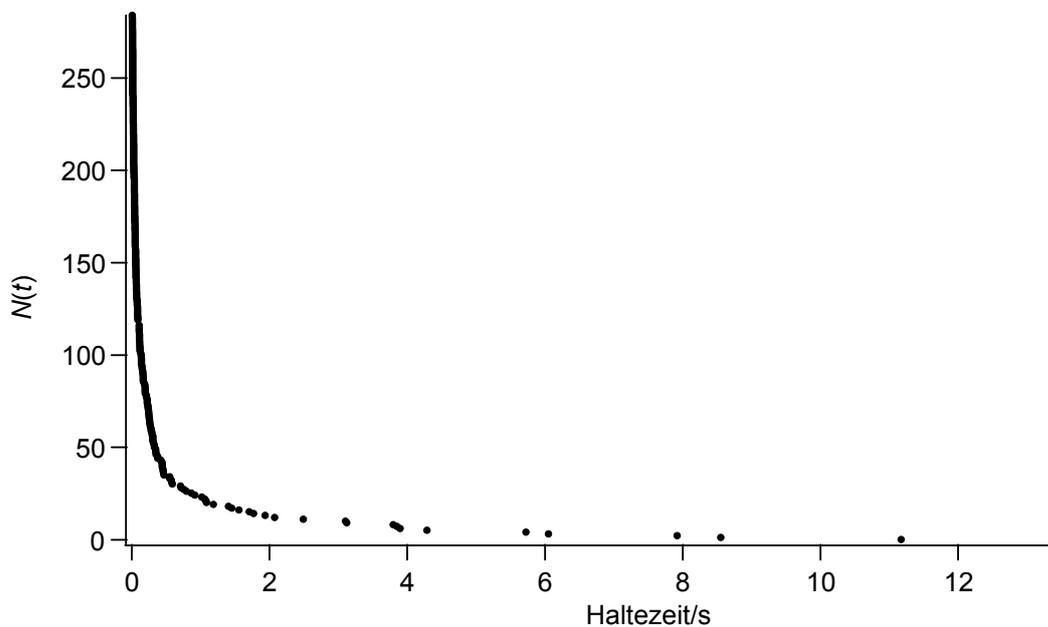


Abb. 53. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 500 pN Haltekraft und einer Temperatur von 45.0 °C. Federkonstante: 26.9 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

50.0 °C:

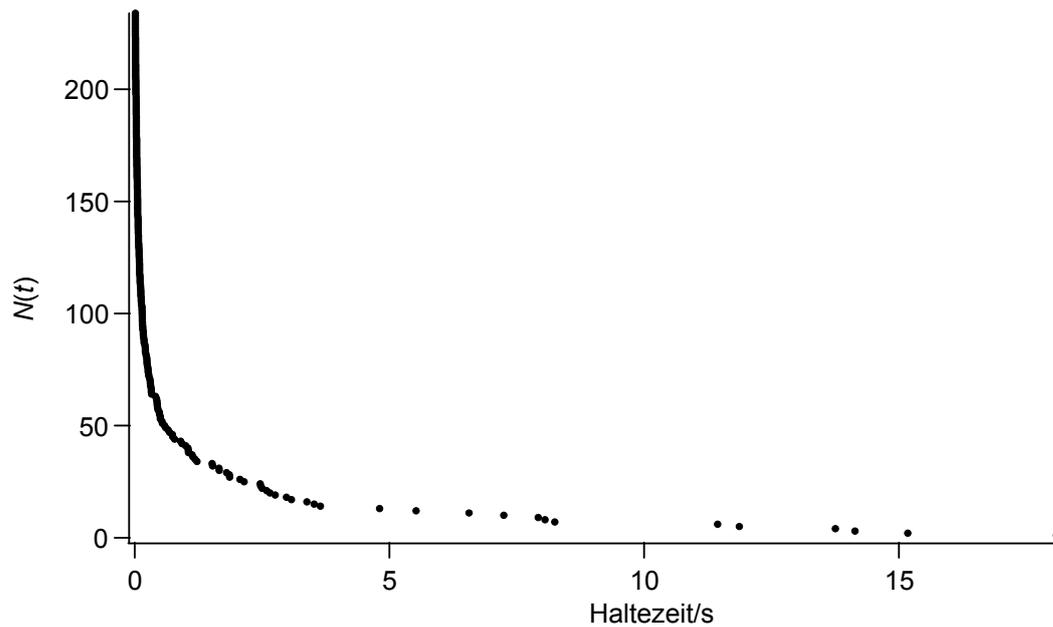


Abb. 54. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 500 pN Haltekraft und einer Temperatur von 50.0 °C. Federkonstanten: 28.8 pN/nm, 24.7 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

Übersicht aller temperaturgeregelten Messungen bei 500 pN Haltekraft:

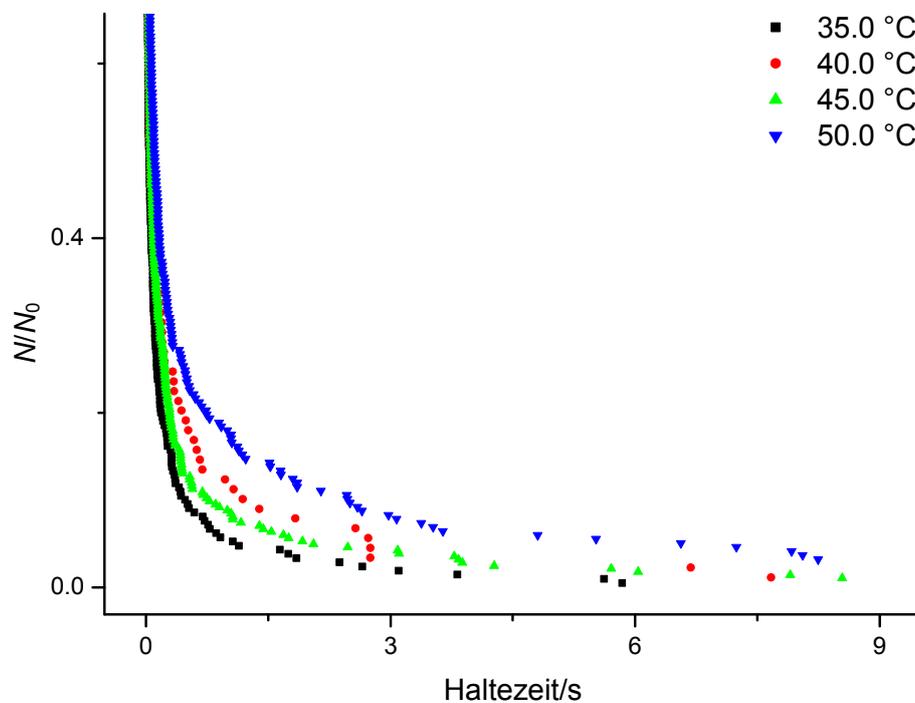


Abb. 55. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 500 pN Haltekraft und Temperaturen von 35.0 °C, 40.0 °C, 45.0 °C und 50.0 °C (Ausschnitt). Aus den Messdaten ist keine einfache temperaturabhängige Tendenz feststellbar.

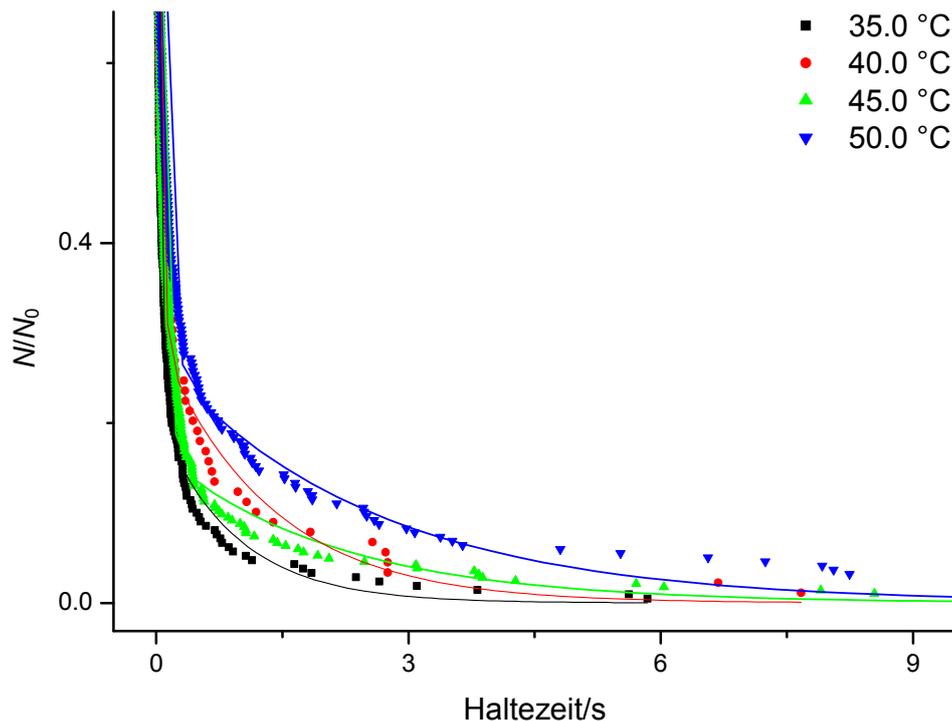


Abb. 56. Biexponentielle Kurvenanpassungen für die Messkurven aus Abb. 55 (ermittelte Geschwindigkeitskonstanten und Gewichtungsfaktoren siehe Tab. 5).

Tab. 5. Ergebnisse der biexponentiellen Kurvenanpassungen in „Origin“ und der „Maximum Likelihood“-Auswertungen bei 500 pN Haltekraft und vier verschiedenen Temperaturen. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung.

Temperatur/°C	k_1/s^{-1} (1)	k_2/s^{-1} (1)	AI (1)	k_1/s^{-1} (2)	k_2/s^{-1} (2)	AI (2)
35.0	1.01	19.2	0.21	1.11	21.4	0.21
40.0	0.71	19.0	0.30	0.76	20.5	0.30
45.0	0.43	10.7	0.16	0.47	13.3	0.17
50.0	0.30	9.58	0.27	0.39	11.0	0.27

Bei 500 pN erhält man einen monotonen Abfall sowohl von k_1 als auch von k_2 bei zunehmender Temperatur (Arrhenius-Diagramme siehe unten). k_2 ist dabei stets größer als k_1 . Erwartet wäre, dass die Geschwindigkeitskonstanten bei steigender Temperatur zunehmen sollten. Das umgekehrte Verhalten deutet darauf hin, dass bei 500 pN wahrscheinlich eine negative Aktivierungsbarriere vorliegt.

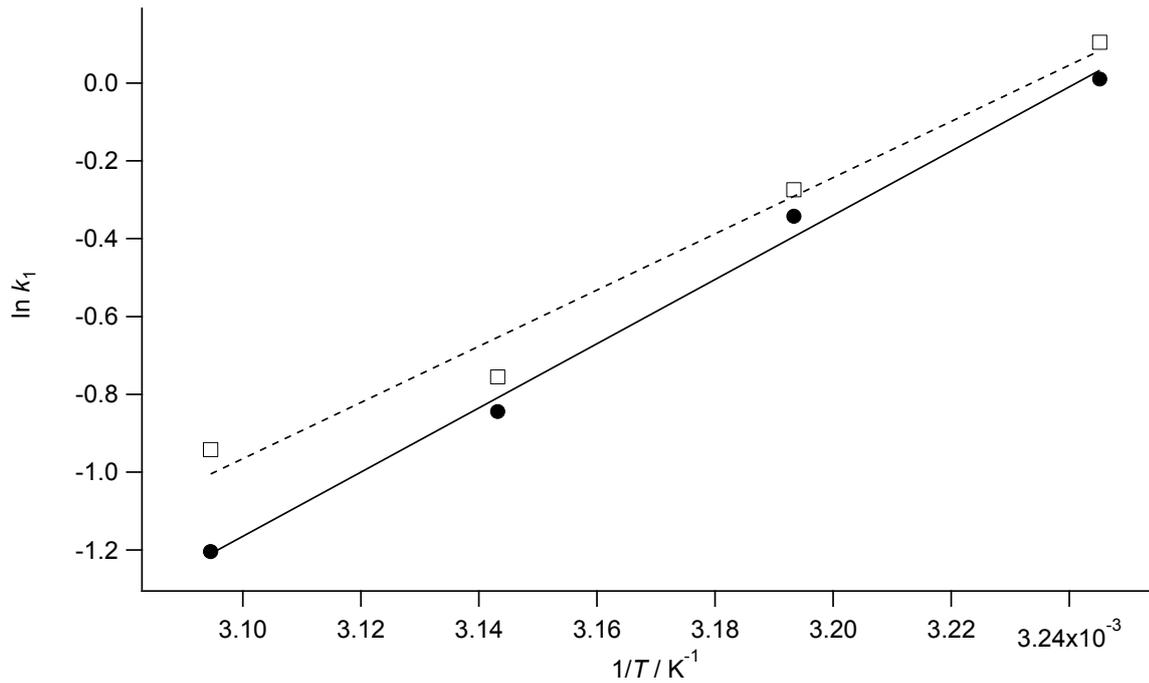


Abb. 57. Arrhenius-Auftragung für die k_1 -Werte bei vier verschiedenen Temperaturen (siehe Tab. 5). Quadrate/gestrichelte Linie: „Least Squares“-Kurvenanpassung, Punkte/durchgezogene Linie: „Maximum Likelihood“.

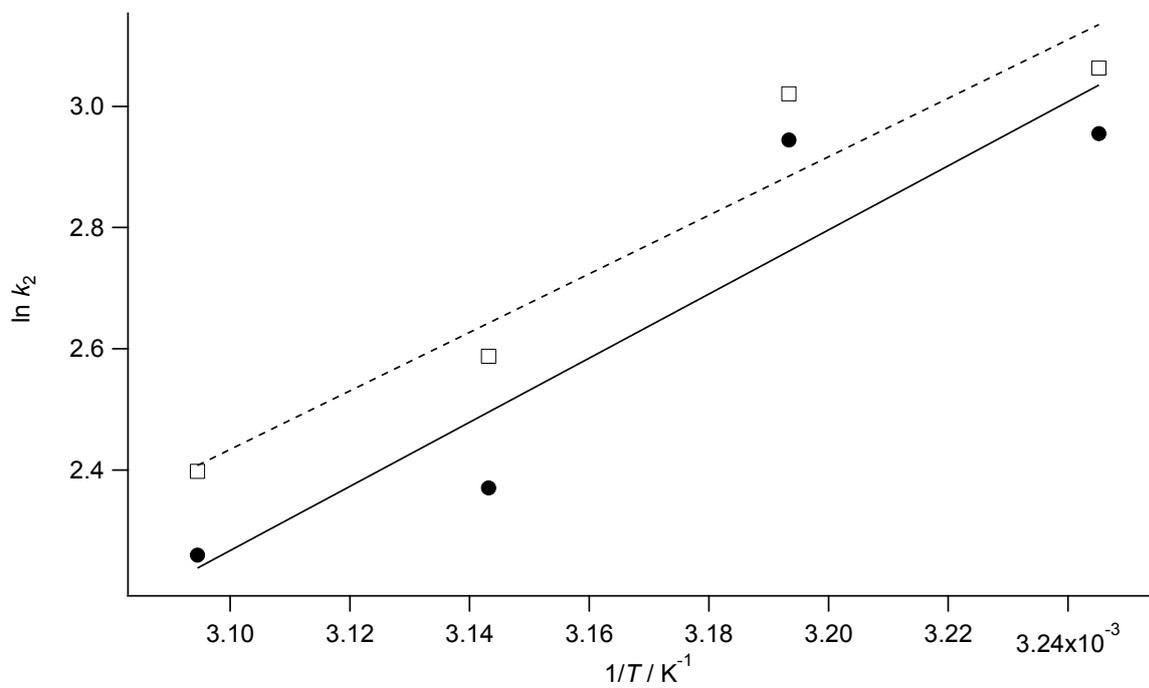


Abb. 58. Arrhenius-Auftragung für die k_2 -Werte bei vier verschiedenen Temperaturen (siehe Tab. 5). Quadrate/gestrichelte Linie: „Least Squares“-Kurvenanpassung, Punkte/durchgezogene Linie: „Maximum Likelihood“.

Tab. 6. Aktivierungsenergien E_a und Arrhenius-Faktoren A bei 500 pN Haltekraft und vier verschiedenen Temperaturen, ermittelt in „Igor Pro“. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung. (Übersicht der Parameter bei allen gemessenen Kräften siehe Tab. 11.)

k_n	E_a (1)/kJ mol ⁻¹	A (1)	E_a (2)/kJ mol ⁻¹	A (2)
k_1	-68.6 ± 3.50	$2.44 \cdot 10^{-12} \pm 3.30 \cdot 10^{-12}$	-60.0 ± 6.40	$7.31 \cdot 10^{-11} \pm 1.79 \cdot 10^{-10}$
k_2	-44.0 ± 12.4	$7.29 \cdot 10^{-7} \pm 3.45 \cdot 10^{-6}$	-40.1 ± 8.60	$3.61 \cdot 10^{-6} \pm 1.18 \cdot 10^{-5}$

Messungen bei 750 pN Haltekraft und Temperaturen von 30.0 °C, 35.0 °C, 40.0 °C, 45.0 °C, 50.0 °C:

30.0 °C:

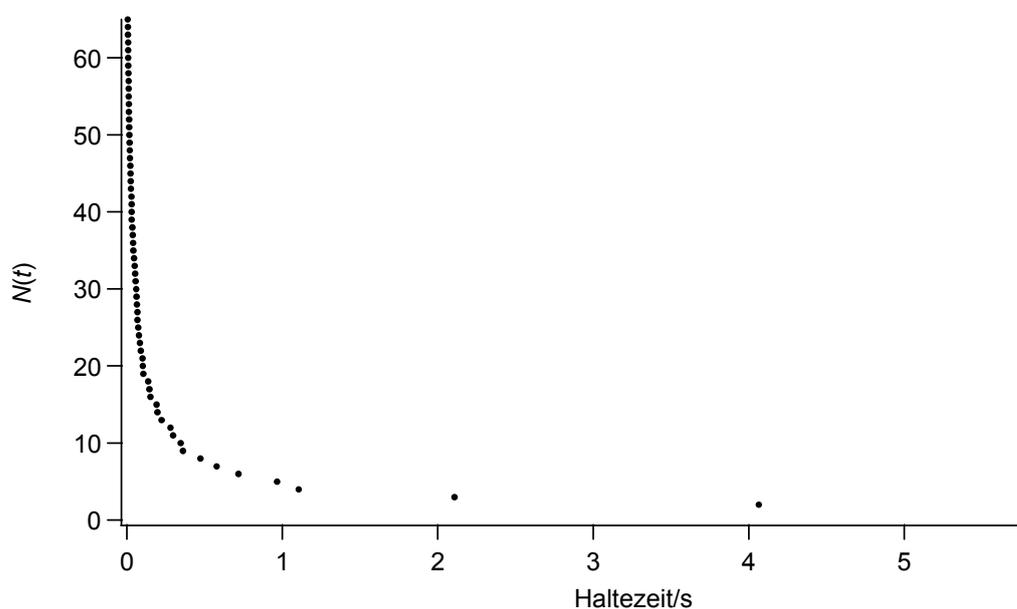


Abb. 59. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 750 pN Haltekraft und einer Temperatur von 30.0 °C. Federkonstante: 85.8 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

35.0 °C:

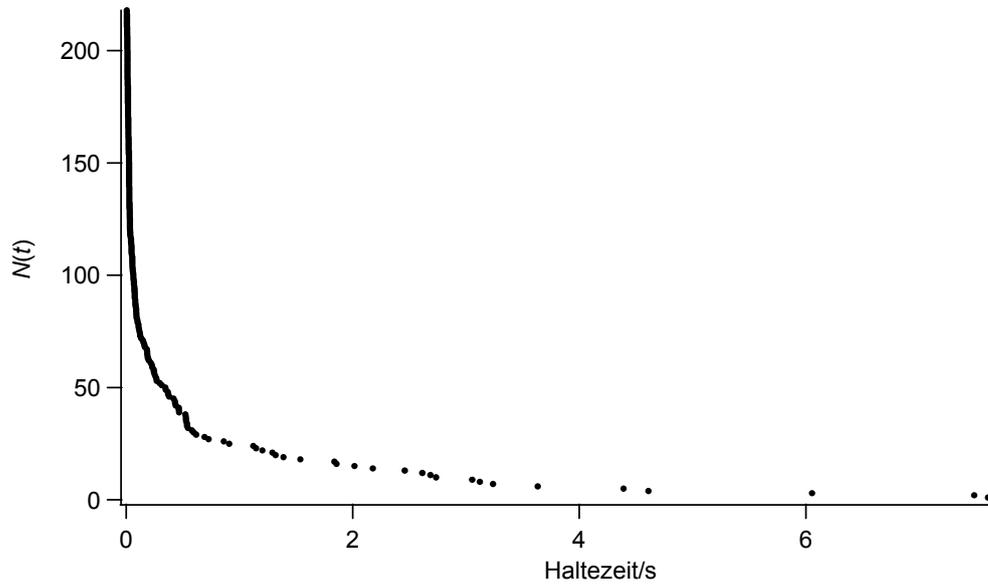


Abb. 60. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 750 pN Haltekraft und einer Temperatur von 35.0 °C. Federkonstante: 86.5 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

40.0 °C:

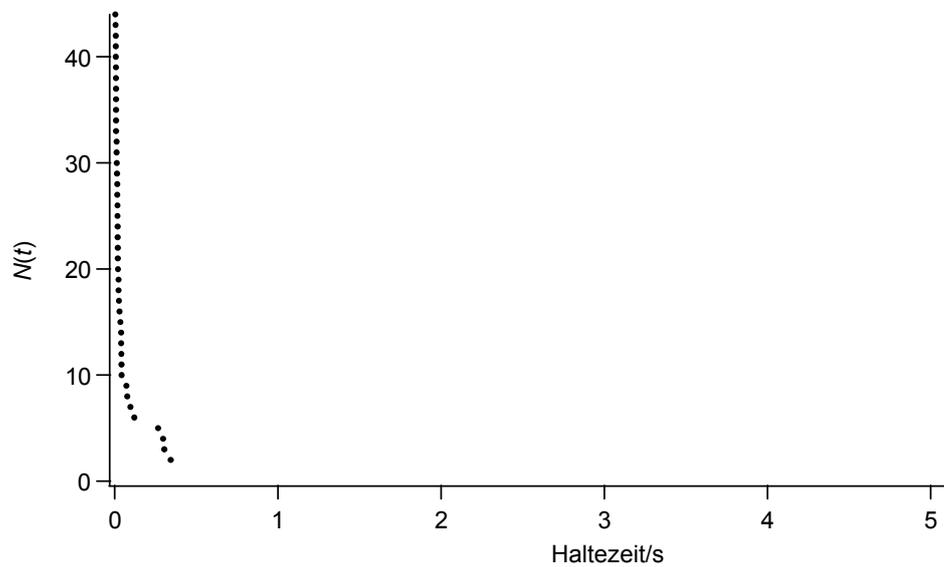


Abb. 61. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 750 pN Haltekraft und einer Temperatur von 40.0 °C. Federkonstante: 7.06 pN/nm (Veeco MLCT); Integral Gain = 3.

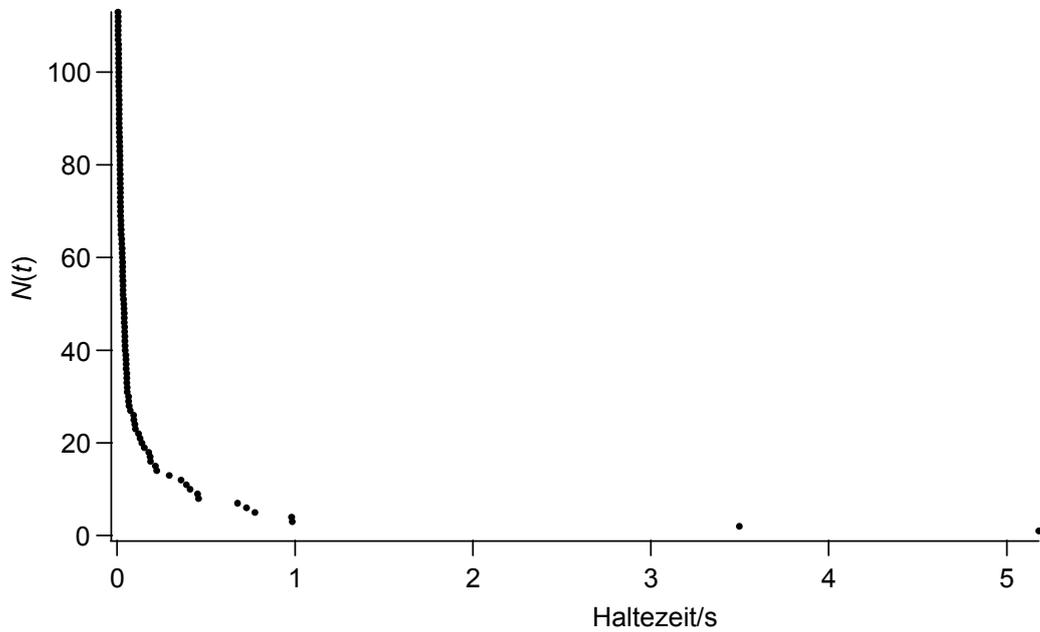
Vergleich Wasser/PBS-Puffer-Lösung bei 750 pN Haltekraft und $T = 45.0\text{ }^{\circ}\text{C}$:**Wasser:**

Abb. 62. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 750 pN Haltekraft und einer Temperatur von 45.0 °C. Federkonstante: 69.3 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

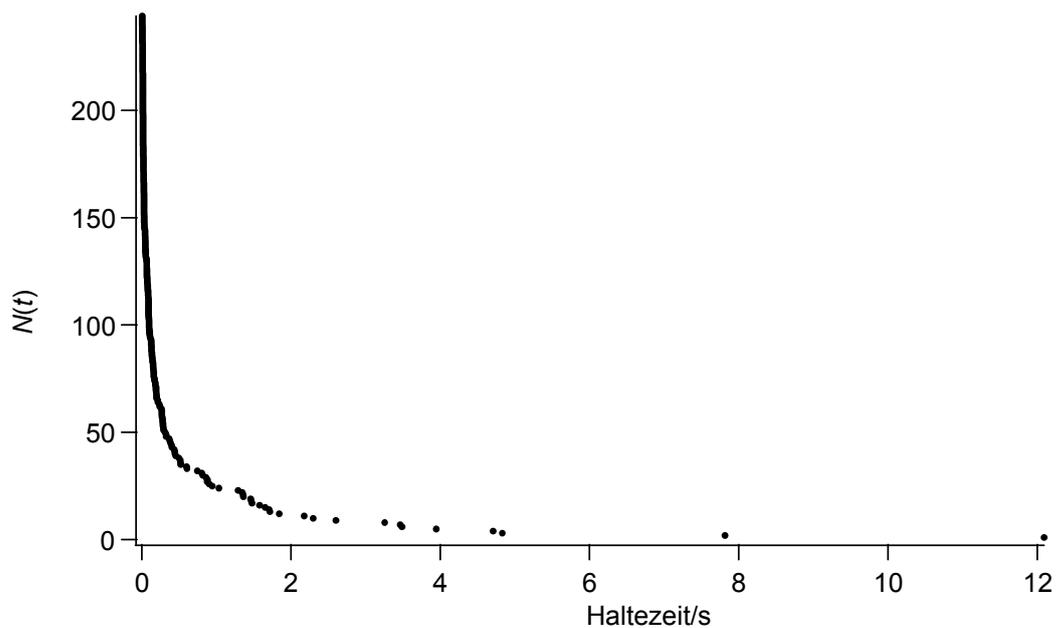
PBS-Puffer:

Abb. 63. Azobenzol/PEG-Silan in PBS-Puffer bei 750 pN Haltekraft und einer Temperatur von 45.0 °C. Federkonstante: 84.2 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

Vergleich der Messungen in Wasser/PBS-Puffer-Lösung bei 750 pN Haltekraft und $T = 45.0\text{ }^\circ\text{C}$:

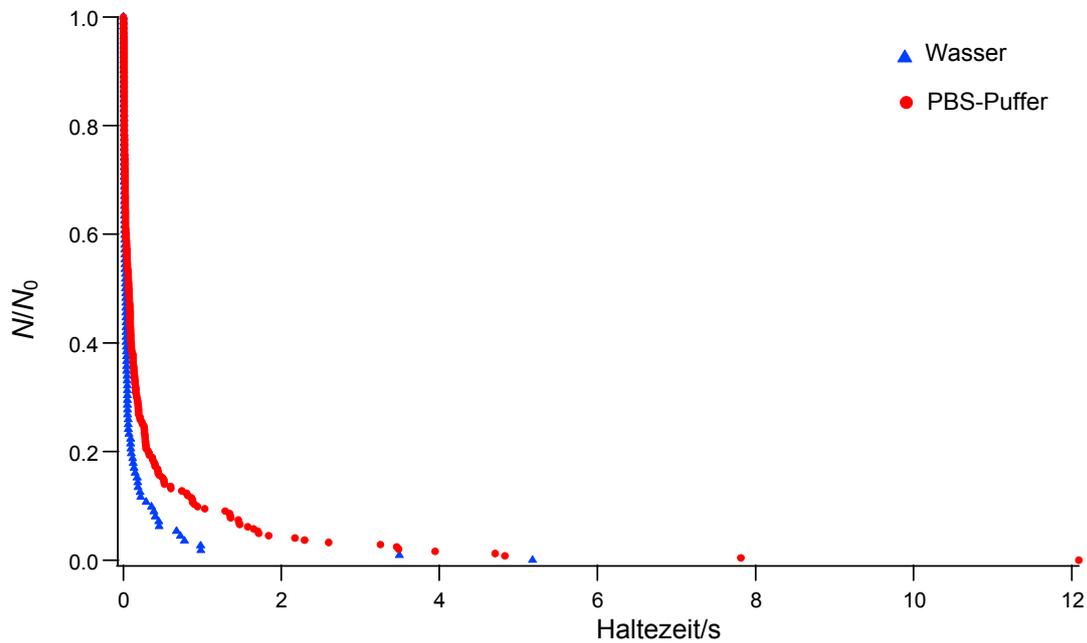


Abb. 64. Vergleich des Reaktionsmediums Wasser/wässr. PBS-Puffer in der Force-Clamp-Spektroskopie. Es zeigt sich, dass die Lebensdauer der Bindungen in der Pufferlösung größer ist.

50.0 °C:

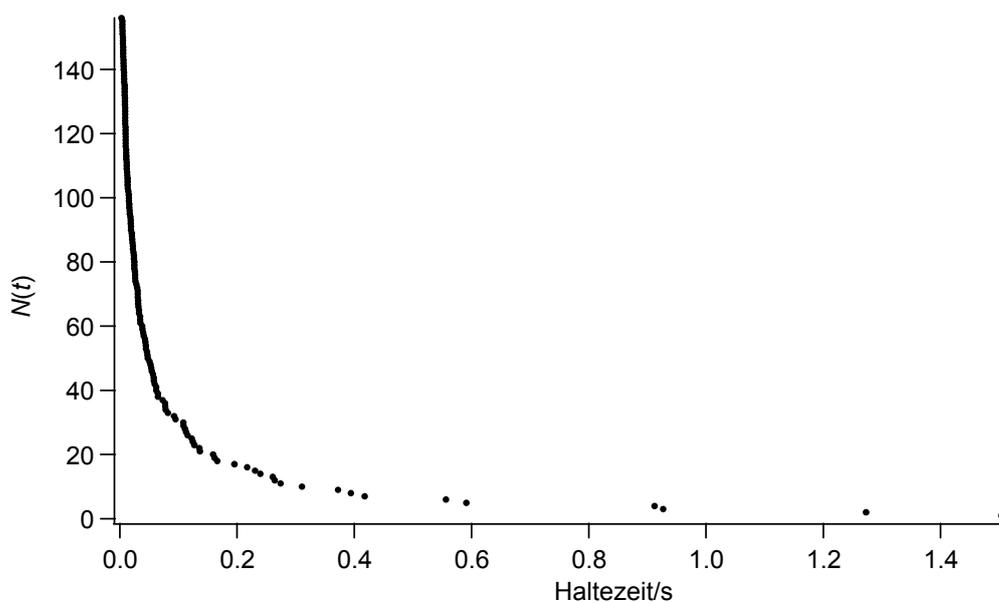


Abb. 65. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 750 pN Haltekraft und einer Temperatur von 50.0 °C. Federkonstante: 81.8 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

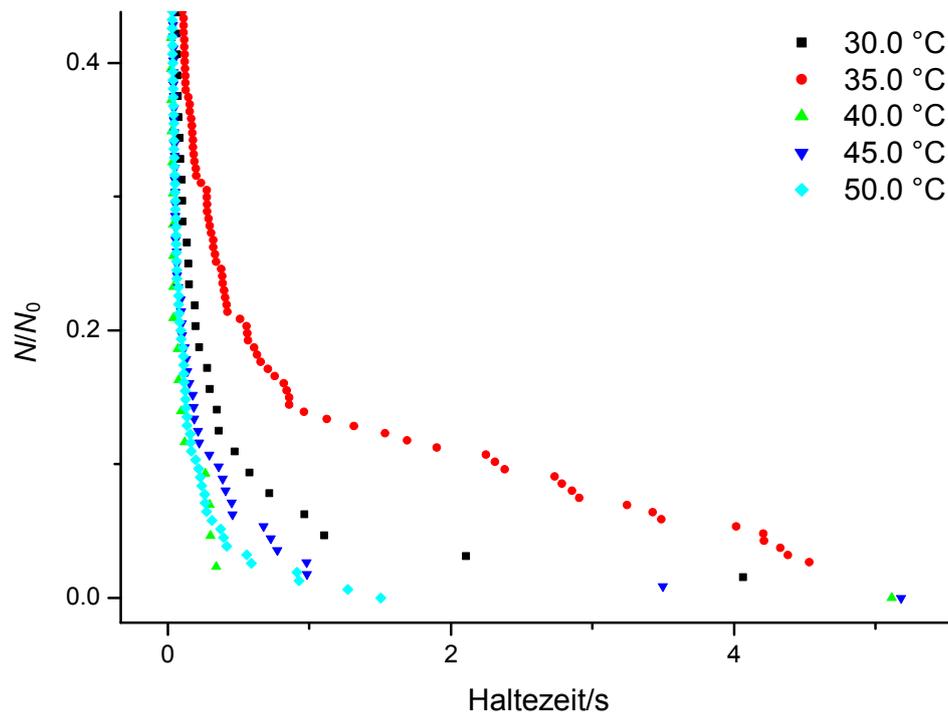
Übersicht aller temperaturgeregelten Messungen bei 750 pN Haltekraft:

Abb. 66. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 750 pN Haltekraft und Temperaturen von 30.0 °C, 35.0 °C, 40.0 °C, 45.0 °C und 50.0 °C (Ausschnitt). Aus den Messdaten ist keine einfache temperaturabhängige Tendenz feststellbar.

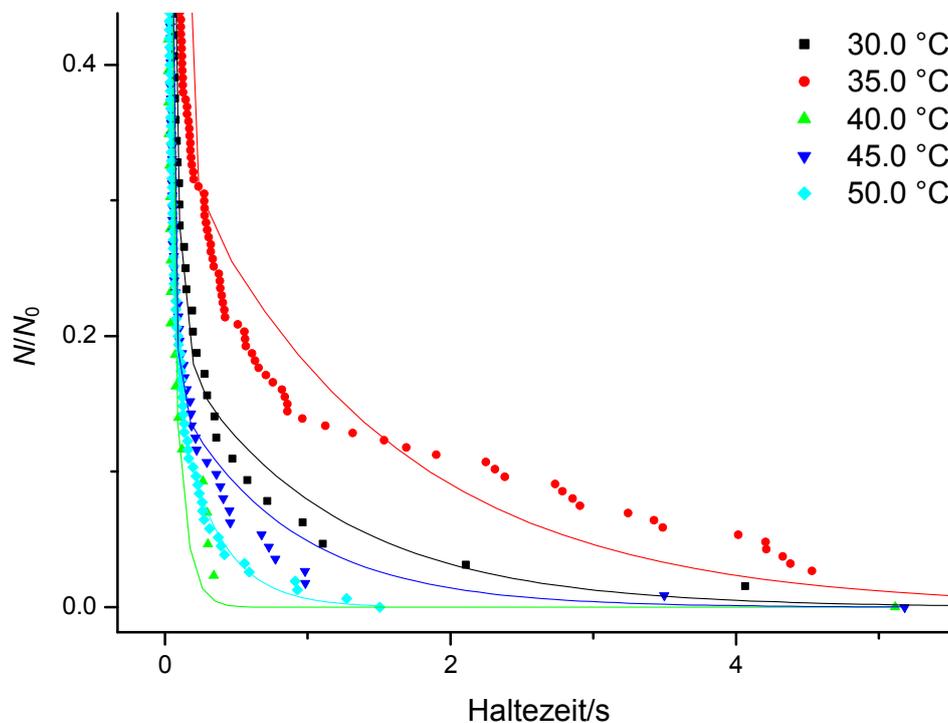


Abb. 67. Biexponentielle Kurvenanpassungen für die Messkurven aus Abb. 66 (ermittelte Geschwindigkeitskonstanten und Gewichtungsfaktoren siehe Tab. 7).

Tab. 7. Ergebnisse der biexponentiellen Kurvenanpassungen in „Origin“ und der „Maximum Likelihood“-Auswertungen bei 750 pN Haltekraft und fünf verschiedenen Temperaturen. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung.

Temperatur/°C	k_1/s^{-1} (1)	k_2/s^{-1} (1)	AI (1)	k_1/s^{-1} (2)	k_2/s^{-1} (2)	AI (2)
30.0	0.77	18.2	0.20	0.91	20.1	0.20
35.0	0.46	15.7	0.31	0.68	17.9	0.35
40.0	–	–	–	13.1	71.0	0.44
45.0	1.21	28.8	0.17	1.23	33.0	0.17
50.0	34.3	3.10	0.80	34.6	3.43	0.81

Bei 750 pN Haltekraft zeigt sich keine einfache Tendenz in den Geschwindigkeitskonstanten und den Gewichtungsfaktoren. Bis auf die Ausnahme bei 50.0 °C ist k_2 stets größer als k_1 . Wohl wegen zu geringer Anzahl an Messwerten, v. a. bei langen Haltezeiten, ließen sich mit der „Maximum Likelihood“-Auswertung keine Ergebnisse bei 40.0 °C erhalten, und auch die k -Werte mit dem „Least Squares“-Verfahren sind hier wahrscheinlich zu hoch.

Eine Arrhenius-Auftragung der k_1 -Werte zeigt eine Regressionsgerade mit erwartungsgemäß negativer Steigung, wenngleich die Schwankungen in den k -Werten trotz Temperaturregelung auch hier recht stark sind (Abb. 68).

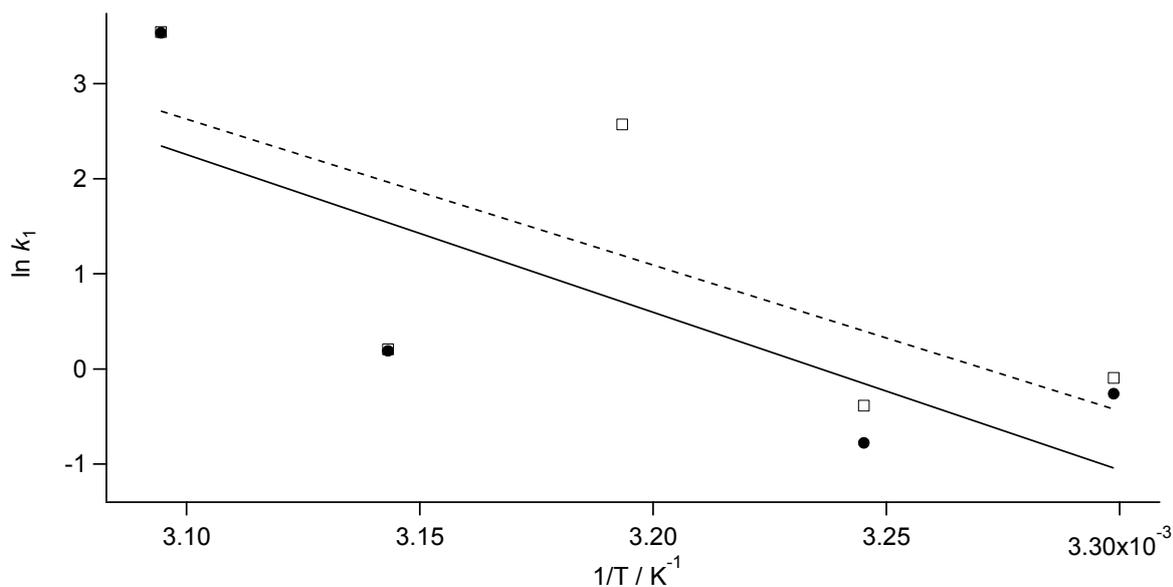


Abb. 68. Arrhenius-Auftragung für die k_1 -Werte bei fünf verschiedenen Temperaturen (siehe Tab. 7). Quadrate/gestrichelte Linie: „Least Squares“-Kurvenanpassung, Punkte/durchgezogene Linie: „Maximum Likelihood“.

Die Arrhenius-Auftragung der k_2 -Werte ergibt, wie schon bei 500 pN Haltekraft, für beide Auswertungsverfahren eine positive Steigung (siehe Abb. 69), d. h., der Prozess, dem k_2 zuzuordnen ist, verläuft mit zunehmender Temperatur langsamer.

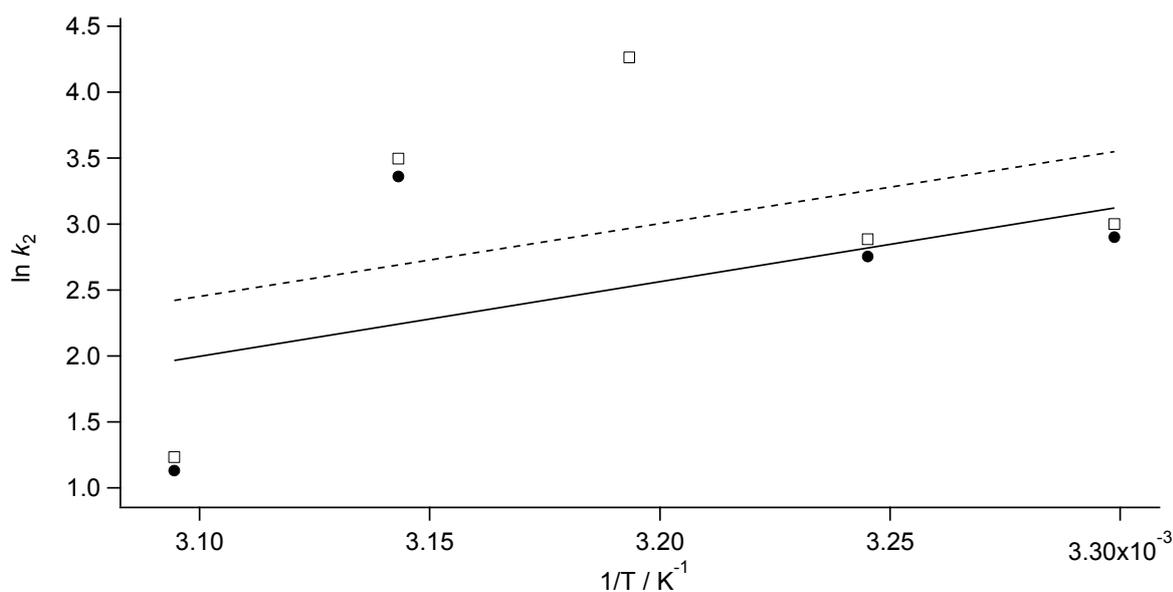


Abb. 69. Arrhenius-Auftragung für die k_2 -Werte bei fünf verschiedenen Temperaturen (siehe Tab. 7). Quadrate/gestrichelte Linie: „Least Squares“-Kurvenanpassung, Punkte/durchgezogene Linie: „Maximum Likelihood“.

Tab. 8. Aktivierungsenergien E_a und Arrhenius-Faktoren A bei 750 pN Haltekraft und fünf verschiedenen Temperaturen, ermittelt in „Igor Pro“. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung. (Übersicht der Parameter bei allen gemessenen Kräften siehe Tab. 11.)

k_n	$E_a(1)/\text{kJ mol}^{-1}$	$A(1)$	$E_a(2)/\text{kJ mol}^{-1}$	$A(2)$
k_1	137.9 ± 75.0	$2.06 \cdot 10^{23} \pm 5.94 \cdot 10^{24}$	127.7 ± 75.2	$6.51 \cdot 10^{21} \pm 1.88 \cdot 10^{23}$
k_2	-47.0 ± 51.5	$1.82 \cdot 10^{-7} \pm 3.60 \cdot 10^{-6}$	-46.0 ± 60.8	$4.17 \cdot 10^{-7} \pm 9.76 \cdot 10^{-6}$

Kontrollmessung ohne Zugabe von Azobenzol:

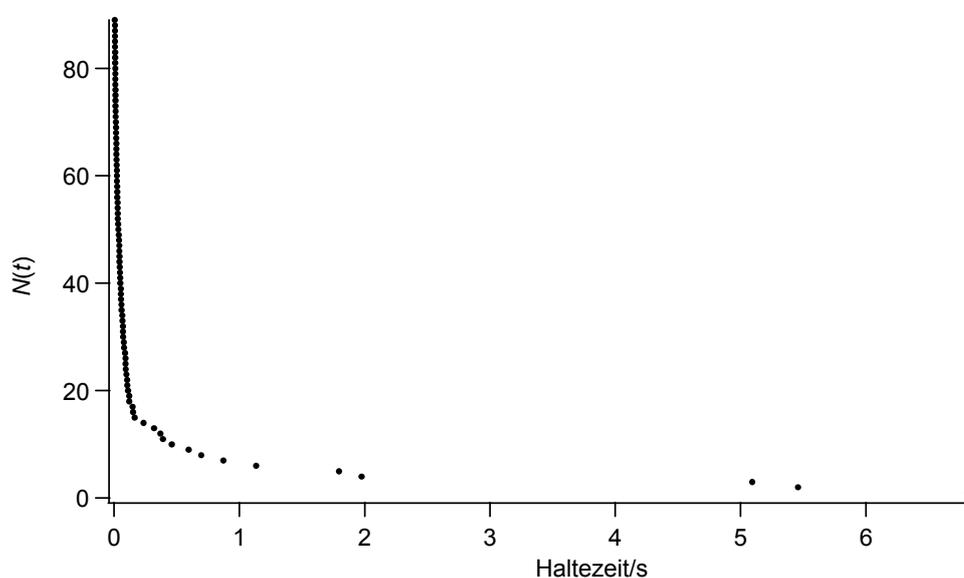


Abb. 70. Force-Clamp-Messungen mit PEG-Silan-beschichtetem Glas-Objektträger und Cantilever mit Zugabe von EDC/NHS in Wasser, ohne Zugabe von Azobenzol. Messparameter: 750 pN Haltekraft, $T = 35$ °C. Federkonstante: 77.8 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3. Man erhält scheinbar Anbindungen auch ohne Azobenzol-Zugabe (Interpretation siehe Ende des Abschnitts, Seite 78).

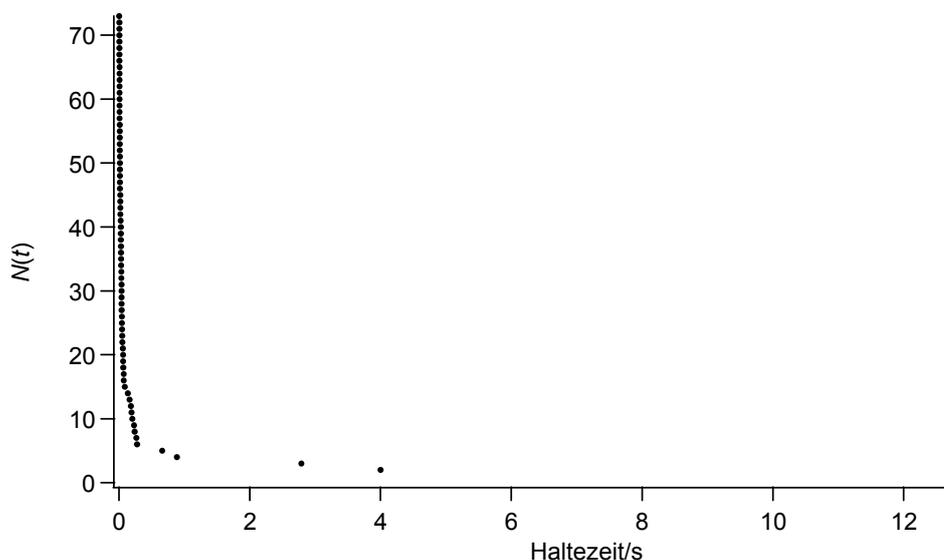
Kontrollmessung ohne Zugabe von Azobenzol und EDC/NHS:

Abb. 71. Force-Clamp-Messungen mit PEG-Silan-beschichtetem Glas-Objektträger und Cantilever ohne Zugabe von EDC, NHS oder Azobenzol. Messparameter: 1.00 nN Haltekraft, $T = 40\text{ °C}$. Federkonstante: 84.7 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3. Auch ohne EDC/NHS/Azobenzol erhält man scheinbar Anbindungen (Interpretation siehe Ende des Abschnitts, Seite 78).

Messungen bei 1.00 nN Haltekraft und Temperaturen von 35.0 °C, 40.0 °C, 45.0 °C, 50.0 °C:

35.0 °C:

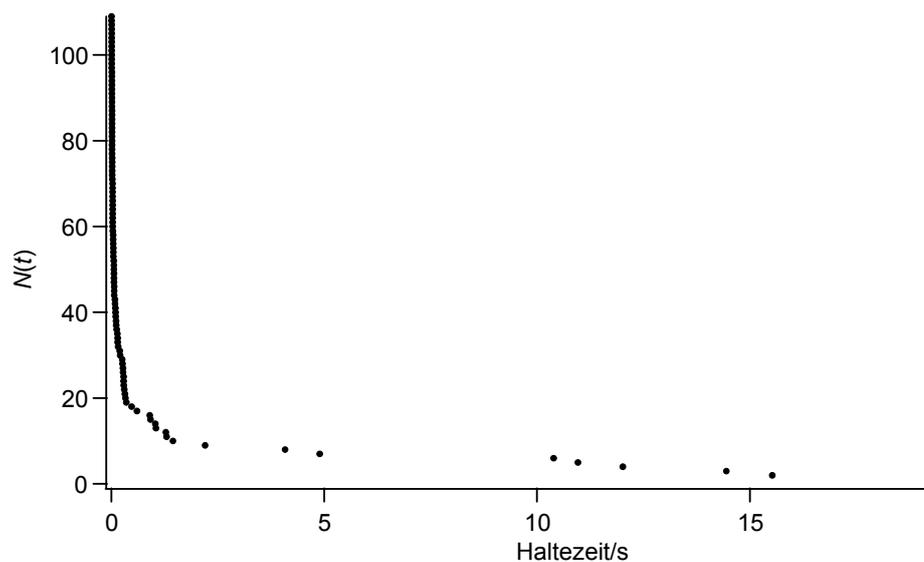


Abb. 72. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 1.00 nN Haltekraft und einer Temperatur von 35.0 °C. Federkonstanten: 86.9 pN/nm, 87.3 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

40.0 °C:

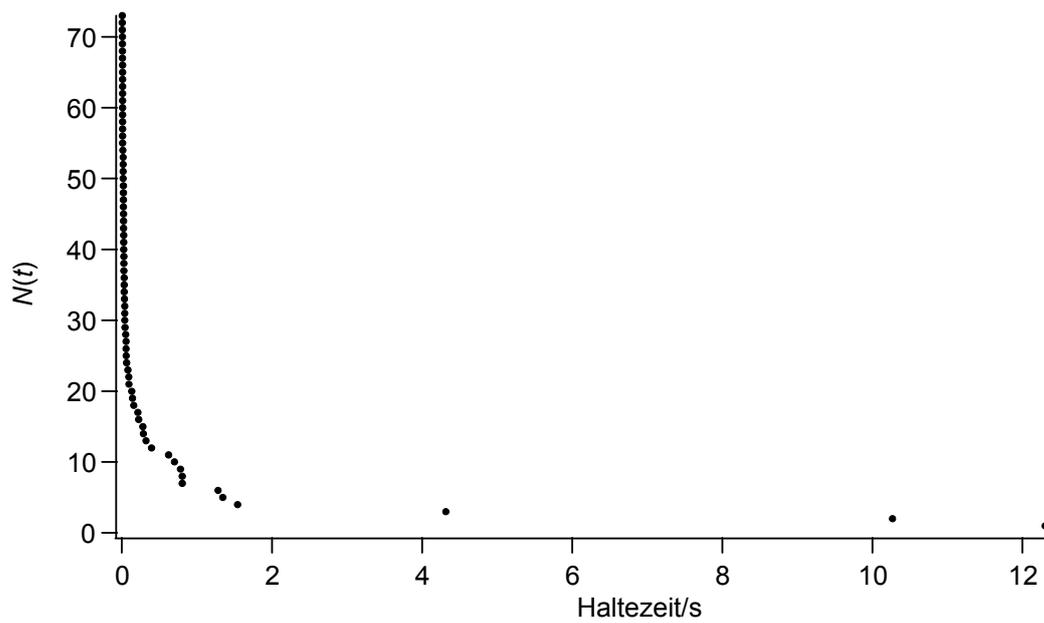


Abb. 73. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 1.00 nN Haltekraft und einer Temperatur von 40.0 °C. Federkonstante: 89.5 pN/nm, 84.7 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

45.0 °C:

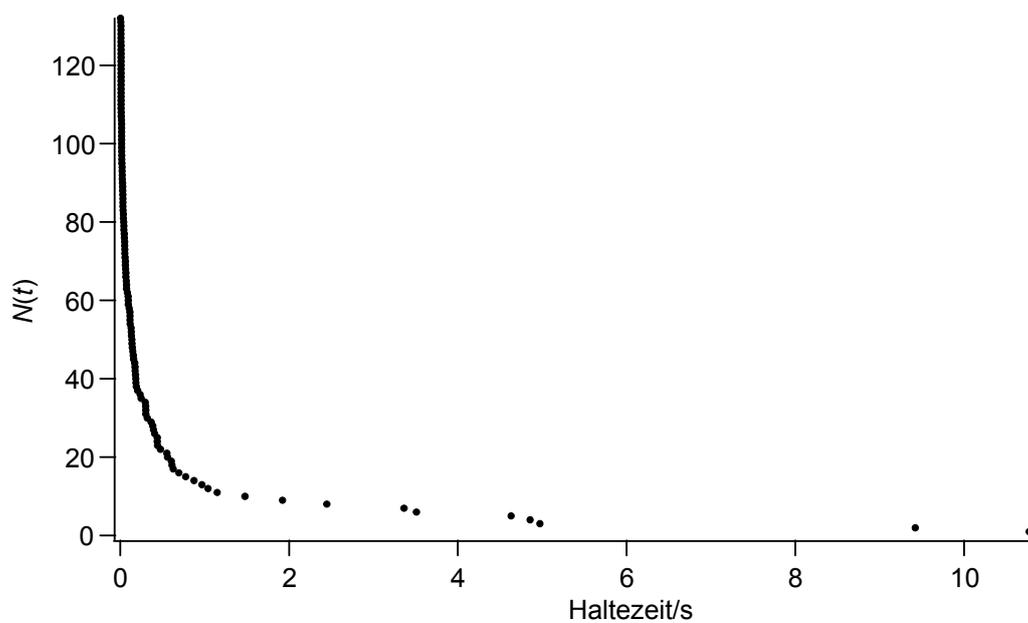


Abb. 74. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 1.00 nN Haltekraft und einer Temperatur von 45.0 °C. Federkonstante: 83.7 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

50.0 °C:

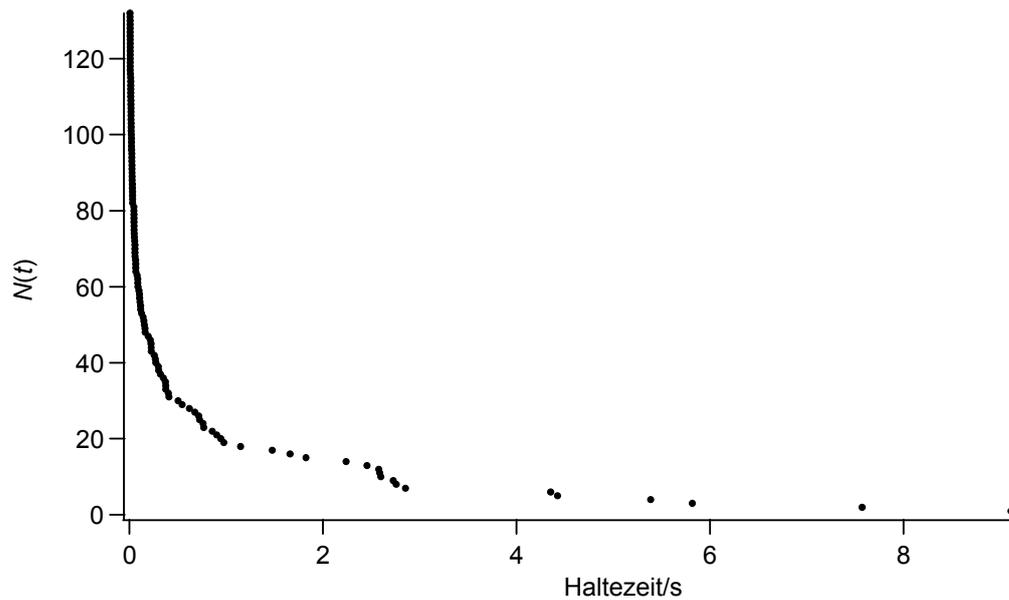


Abb. 75. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 1.00 nN Haltekraft und einer Temperatur von 50.0 °C. Federkonstanten: 24.7 pN/nm, 82.8 pN/nm (Olympus TR400PSA); Integral Gain = 3.

Übersicht aller temperaturgeregelten Messungen bei 1.00 nN Haltekraft:

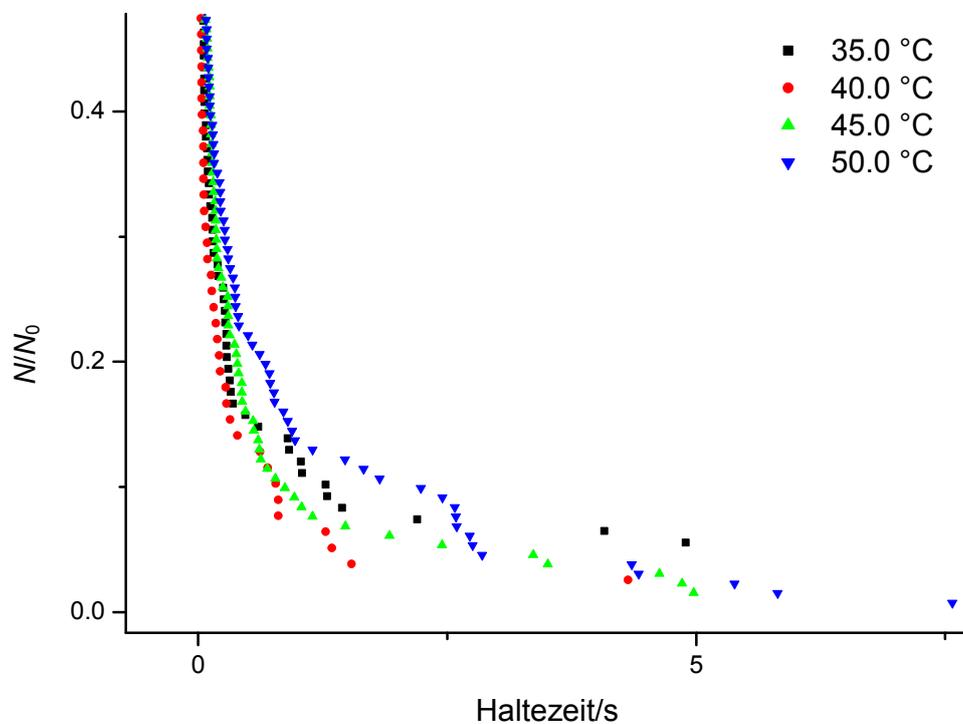


Abb. 76. Azobenzol/PEG-Silan in Wasser bei 1.00 nN Haltekraft und Temperaturen von 35.0 °C, 40.0 °C, 45.0 °C und 50.0 °C (Ausschnitt). Aus den Messdaten ist keine einfache temperaturabhängige Tendenz feststellbar.

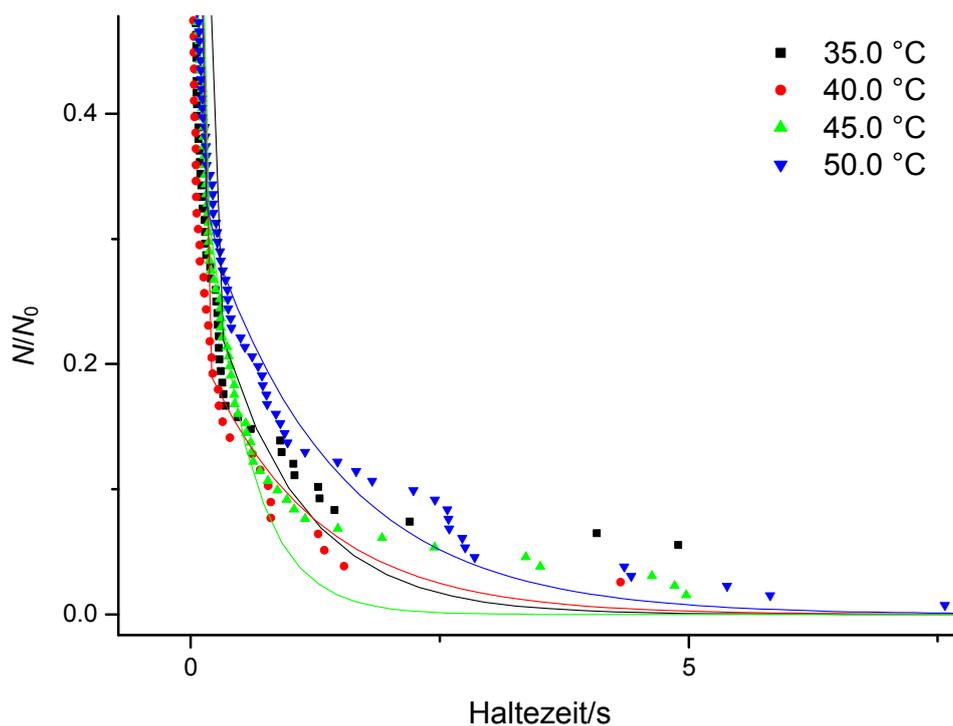


Abb. 77. Biexponentielle Kurvenanpassungen für die Messkurven aus Abb. 76 (ermittelte Geschwindigkeitskonstanten und Gewichtungsfaktoren siehe Tab. 9).

Tab. 9. Ergebnisse der biexponentiellen Kurvenanpassungen in „Origin“ und der „Maximum Likelihood“-Auswertungen bei 1.00 nN Haltekraft und vier verschiedenen Temperaturen. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung.

Temperatur/°C	k_1/s^{-1} (1)	k_2/s^{-1} (1)	AI (1)	k_1/s^{-1} (2)	k_2/s^{-1} (2)	AI (2)
35.0	0.19	14.4	0.18	1.18	31.9	0.32
40.0	0.52	29.5	0.24	0.89	33.4	0.23
45.0	0.55	13.2	0.25	2.33	28.8	0.48
50.0	0.62	19.7	0.36	0.77	22.5	0.35

Man erhält auch bei 1.00 nN Haltekraft keine eindeutige Temperaturtendenz. Die Werte von k_2 liegen auch hier stets über den Werten von k_1 . Die Gewichtungsfaktoren AI weisen bei 35.0 °C und 45.0 °C bei beiden Auswertemethoden eine vergleichsweise große Abweichung voneinander auf. Auch der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 zeigt zwi-

schen beiden Analyseverfahren eine z. T. deutliche Abweichung. Dementsprechend wird in den Arrhenius-Diagrammen (Abb. 78 und 79) für das „Least Squares“-Verfahren jeweils eine positive und für das „Maximum Likelihood“-Verfahren jeweils eine negative Steigung erhalten. Die Wertestreuung ist insbesondere für die k_2 -Werte, die nach dem „Maximum Likelihood“-Verfahren berechnet wurden, recht groß.

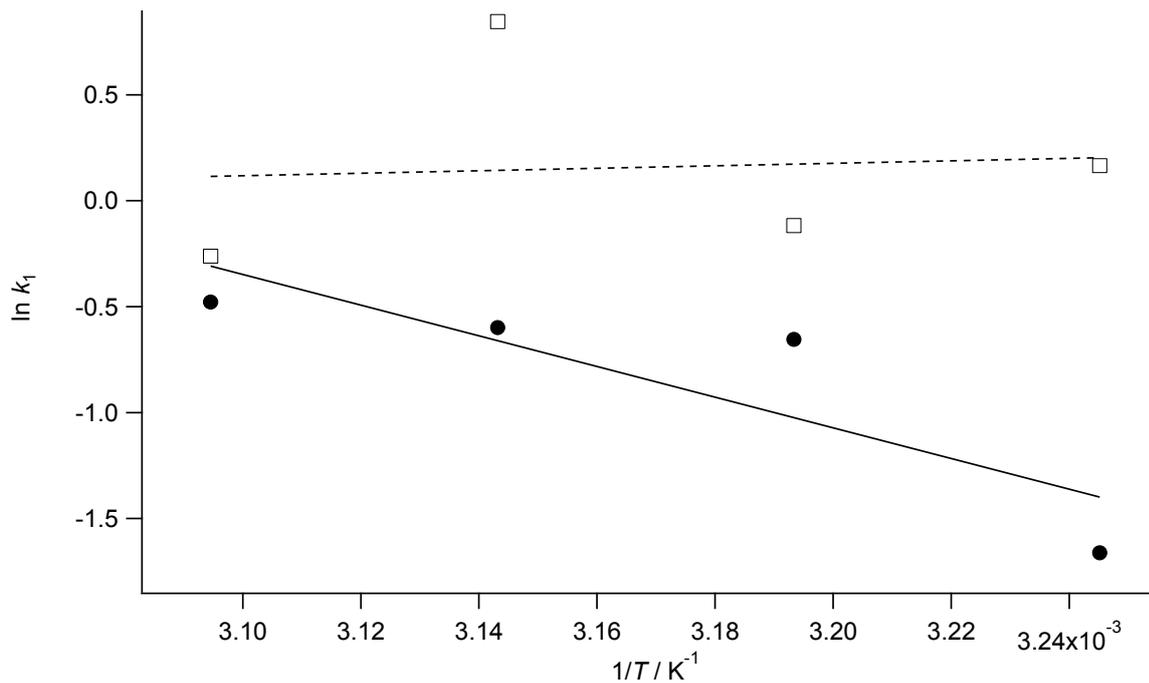


Abb. 78. Arrhenius-Auftragung für die k_1 -Werte bei vier verschiedenen Temperaturen (siehe Tab. 9). Quadrate/gestrichelte Linie: „Least Squares“-Kurvenanpassung, Punkte/durchgezogene Linie: „Maximum Likelihood“.

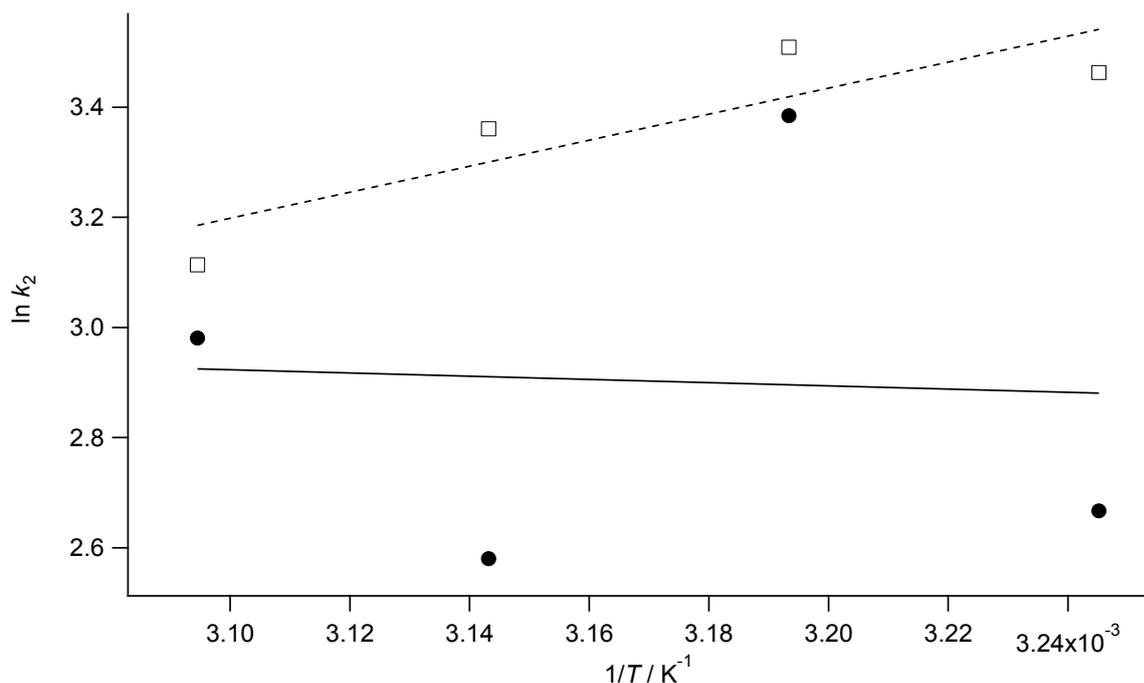


Abb. 79. Arrhenius-Auftragung für die k_2 -Werte bei vier verschiedenen Temperaturen (siehe Tab. 9). Quadrate/gestrichelte Linie: „Least Squares“-Kurvenanpassung, Punkte/durchgezogene Linie: „Maximum Likelihood“.

Tab. 10. Aktivierungsenergien E_a und Arrhenius-Faktoren A bei 1.00 nN Haltekraft und vier verschiedenen Temperaturen, ermittelt in „Igor Pro“. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung. (Übersicht der Parameter bei allen gemessenen Kräften siehe Tab. 11.)

k_n	E_a (1)/kJ mol ⁻¹	A (1)	E_a (2)/kJ mol ⁻¹	A (2)
k_1	60.1 ± 25.5	$3.86 \cdot 10^9 \pm 3.76 \cdot 10^{10}$	-4.84 ± 44.4	0.18 ± 3.12
k_2	2.42 ± 33.0	45.9 ± 578.8	-19.6 ± 7.94	$1.62 \cdot 10^{-2} \pm 4.90 \cdot 10^{-2}$

Übersicht aller Arrhenius-Parameter:**Tab. 11.** Aktivierungsenergien E_a und Arrhenius-Faktoren A bei Haltekräften von 500 pN, 750 pN und 1.00 nN, ermittelt in „Igor Pro“. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung.

k_n	E_a (1)/kJ mol ⁻¹	A (1)	E_a (2)/kJ mol ⁻¹	A (2)
k_1 (500 pN)	-68.6 ± 3.50	$2.44 \cdot 10^{-12} \pm 3.30 \cdot 10^{-12}$	-60.0 ± 6.40	$7.31 \cdot 10^{-11} \pm 1.79 \cdot 10^{-10}$
k_2 (500 pN)	-44.0 ± 12.4	$7.29 \cdot 10^{-7} \pm 3.45 \cdot 10^{-6}$	-40.1 ± 8.60	$3.61 \cdot 10^{-6} \pm 1.18 \cdot 10^{-5}$
k_1 (750 pN)	137.9 ± 75.0	$2.06 \cdot 10^{23} \pm 5.94 \cdot 10^{24}$	127.7 ± 75.2	$6.51 \cdot 10^{21} \pm 1.88 \cdot 10^{23}$
k_2 (750 pN)	-47.0 ± 51.5	$1.82 \cdot 10^{-7} \pm 3.60 \cdot 10^{-6}$	-46.0 ± 60.8	$4.17 \cdot 10^{-7} \pm 9.76 \cdot 10^{-6}$
k_1 (1.00 nN)	60.1 ± 25.5	$3.86 \cdot 10^9 \pm 3.76 \cdot 10^{10}$	-4.84 ± 44.4	0.18 ± 3.12
k_2 (1.00 nN)	2.42 ± 33.0	45.9 ± 578.8	-19.6 ± 7.94	$1.62 \cdot 10^{-2} \pm 4.90 \cdot 10^{-2}$

Es zeigt sich, dass die Messergebnisse im zeitlichen Verlauf der Messung eine Verschiebung hin zu kurzlebigeren molekularen Spezies erfahren, d. h., es werden in Mittel zuerst die langlebigeren Bindungen gebrochen, dann erst die kurzlebigeren (siehe Abb. 80, Tab. 12). Dieses Verhalten konnte für mehrere Messreihen bei unterschiedlichen Haltekräften und Temperaturen, sowohl in PBS-Puffer als auch in Wasser, für das Azobenzol-/PEG-Silan-System beobachtet werden, und das Ergebnis widerspricht anscheinend dessen, was eigentlich zu erwarten wäre: Zunächst sollten nämlich die kurzlebigeren Bindungen gebrochen werden. Beim CMA-/DETA-System ist die Tendenz genau umgekehrt (siehe Abschn. 2.4.3.2).

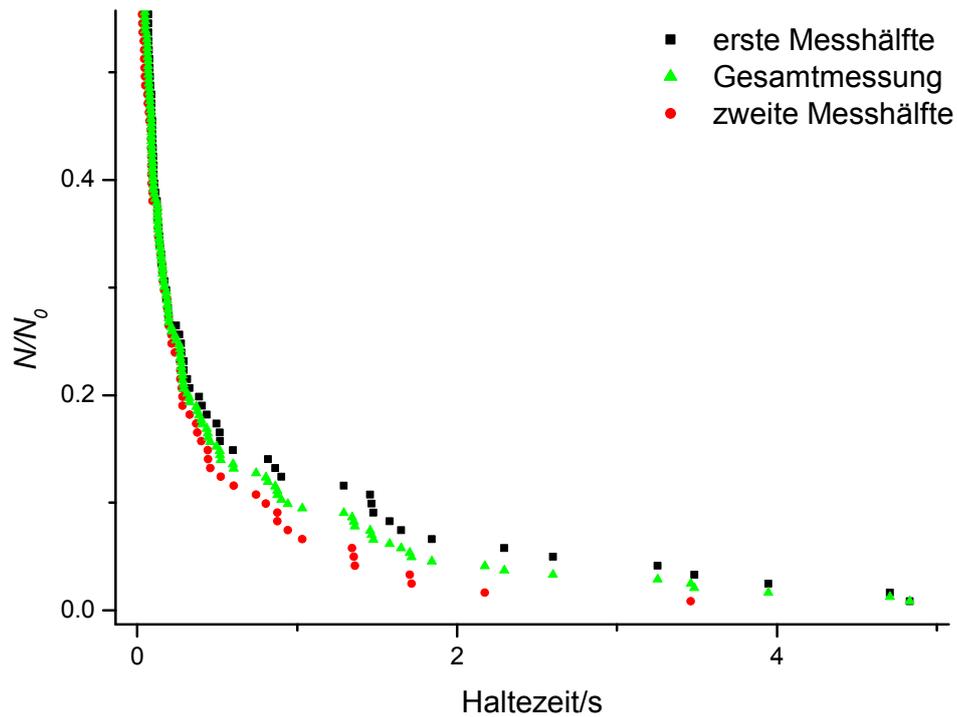
Auftragung der ersten und zweiten Hälfte der Messpunkte:

Abb. 80. Azobenzol/PEG-Silan in PBS-Pufferlösung bei einer Haltekraft von 750 pN und $T = 45.0 \text{ }^\circ\text{C}$ (Ausschnitt). Die Messwerte verschieben sich im zeitlichen Verlauf zu im Mittel kürzeren Haltezeiten, wie aus der Steigung der Messkurven ersichtlich ist.

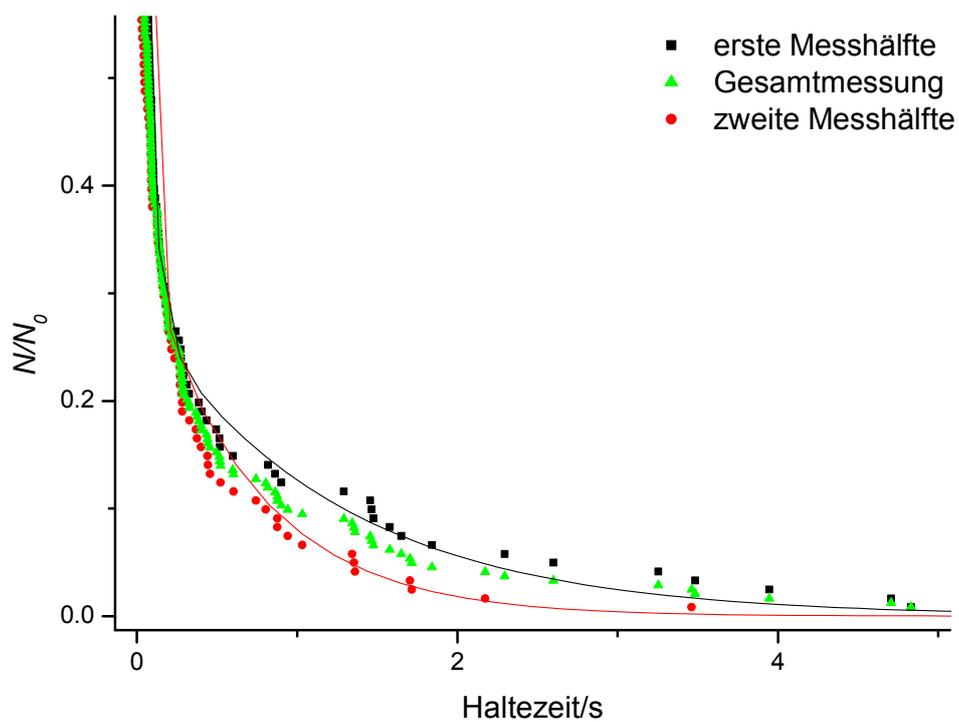


Abb. 81. Biexponentielle Kurvenanpassungen an die Messkurven aus Abb. 80. Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten und Gewichtungsfaktoren siehe Tab. 12.

Tab. 12. Ergebnisse der biexponentiellen Kurvenanpassungen in „Origin“ und der „Maximum Likelihood“-Auswertungen bei 750 pN Haltekraft und $T = 45.0\text{ °C}$, Messung in PBS-Puffer. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung.

(Für die „Maximum Likelihood“-Auswertung wurden bei der zweiten Messhälfte die beiden Messwerte mit den längsten Haltezeiten weggelassen, welche zu einem Fehler in der Berechnung führten.)

	k_1/s^{-1} (1)	k_2/s^{-1} (1)	AI (1)	k_1/s^{-1} (2)	k_2/s^{-1} (2)	AI (2)
erste Messhälfte	0.59	13.1	0.24	0.81	15.3	0.29
zweite Messhälfte	0.99	15.8	0.28	1.48	21.4	0.35

Die Auswertung von Tab. 12 zeigt, dass beide Geschwindigkeitskonstanten, k_1 und k_2 , im zeitlichen Verlauf der Messung zunehmen, d. h., je mehr Messzeit verstreicht, desto schneller kommt es bei erfolgreichen Anbindungen an den Cantilever offenbar zum Bindungsriß. Der Anteil beider Reaktionen, ausgedrückt durch den Gewichtungsfaktor AI , verschiebt sich dabei nur leicht in Richtung der Reaktion mit der Geschwindigkeitskonstante k_1 (siehe Tab. 4). Für das Azobenzol-/PEG-Silan-System erhält man auch bei anderen Haltekraften und Temperaturen die gleiche Tendenz bei den Geschwindigkeitskonstanten.

Für alle Messungen wäre eigentlich zu erwarten, dass die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 bei steigender Temperatur zunehmen müssten. Die RGT-Regel sagt voraus, dass eine Temperaturerhöhung um zehn Grad eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit auf das Doppelte bis Vierfache bewirken sollte.^[82] Dies ist offensichtlich nicht in dieser Größenordnung der Fall, für z. B. 500 pN erhält man sogar einen monotonen Abfall der Geschwindigkeitskonstanten bei steigender Temperatur. Eine zumindest teilweise Erklärung für die starken Schwankungen der berechneten Geschwindigkeitskonstanten mag darin begründet liegen, dass für eine bessere Auswertung bei manchen Messkurven eine noch höhere Anzahl an Datenpunkten wünschenswert wäre. Bei den Gewichtungsfaktoren $A1$ und $A2$ liegt bis auf wenige Ausnahmen stets $A2$ höher als $A1$, d. h., der Beitrag der Reaktion, die mit der Geschwin-

digkeitskonstante k_2 verläuft, ist höher als der Beitrag der Reaktion mit der Geschwindigkeitskonstante k_1 .

Eine mögliche Erklärung dafür, dass auch ohne Zugabe von Azobenzol und/oder EDC/NHS scheinbar Anbindungen an den Cantilever erhalten werden, liegt darin, dass eventuell ein Teil des Oberflächen-Silan-Netzwerkes während des Entfernens des Cantilevers vom Objektträger von der Oberfläche abgezogen wird. Das PEG-Silan bildet über das Silicium-Atom mit benachbarten sowie Oberflächenatomen der Siliciumdioxidoberfläche netzwerkartige Strukturen aus (siehe Abschn. 2.2.2), die möglicherweise auch in größeren Gebilden stabil bleiben und bei Kontakt mit dem Cantilever von der Oberfläche abgezogen werden können. Die Ankopplung dieser Netzwerke könnte zu den gemessenen Anbindungen geführt haben. In der Literatur sind mehrere Beispiele bekannt, dass Moleküle auch ohne Einsatz einer chemischen Kopplungsstrategie physikalisch an den Cantilever adsorbiert und gestreckt werden können (z. B. Proteine^[47]), eventuell tritt dieses Phänomen hier auch auf, obwohl Verweilzeit auf der Oberfläche und Andruckkraft (200 pN) zur Vermeidung dieses Problems bereits recht gering gewählt wurden.

Polyethylenglycole nehmen im kristallinen Zustand eine helicale Konformation ein, die in wässrigem Medium vermutlich teilweise bestehen bleibt.^[83] Ein sichtbarer Einfluss auf die Kraftkurve in einem Einzelmolekül-kraftspektroskopischen Experiment, z. B. durch das Auftreten eines Plateaus ähnlich wie bei Carboxymethylamylose, war in vorliegender Arbeit jedoch nicht zu verzeichnen, so dass eine Unterscheidung zwischen der Anbindung zweier durch Azobenzoldicarbonsäure vermittelter PEG-Silane und der Anbindung eines Oberflächen-Silan-Netzwerks zunächst nicht aus der Analyse der Kraftkurven getroffen werden kann. Werden Cantilever und Glasoberfläche nicht mit PEG-Silan funktionalisiert, erhält man keine Anbindungen, ebenso wenig bei der Verwendung des Silans DETA.

Interessant in diesem Zusammenhang wäre noch die Untersuchung, ob Anbindungen auch beobachtet werden können, wenn nur eine Seite, Cantilever oder Objektträger, mit PEG-Silan und die andere Seite mit DETA funktionalisiert wird.

Der Vergleich der Messungen in Wasser und PBS (siehe Abb. 64) zeigt das Ergebnis, dass die PBS-Pufferlösung stabilisierend auf das Molekül wirkt und somit höhere Kräfte bis zum Bindungsbruch im Vergleich zum Experiment in Wasser aufgewendet werden müssen.

Moleküllängenverteilungen:

Je nachdem, unter welchem Winkel ein Molekül an den Cantilever anbindet, kann die in der Kraft-Auslenkungs-Kurve gemessene Moleküllänge kleiner bzw. größer als in der Realität sein (siehe Abb. 82). Zusätzlich zur vom Chemikalienhersteller durch den Produktions- bzw. Reinigungsprozess des PEG-Spacers vorgegebenen Längenverteilung erhält man somit eine insgesamt noch breitere Moleküllängenverteilung.

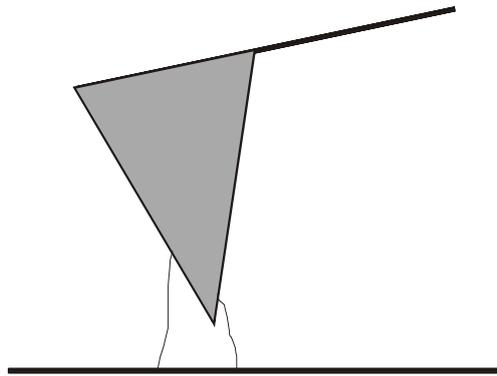


Abb. 82. Darstellung zweier an den Cantilever angebundener Moleküle. Ob ein Molekül senkrecht oder schräg an den Cantilever anbindet, lässt sich bei der Längenbestimmung über die Kraft-Auslenkungs-Kurve nicht feststellen. Längere Moleküle können hiermit kürzer erscheinen als sie sind. Aus entropischen Gründen eher wahrscheinlich ist der Fall, dass ein Molekül relativ senkrecht anbindet.

Es wurden die Moleküllängen aus den Messkurven zweier Messreihen mit dem Azobenzol-/PEG-Silan-System bestimmt und in „Origin“ grafisch als Histogramme aufgetragen. Hierbei wurde auch die Cantileververbiegung berücksichtigt und von den in „Igor Pro“ abgelesenen Längenwerten abgezogen. Die Cantileververbiegung lässt sich mit Kenntnis der Federkonstante des Cantilevers berechnen nach:

$$x = \frac{F}{k_S} \quad (17)$$

mit

x : von der Moleküllänge abzuziehende Cantileververbiegung

F : eingestellte Haltekraft

k_S : Federkonstante des Cantilevers

Zunächst wurde das System Azobenzol/PEG-Silan/EDC/NHS bei 40.0 °C und 1 nN Haltekraft untersucht (Abb. 83):

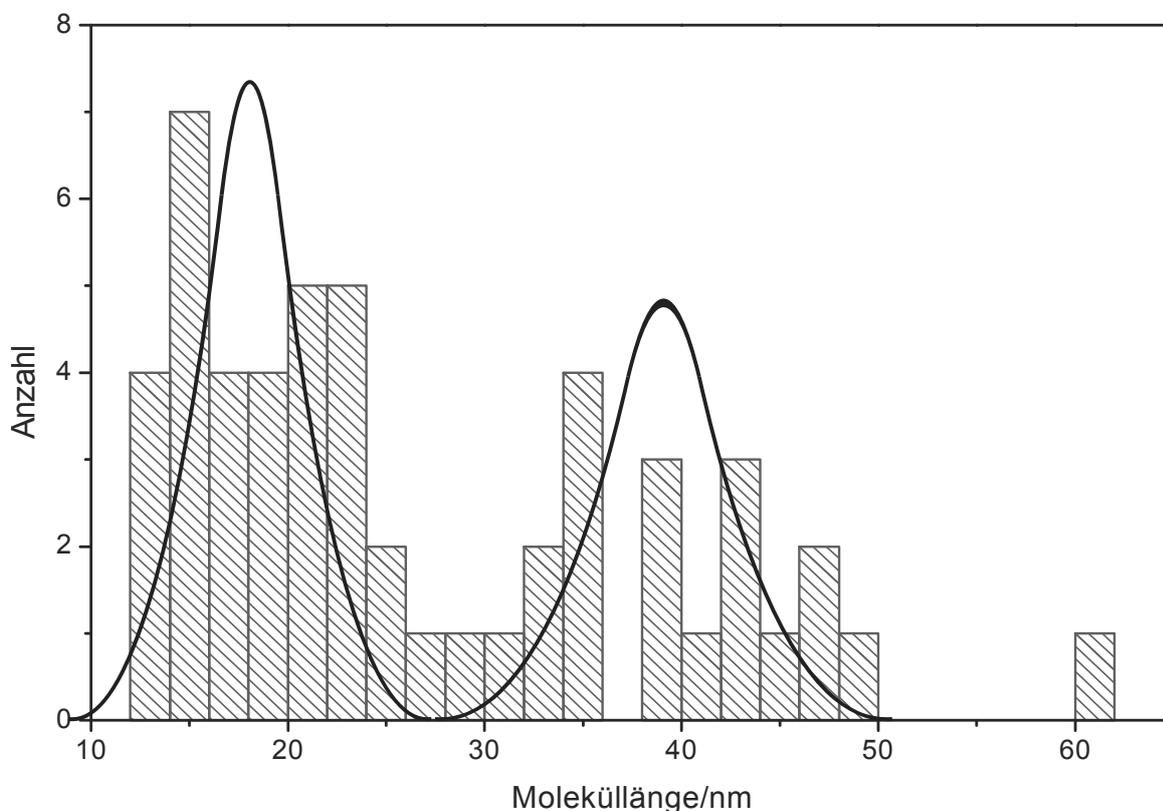


Abb. 83. Längenverteilung der angebundenen Moleküle beim Azobenzol-/PEG-Silan-System (alle Werte aus der gleichen Messreihe, Federkonstante 84.7 pN/nm, Olympus TR400PSA).

Die Cantileververbiegung bei der Messung beträgt nach Gl. 17 etwa 11.8 nm.

Aus dem Histogramm (Abb. 83) ist abzulesen, dass bei den Messungen des Azobenzol-/PEG-Silan-Systems einerseits eine Moleküllänge von ca. 15–22 nm vorherrscht. Andererseits lässt sich auch die Moleküllänge von ca. 40 nm dem Maximum einer Längen-Verteilungsfunktion zuordnen. Ein einzelnes PEG-Silan besitzt eine mittlere Moleküllänge von ca. 26 nm. Bei Überbrückung zweier PEG-Silane von Cantilever und Oberfläche mit der Azobenzoldicarbonsäure sollte man auf eine Gesamtlänge von ca. 55 nm kommen. Es ist möglicherweise so, dass im kurzen Längenbereich von ca. 19 nm nur ein einzelnes PEG-Silan eine Anbindung an Cantilever- bzw. Objektträgeroberfläche, eventuell über Azobenzol vermittelt, durchführt, im längeren Bereich um ca. 40 nm überbrückt ein Azobenzolmolekül wahrscheinlich zwei PEG-Silan-Moleküle. Zwar sind die erhaltenen Moleküllängen für diese Hypothese etwas zu

klein, jedoch muss gemäß Abb. 82 berücksichtigt werden, dass eine Anbindung von Molekülen auch schräg bei scheinbar zu kurzer Moleküllänge erfolgen kann.

Weiterhin wurde das System PEG-Silan/EDC/NHS unter den gleichen Bedingungen, bis auf die Zugabe von Dicarboxyazobenzol untersucht. Die hierbei erhaltenen erfolgreichen Anbindungen wurden ebenso in Bezug auf die Moleküllängen ausgewertet und in einem Histogramm aufgetragen (siehe Abb. 84). Für die Cantilverbiegung erhält man bei der Messreihe ebenfalls eine Länge von 11.8 nm.

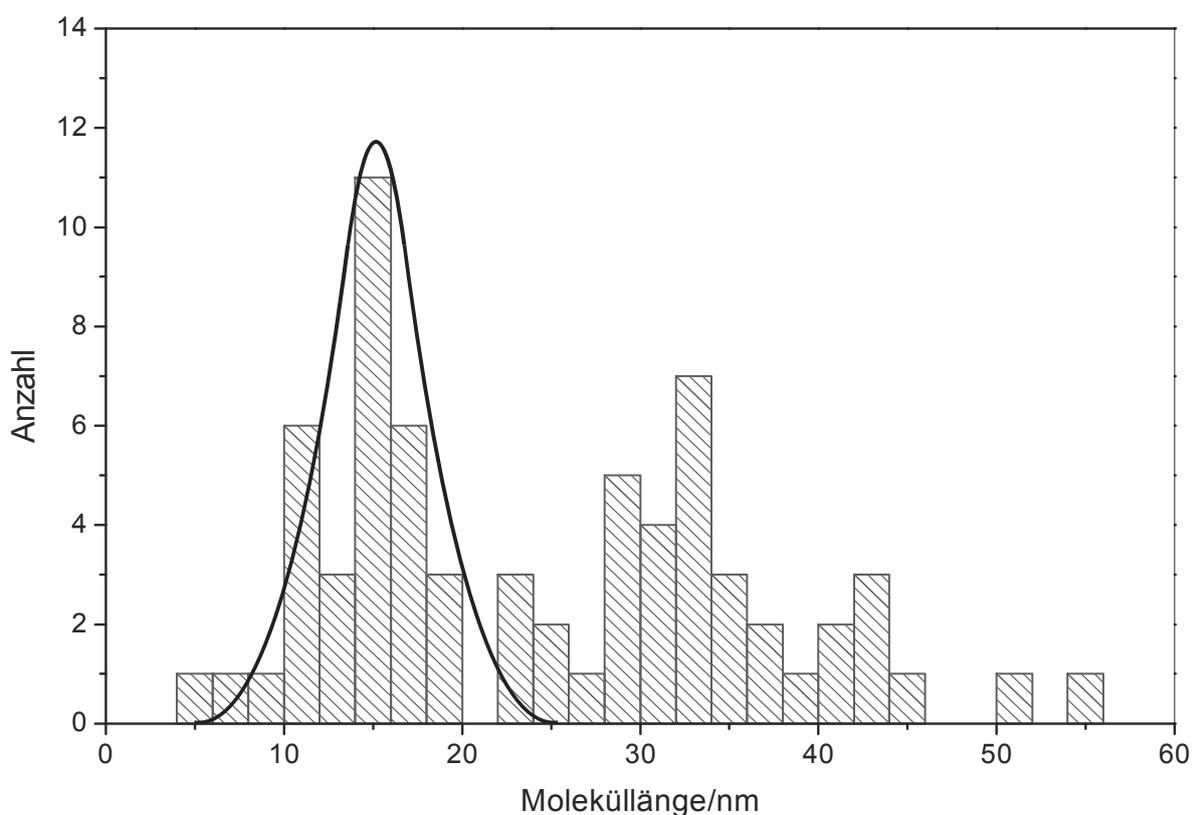


Abb. 84. Längen der angebotenen Moleküle beim PEG-Silan-System mit Zugabe von EDC/NHS, jedoch ohne Zugabe von Azobenzol. (Alles die gleiche Messreihe; Federkonstante 84.7 pN/nm, Olympus TR400PSA, Messparameter wie bei Abb. 83.)

Man erhält im Histogramm eine Vorzugslänge von ca. 15 nm, hierbei scheint es sich ebenfalls um das Maximum einer Verteilungsfunktion zu handeln. Es scheint ebenso der Effekt, dass Moleküle schräg anbinden können (siehe Abb. 82), eine Rolle zu spielen. Das Zuordnen der Moleküllänge um ca. 32 nm zum Maximum einer zweiten Verteilungsfunktion wäre nicht zu erklären, zumal ein etwaiges schräges Anbinden zweier PEG-Silane von Oberfläche und Can-

tilever, verbrückt über ein Molekül Azobenzoldicarbonsäure, mangels Zugabe des Azobenzols hier nicht als Erklärung heranzuziehen ist.

2.4.3.2 Carboxymethylamylose, DETA

Für die Messungen wurden folgende Parameter verwendet:

Pull Off = 200 nm

Surface Trigger = 200 pN

Wegfahrgeschwindigkeit von der Oberfläche = 1 $\mu\text{m/s}$

Verweilzeit auf der Oberfläche („dwell time“) = 1–2 s

Sample Rate = 2–20 kHz

Integral Gain = 3

Lösungsmittel: wässr. PBS-Pufferlösung

Messungen bei Zimmertemperatur:

800 pN Haltekraft:

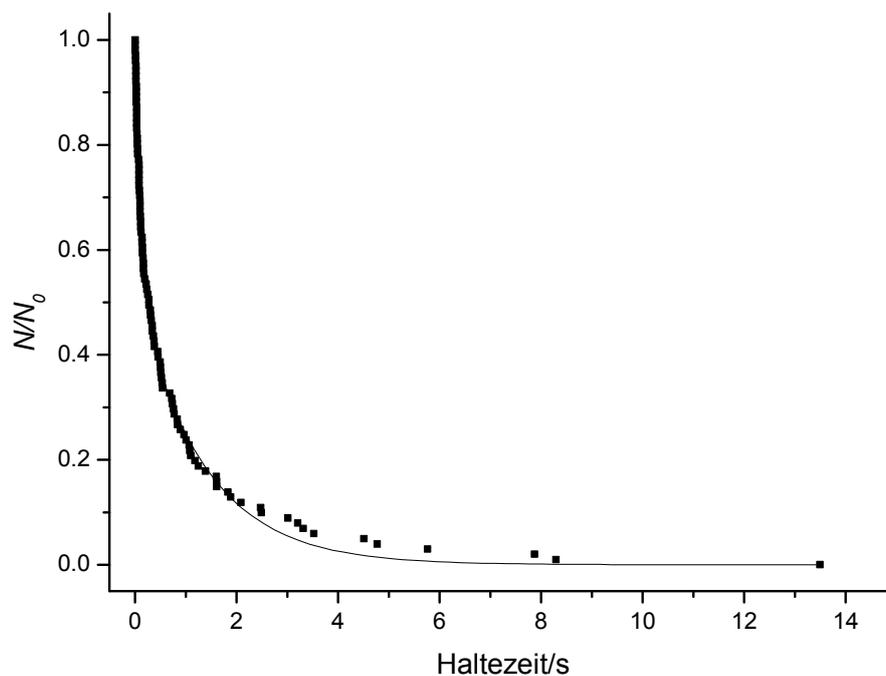


Abb. 85. CMA/DETA, Haltekraft 800 pN, pH 2.0 (PBS).

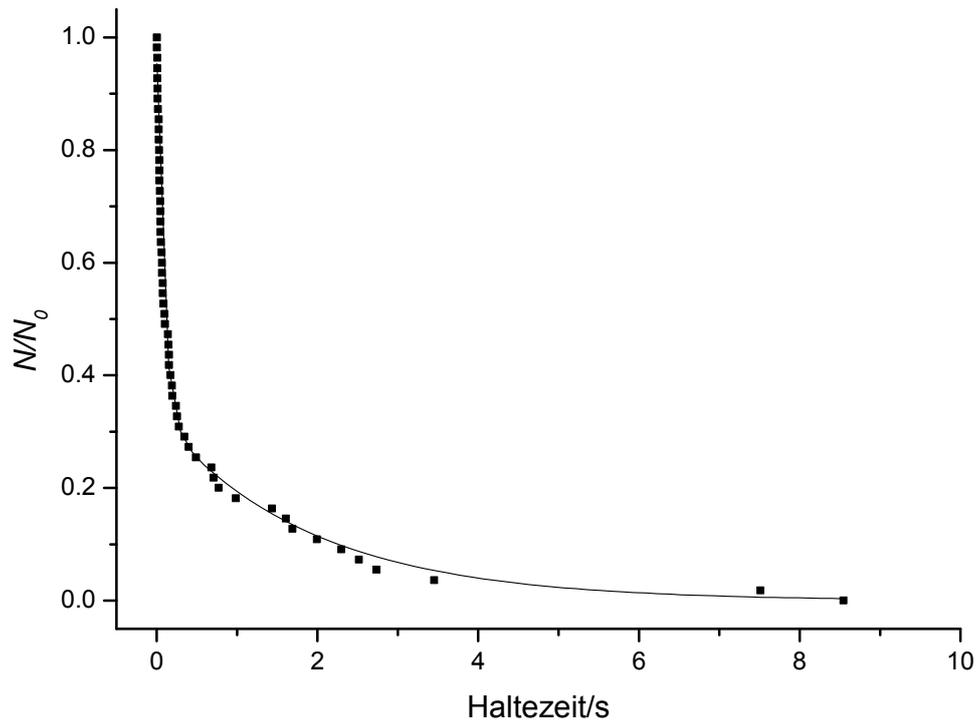
1.00 nN Haltekraft:

Abb. 86. CMA/DETA, Haltekraft 1.00 nN, pH 2.0 (PBS).

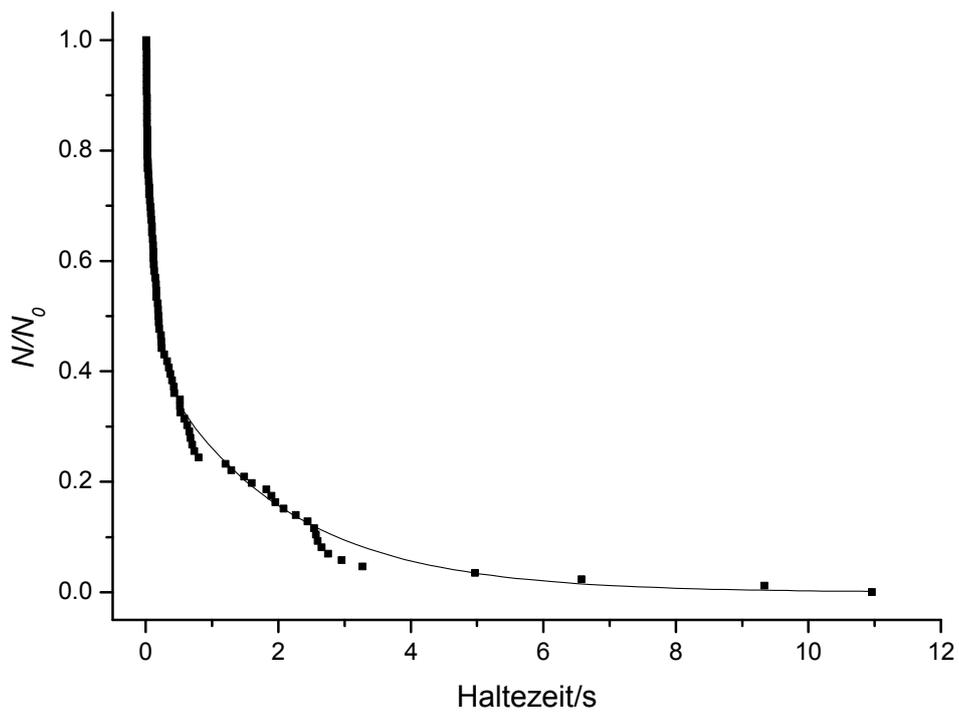
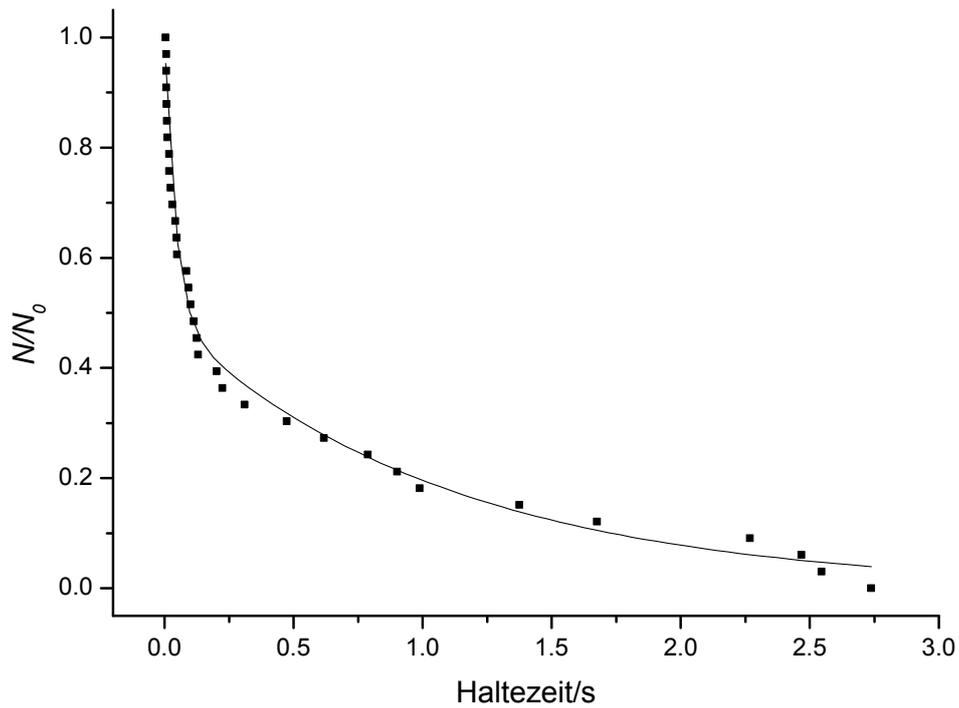
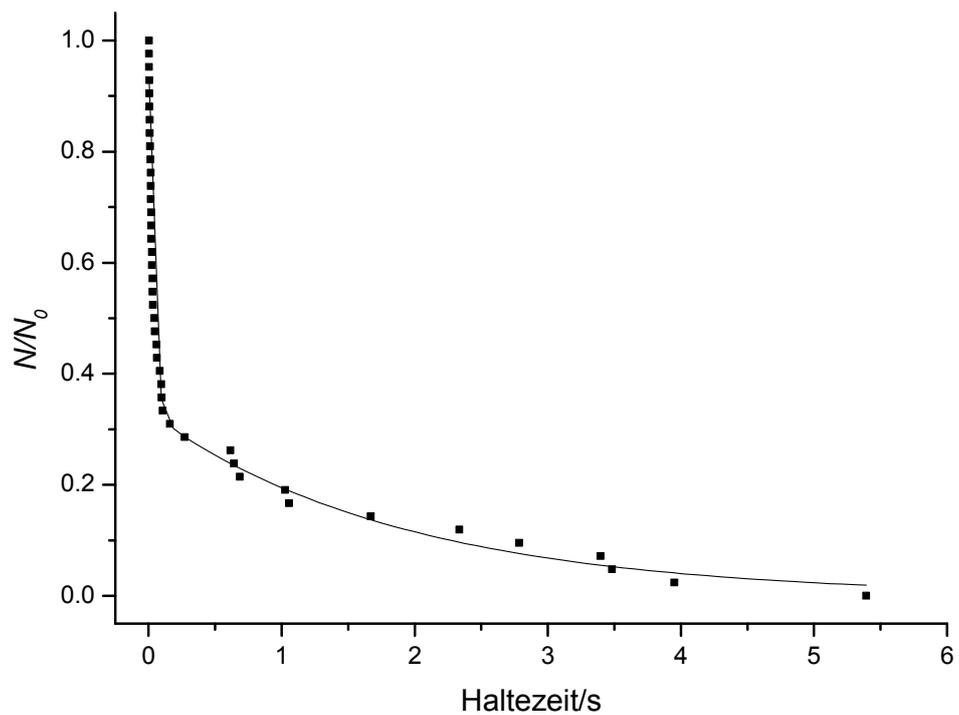
1.25 nN Haltekraft:

Abb. 87. CMA/DETA, Haltekraft 1.25 nN, pH 2.0 (PBS).

1.00 nN Haltekraft, Zugabe von EDC/NHS:**Abb. 88.** CMA/DETA, Haltekraft 1.00 nN, pH 2.0 (PBS), mit Zugabe von EDC/NHS.**1.50 nN Haltekraft, Zugabe von EDC/NHS:****Abb. 89.** CMA/DETA, Haltekraft 1.50 nN, pH 2.0 (PBS), mit Zugabe von EDC/NHS.

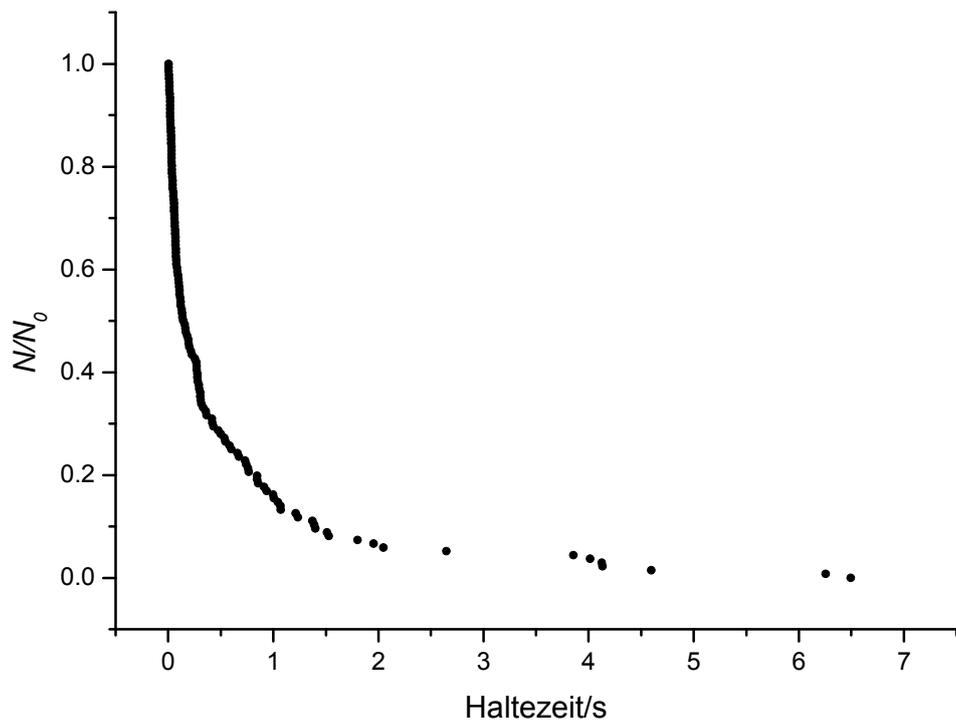
Tab. 13. Ergebnisse der biexponentiellen Kurvenanpassungen in „Origin“ und der „Maximum Likelihood“-Auswertungen bei Zimmertemperatur und vier verschiedenen Haltekraften. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung.

Haltekraft/pN	k_1/s^{-1} (1)	k_2/s^{-1} (1)	AI (1)	k_1/s^{-1} (2)	k_2/s^{-1} (2)	AI (2)
800	0.47	5.83	0.42	0.75	8.84	0.53
1000	0.49	11.7	0.33	0.52	11.9	0.33
1250	0.49	9.00	0.43	0.51	9.06	0.43
1000 (EDC/NHS)	0.89	21.3	0.46	0.92	23.4	0.49
1500 (EDC/NHS)	0.53	29.2	0.33	0.53	29.4	0.33

Die Auswertung des CMA-/DETA-Systems lässt ebenfalls keine eindeutigen Schlussfolgerungen in Bezug auf eine mögliche Krafttendenz zu. Zu erwarten wäre, dass beide Geschwindigkeitskonstanten bei steigender Haltekraft zunehmen müssten. Eventuell ist die Abweichung von diesem Verhalten auf Temperaturschwankungen zurückzuführen, auch, da die Geschwindigkeitskonstanten bei 1.00 nN mit und ohne EDC-/NHS-Zugabe gleich sein sollten, da beide Messungen bei pH 2.0 erfolgten und EDC sich im sauren Medium zersetzt. Somit wäre nur eine höhere Stoffkonzentration bei den Messungen mit EDC-/NHS-Zugabe vorauszusetzen, nicht jedoch eine Anbindung nach dem EDC-/NHS-Anbindungsprotokoll bei pH 7.4.

Die Reaktion mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 hat bei allen Messungen mit CMA/DETA den größeren Anteil (ausgenommen den Wert bei 800 pN nach der „Least Squares“-Methode).

Im Folgenden wurden mit der neu beschafften temperaturgeregelten „BioHeater“-Messzelle temperaturgeregelte Messungen mit CMA/DETA bei pH 7.4 durchgeführt.

Messungen bei 1.00 nN Haltekraft und Temperaturen von 30.0 °C, 40.0 °C:**30.0 °C:****Abb. 90.** CMA/DETA in PBS-Puffer (pH 7.4), Haltekraft 1.00 nN, $T = 30.0$ °C.**40.0 °C:****Abb. 91.** CMA/DETA in PBS-Puffer (pH 7.4), Haltekraft 1.00 nN, $T = 40.0$ °C.

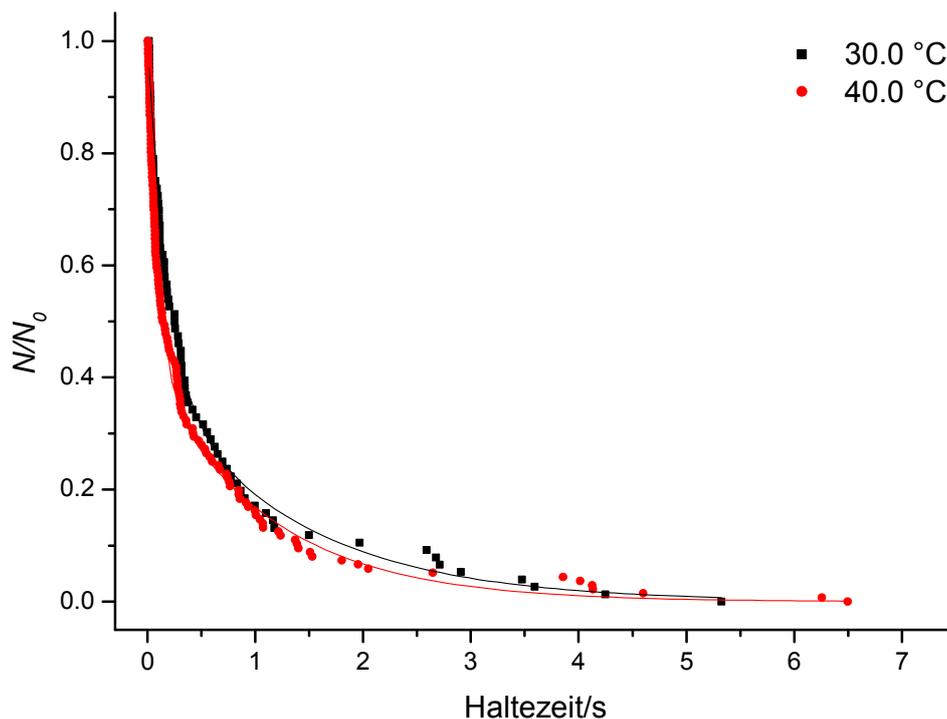


Abb. 92. Gesamtauswertung der Force-Clamp-Messungen des Systems CMA/DETA bei einer Haltekraft von 1.00 nN und $T = 30.0\text{ °C}$, 40.0 °C bei pH 7.4.

Tab. 14. Ergebnisse der biexponentiellen Kurvenanpassungen in „Origin“ und der „Maximum Likelihood“-Auswertungen bei 1.00 nN Haltekraft und zwei verschiedenen Temperaturen. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung.

Temperatur/°C	k_1/s^{-1} (1)	k_2/s^{-1} (1)	AI (1)	k_1/s^{-1} (2)	k_2/s^{-1} (2)	AI (2)
30.0	0.67	5.25	0.37	0.75	5.63	0.40
40.0	0.79	9.81	0.42	0.92	10.8	0.42

Nach der RGT-Regel^[82] sollte auch bei einer Temperaturerhöhung des CMA-/DETA-Systems ein Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten zu verzeichnen sein. Dies ist der Fall, für k_2 findet etwa eine Geschwindigkeitsverdoppelung statt, wie von der RGT-Regel vorausgesagt. Die Geschwindigkeitserhöhung von k_1 ist demgegenüber etwas geringer als erwartet. Die Kurve der Messwerte bei 30.0 °C liegt über der Kurve bei 40.0 °C ; dieses zeigt, dass die Lebensdauer der Moleküle bei 30.0 °C über denen bei 40.0 °C liegt, was der Erwartung entspricht.

Anzumerken bei dem System CMA/DETA bei pH 7.4 ist, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ein Molekül erfolgreich an den Cantilever anbindet, sehr viel kleiner als bei den Messungen bei pH 2.0 ist.^[53] Man erhält daher im Allgemeinen viel weniger Datenpunkte, so dass im Rahmen dieser Arbeit keine größere Anzahl an Messwerten über die beiden in Abb. 92 dargestellten Messreihen hinaus erhalten wurde.

Auftragung der ersten und zweiten Hälfte der Messpunkte:

Es wurde wie beim Azobenzol-/PEG-Silan-System der zeitliche Verlauf der Messungen bei CMA/DETA verfolgt und die erste und die zweite Hälfte der Messergebnisse separat normiert und aufgetragen (siehe Abb. 93, 94). Dies wurde bei 1.00 nN Haltekraft für $T = 30.0\text{ °C}$ und $T = 40.0\text{ °C}$ durchgeführt.

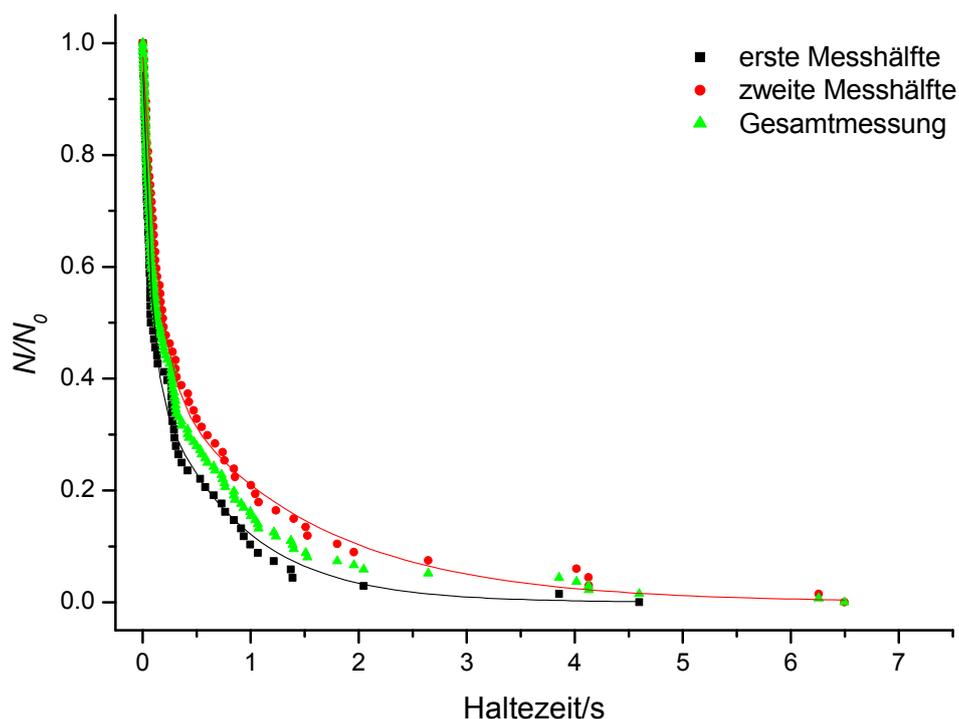


Abb. 93. Darstellung des beiden Messhälften für CMA/DETA bei 1.00 nN Haltekraft und $T = 40.0\text{ °C}$ in PBS-Pufferlösung bei pH 7.4 (Ausschnitt).

Tab. 15. Ergebnisse der biexponentiellen Kurvenanpassungen in „Origin“ und der „Maximum Likelihood“-Auswertungen bei 1.00 nN Haltekraft, $T = 40.0 \text{ }^\circ\text{C}$, Messung in PBS-Puffer bei pH 7.4. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung.

	k_1/s^{-1} (1)	k_2/s^{-1} (1)	AI (1)	k_1/s^{-1} (2)	k_2/s^{-1} (2)	AI (2)
erste Messhälfte	1.19	14.6	0.44	1.27	15.1	0.43
zweite Messhälfte	0.63	7.39	0.43	0.71	7.61	0.43

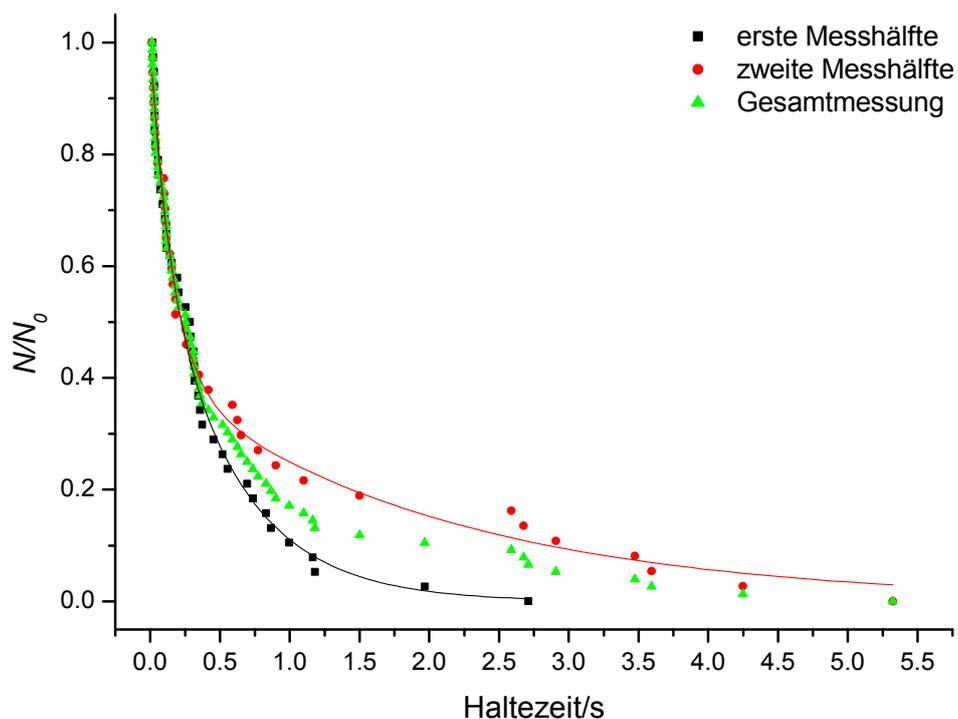


Abb. 94. Darstellung des beiden Messhälften für CMA/DETA bei 1.00 nN Haltekraft und $T = 30.0 \text{ }^\circ\text{C}$ in PBS-Pufferlösung bei pH 7.4.

Tab. 16. Ergebnisse der biexponentiellen Kurvenanpassungen in „Origin“ und der „Maximum Likelihood“-Auswertungen bei 1.00 nN Haltekraft, $T = 30.0\text{ °C}$, Messung in PBS-Puffer bei pH 7.4. (1): „Maximum Likelihood“, (2): Kurvenanpassung.

	k_1/s^{-1} (1)	k_2/s^{-1} (1)	AI (1)	k_1/s^{-1} (2)	k_2/s^{-1} (2)	AI (2)
erste Messhälfte	1.63	7.53	0.63	1.82	8.80	0.68
zweite Messhälfte	0.54	7.09	0.44	0.49	6.65	0.41

Das Ergebnis des zeitlichen Verlaufs der Messungen mit CMA/DETA zeigt die zu Azobenzol/PEG-Silan gegensätzliche Tendenz: Die Geschwindigkeitskonstanten verkleinern sich mit fortschreitender Messung, bei beiden untersuchten Temperaturen.

Moleküllängenverteilung:

Zum Vergleich mit den Messungen von Azobenzol/PEG-Silan wurden die Moleküllängen der angebundenen Moleküle bei einer Messung mit CMA und dem kurzen Silan DETA ausgemessen und um die Cantileververbiegung (beträgt bei der Messreihe ca. 39.4 nm) korrigiert. Man erhält hierbei eine Vorzugslänge von ca. 210 nm (siehe Abb. 95). Vom Bereich des „pull offs“, 200 nm, bis zu den längsten Molekülen von ca. 550 nm Länge liegt, bis auf das o. g. Maximum bei 210 nm, eine recht gleichmäßige Längenverteilung vor. Das Vorliegen einer zweiten Vorzugslänge wie beim Azobenzol-/PEG-Silan-System ist nicht zu erkennen. Einige Moleküle weisen eine noch größere Moleküllänge als 600 nm auf, was bei einem mehrere Mikrometer langen Polymer wie CMA zu erwarten ist.

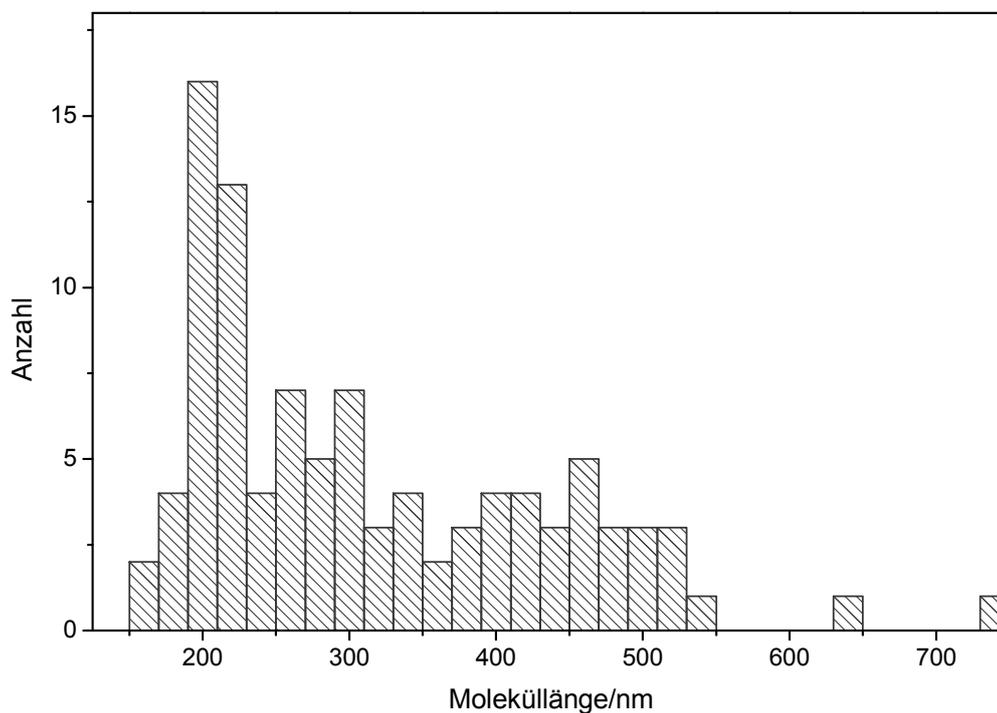


Abb. 95. Längen der angebotenen Moleküle beim CMA-/DETA-System, aufgetragen mit „Origin“. Messparameter: Haltekraft 1.00 nN, $T = 30.0$ °C, Federkonstante 25.4 pN/nm, Olympus TR400PSA.

2.5 Messparameter

Integral Gain

Dieser wichtige Parameter, der in der Software dimensionslos angegeben wird, beschreibt die Geschwindigkeit, mit welcher der z-Piezo versucht, die Deflection konstant zu halten. Ein zu hoher Wert führt zu einem Oszillieren des Deflection-Signals und einer akustischen Rückmeldung des AFM-Kopfes. Ein zu niedriger Wert führt dazu, dass das Deflection-Signal nicht schnell genug nachgeregelt wird, was für die Bestimmung der korrekten Haltezeiten problematisch ist. Die Voreinstellung von 10 ist für fast alle Messungen ein zu hoher Wert. Meist wurde ein *Integral Gain* von 3 verwendet.

Feedback Filter

Dieses Filter ist dem z-Feedback-Regelkreis vorangestellt und gibt die Bandbreite des Eingangssignals an. Die Voreinstellung von 1 kHz wurde für alle Messungen beibehalten.

Sample Rate

Hiermit wird die Anzahl an Datenpunkten, die während einer Kraftmessung aufgezeichnet werden, festgelegt. Als geeigneter Wert hat sich die Voreinstellung von 2 kHz erwiesen.

Open Loop/Closed Loop

Im *Closed Loop* wird ein Parameter, z. B. die z-Piezo-Position, in einem geschlossenen Regelkreis ständig auf einen festgelegten Wert nachgeregelt. Hiermit ist es möglich, den nicht-linearen Fahrweg des z-Piezos auszugleichen. Im *Open Loop*-Modus wird die z-Piezo-Position erst nach Aufnahmen der Kraftkurve ausgelesen.

Force Distance

Hiermit wird die maximale Wegstrecke des z-Piezos angegeben, innerhalb derer versucht wird, ein Molekül anzubinden. Wird kein Molekül angebunden, wird ein neuer Messzyklus gestartet.

Extend Velocity

Hiermit wird die Geschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde angegeben, mit welcher der z-Piezo sich der Oberfläche nähert. Die Voreinstellung von 1.98 $\mu\text{m/s}$ wurde für alle Messungen beibehalten.

Pull Off

Mit diesem Parameter wird ein Abschnitt im Bereich der Wegfahrkurve von der Oberfläche definiert, innerhalb dessen kein *Pull Trigger* aktiviert werden soll. Hiermit lassen sich bei längeren Molekülen wie z. B. CMA molekulare Anbindungen von Adhäsionskräften unterscheiden. Die Voreinstellung von 200 nm wurde bei CMA beibehalten, bei Azobenzol wurde der Wert auf 0 nm gesetzt.

Retract Velocity

Hiermit wird die Geschwindigkeit des z-Piezos beim Entfernen von der Oberfläche angegeben. Für alle Force-Clamp-Messungen wurde ein Wert von 1 $\mu\text{m/s}$ gewählt, bei den Force-Ramp-Messungen wurde der Wert systematisch variiert.

Surface Trigger

Hiermit wird angegeben, mit welcher Kraft der Cantilever beim Oberflächenkontakt aufsetzt. Für alle Messungen wurde ein relativ geringer Wert von 200 pN gewählt, um unspezifische Anbindungen durch Physisorption, die bei höheren Kräften auftreten können, zu vermeiden.

Surface Dwell

Dieser Parameter gibt die Verweilzeit des Cantilevers auf der Oberfläche an. Hierbei wurde meist ein Wert von etwa 1.5 s gewählt, um den Molekülen auf der Oberfläche eine ausreichende Zeitspanne zur Ausbildung einer kovalenten Bindung mit dem Cantilever zu geben. Besonders bei höheren Temperaturen ist es notwendig, den Wert herunterzusetzen auf meist 1 s, um Mehrfachanbindungen zu vermeiden.

Dwell Feedback

Hierbei besteht die Wahl zwischen *Zsensor* und *Deflection*. Als Parameter, auf den sich der Regelkreis beim Verweilen auf der Oberfläche bezieht, wurde stets *Deflection* gewählt.

Pull Trigger

Dieser Wert, der mit einem negativen Vorzeichen versehen ist, ist der entscheidende Parameter während einer Force-Clamp-Messung und gibt die Kraft an, mit der ein angebundenes Molekül gehalten wird.

Hold Time Limit

Hiermit wird die maximale Haltezeit eines Moleküls beschrieben, d. h., sobald dieser Wert erreicht ist, fährt der z-Piezo eine größere Wegstrecke von der Oberfläche, so dass das angebundene Molekül sicher reißt.

2.6 Kalibrierung des Cantilevers

Zu Beginn einer Messung muss zunächst die Federkonstante des verwendeten Cantilevers bestimmt werden. Hierzu wurden verschiedene non-destruktive Techniken entwickelt, wie die „added mass“-Methode^[84], geometriebasierte Methoden^[85,86], Verwendung eines kalibrierten Standard-Cantilevers^[87] sowie die „thermal tuning“-Methode^[88]. Letztere Methode ist die heutzutage meistgenutzte Methode zur Kalibrierung von Cantilevern, denn die Federkonstante kann hiermit ohne zusätzlichen apparativen Aufwand direkt mit dem AFM ermittelt werden. Die Prozedur teilt sich am „MFP-3D Bio“ in drei durchzuführende Kalibrationsschritte. Im ersten Schritt wird die „virtual deflection“ kalibriert, indem der z-Piezo bei ausreichend großem Abstand von der Oberfläche über seine maximale Wegstrecke gefahren wird. Die erhaltene Deflection-Auslenkungs-Kurve liegt dabei nicht parallel zur x-Achse, wie eigentlich zu erwarten wäre (siehe Abb. 96). Der Grund für den nicht-linearen Fahrweg des Piezos ist

nicht vollständig geklärt. Es handelt sich laut Hersteller um eine mechanische Kopplung des „Deflection“-Signals mit der Bewegung des z-Piezos, wobei die Stärke der Kopplung auch davon abhängig ist, wie das Licht der superlumineszenten Diode auf dem Cantilever positioniert ist.^[89]

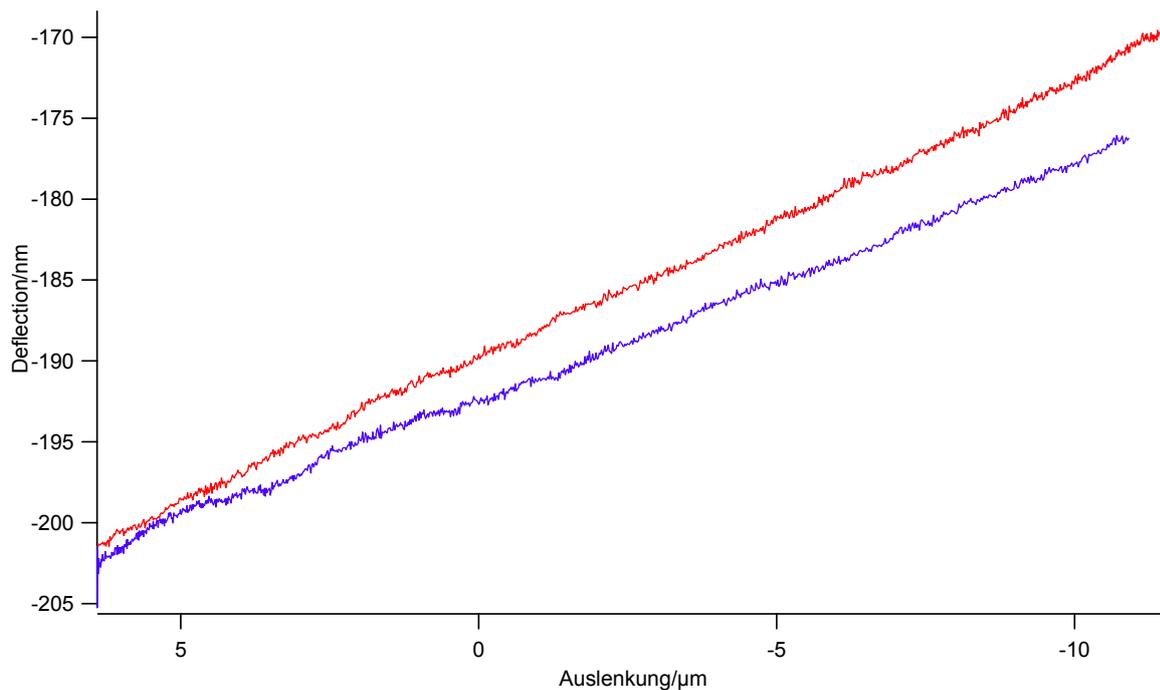


Abb. 96. Kalibrierung der „virtual deflection“ im ersten Kalibrierungsschritt. Rot: Anfahren an die Oberfläche, blau: Wegfahren von der Oberfläche.

Im nächsten Kalibrationsschritt, der Kalibrierung der „Involts“ (engl. inverted optical lever sensitivity), wird zunächst eine Kraftkurve an der Oberfläche aufgenommen (siehe Abb. 97). Als Trigger Point wird ein Wert von 2 V eingestellt. Um zu gewährleisten, dass der Laserspot auf der Photodiode mittig positioniert ist und ein möglichst linearer Bereich gewählt wird, stellt man die Deflection vor dem Aufnehmen der Kraftkurve auf -2 ein. In der erhaltenen Kraftkurve wird der linear abfallende Kurvenbereich der Rückzugsspur des Cantilevers (blau) markiert und die entsprechende Kalibrierungsfunktion ausgeführt. Bei diesem Kalibrierungsschritt ist darauf zu achten, dass die Oberfläche, auf der die Kraftkurve durchgeführt wird, möglichst hart ist, da sonst eine abweichende Federkonstante bestimmt wird. Alle Messungen in dieser Arbeit wurden auf Glas-Objektträgern durchgeführt, die eine ausreichende Härte für das Kalibrierungsprotokoll aufweisen.

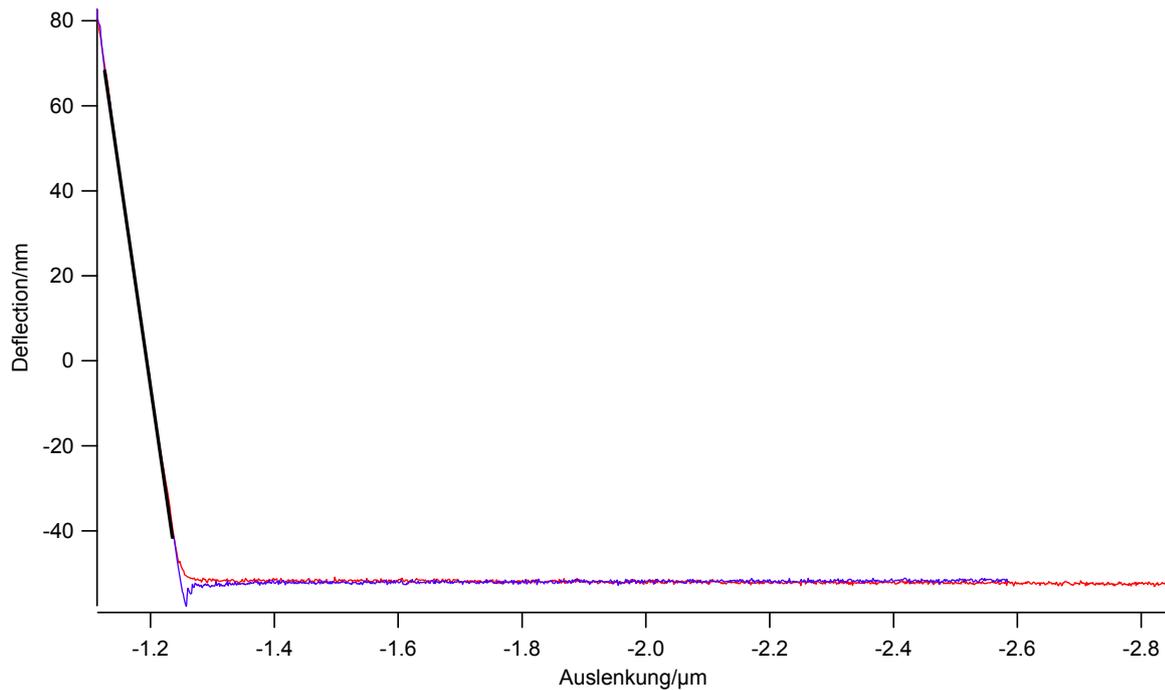


Abb. 97. Kalibrierung der „Involes“ im zweiten Kalibrierungsschritt zur Bestimmung der Federkonstante des Cantilevers. An den linear abfallenden Bereich der Kraftkurve (blaue Kurve) wird eine lineare Kalibrierungsfunktion angepasst (schwarze Linie).

Im dritten Kalibrierungsschritt wird der Cantilever zunächst weit von der Oberfläche entfernt, um Wechselwirkungen zwischen Cantilever und Oberfläche zu vermeiden. Dann werden die Eigenschwingungs-Frequenzen des Cantilevers detektiert (siehe Abb. 98). Hierbei wurden stets mehr als 100 Messzyklen gewählt. Im erhaltenen Frequenzspektrum wird dann eine Kurvenfunktion an die Grundschiebungsfrequenz des Cantilevers angepasst. Mit diesem Schritt ist die Bestimmung der Federkonstante des Cantilevers abgeschlossen.

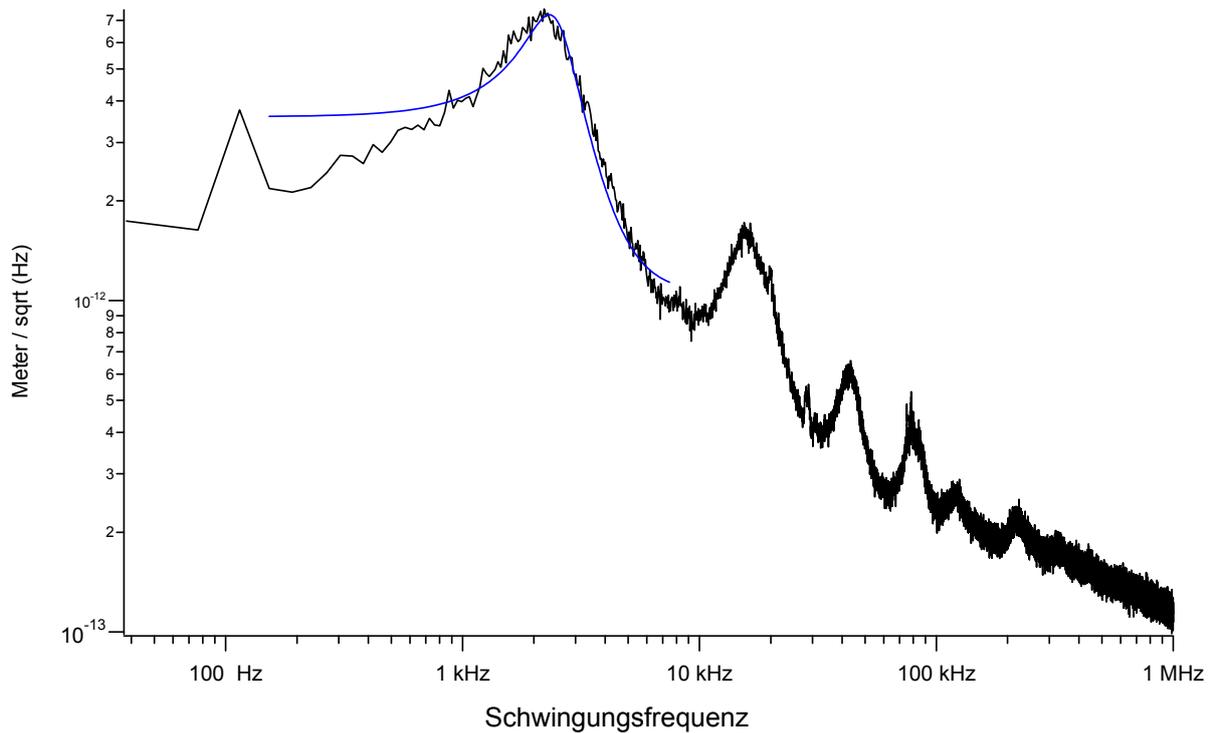


Abb. 98. Dritter Kalibrierungsschritt zur Bestimmung der Federkonstante des Cantilevers. Die Eigenschwingungen des Cantilevers werden detektiert, und eine Kalibrierungsfunktion wird an die Grundswingungsfrequenz angepasst (blaue Kurve).

Je härter der verwendete Cantilever ist, desto größer ist hierbei die detektierte Eigenschwingungsfrequenz, da unter Zugrundelegung eines harmonischen Oszillators^[90] die Schwingungsfrequenz nach folgender Formel mit steigender Federkonstante zunimmt:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k_S}{\mu}} \quad (18)$$

ν : Schwingungsfrequenz des harmonischen Oszillators

k_S : Federkonstante

μ : reduzierte Masse

2.7 Verwendete Software

bis 29.09.2010:

Igor Pro 6.0.4.0, Fa. WaveMetrics, Oregon, USA

MFP-3D-Plugin 080501+0700, Fa. Asylum Research, Santa Barbara, USA

ab 30.09.2010:

Igor Pro 6.2.0.0, Fa. WaveMetrics, Oregon, USA

MFP-3D-Plugin 090909+1214, Fa. Asylum Research, Santa Barbara, USA

ChemDraw Pro 9.0, Fa. CambridgeSoft, Cambridge, England

Excel 2007 SP2 (12.0.6545.5000), Fa. Microsoft, Redmond, USA

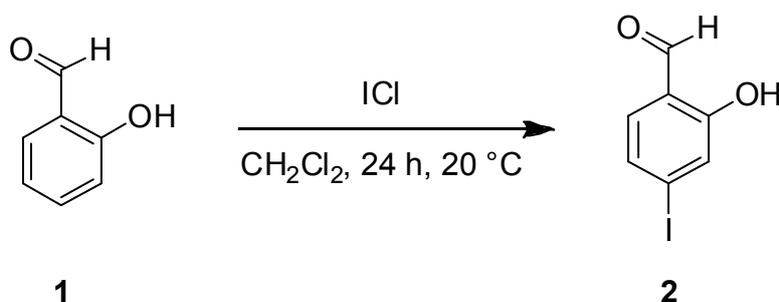
MestReNova 5.3.0-4487, Fa. Mestrelab, Santiago de Compostela, Spanien

OriginPro 8.0.63.988 SR6 (v8.0988), Fa. OriginLab, Northampton, USA

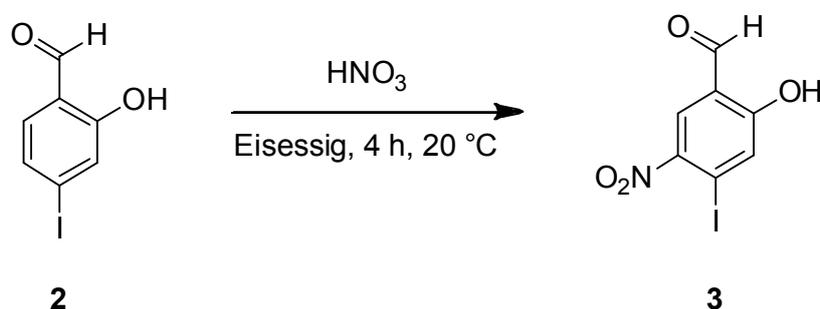
3 Synthesen

Im Syntheseteil dieser Arbeit war ein zweifach iodiertes Spiropyran zu synthetisieren, das nach Heck-Reaktion mit 4-Vinylbenzoesäure Verwendung als molekularer Schalter in Force-Clamp-Messungen mit dem AFM finden soll. Die Carbonsäurefunktionalität wurde gewählt, um das gleiche Anbindungsprotokoll an Objektträger und Cantilever wie bei CMA und der Azobenzoldicarbonsäure verwenden zu können.

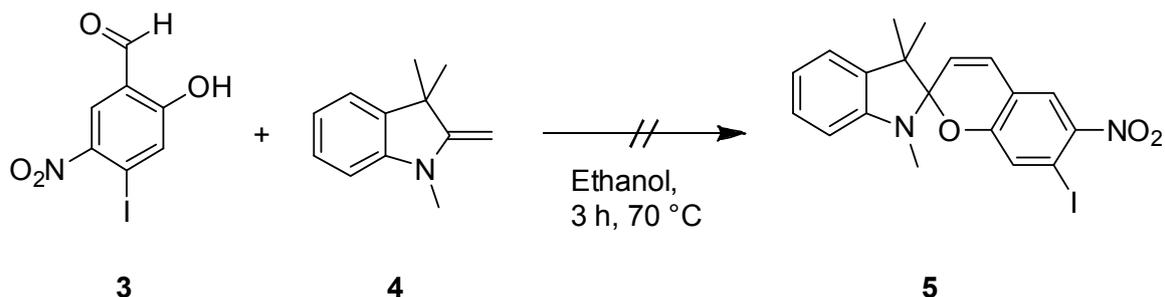
Im ersten Reaktionsschritt wurde kommerziell erhältlicher Salicylaldehyd (**1**) durch Iodierungsreaktion mit Iodmonochlorid in 43%iger Ausbeute in 4-Iodsalicylaldehyd (**2**) überführt.



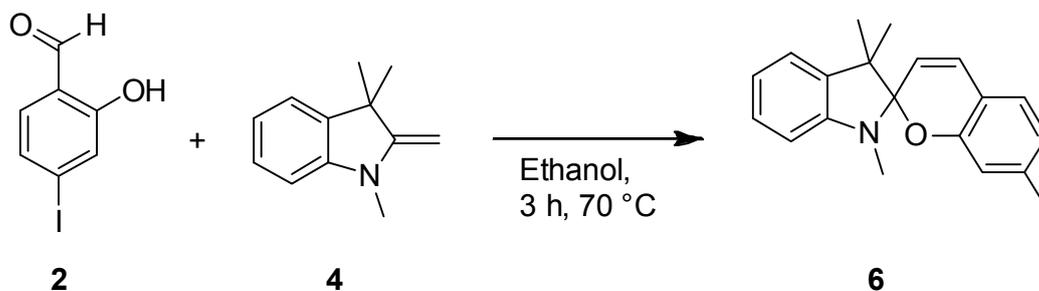
Im nächsten Reaktionsschritt wurde **2** in 5-Position nitriert.^[91] Die Reaktion verläuft in 37%iger Ausbeute.



Im darauffolgenden Kondensationsschritt zum Spiropyran wurde versucht, **3** mit kommerziell erhältlichem 1,3,3-Trimethyl-2-methylenindolin (**4**) zur Reaktion zu bringen. Dies ist allgemein eine gängige Methode, um Spiropyrane darzustellen.^[92] Die Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums ergab jedoch, dass keine Reaktion stattgefunden hatte.

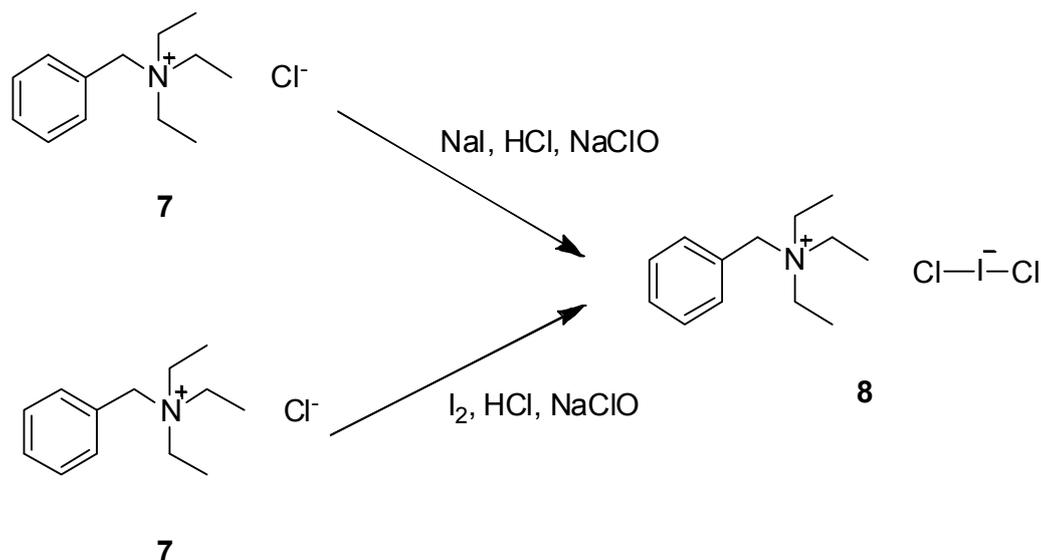


Im Folgenden wurde daher versucht, den Vorläufer von Nitroverbindung **3**, den Iodsalicylaldehyd **2**, mit **4** zur Reaktion zu bringen. Die Reaktion verlief mit 43%iger Ausbeute. Es wurde ein hellbrauner Feststoff erhalten, der sich beim Bestrahlen mit UV-Licht blau verfärbte, was als Hinweis auf die Entstehung eines Spiropyrans gesehen werden kann.

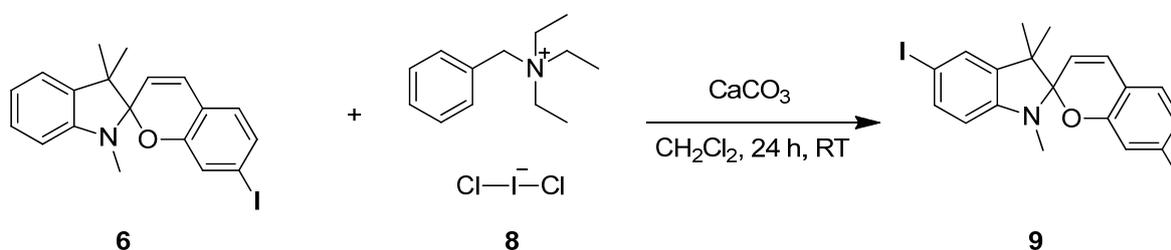


Um im nachfolgenden Reaktionsschritt eine Palladium-katalysierte C-C-Kreuzkupplung an zwei geeigneten Stellen am Molekül durchzuführen, musste ein weiteres Iodatom am Indolin-Benzolring eingeführt werden. Iod-substituierte Indoline als Vorläufer für eine Kondensation zum Spiropyran waren nicht kommerziell erhältlich.

Die Iodierung am Spiropyran mit Benzyltriethylammoniumdichloriodat und Calciumcarbonat ist für das Nitroderivat von **6** literaturbeschrieben^[93] und verläuft laut Literatur mit 63%iger Ausbeute. Eine Iodierungsreaktion sollte in der Folge analog mit Spiropyran **6** durchgeführt werden. Vor der Iodierungsreaktion musste zunächst das Iodierungsreagenz dargestellt werden, hierfür sind zwei unterschiedliche Wege beschrieben,^[94] die von Natriumiodid bzw. Iod ausgehen:

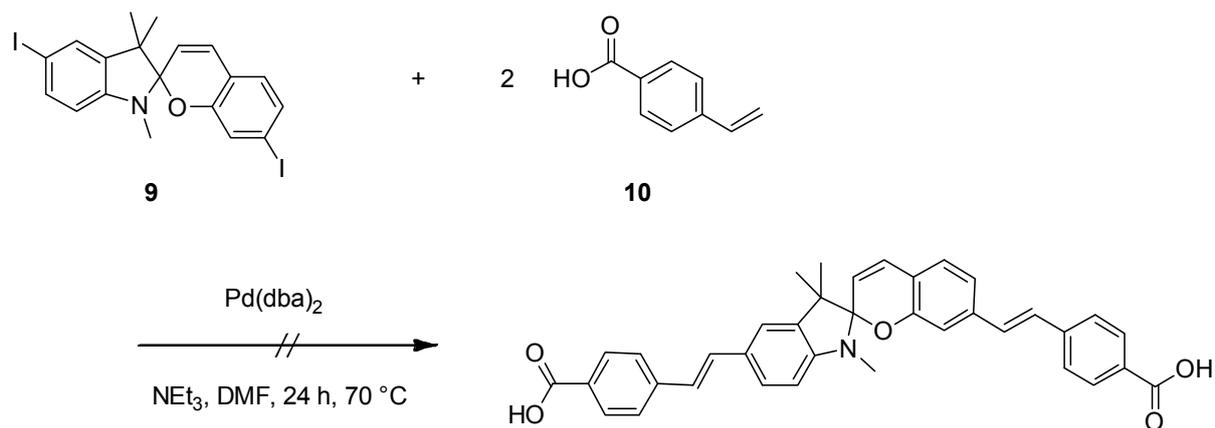


Zunächst wurde versucht, das Dichloriodat **8** über den Reaktionsweg mit Iod darzustellen. Die Analyse des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Reaktionsproduktes ergab, dass nicht das gewünschte Produkt entstanden war, so dass der Darstellungsweg über Natriumiodid gewählt wurde. Im Folgenden wurde Spiropyran **6** mit **8** und Calciumcarbonat zur Reaktion gebracht.



Der Versuch, das Reaktionsprodukt säulenchromatographisch zu reinigen, erwies sich auch bei der Verwendung unterschiedlicher Laufmittelgemisch-Zusammensetzungen wegen nahezu identischen Laufverhaltens als schwierig. Die $^1\text{H-NMR}$ -Analyse von **9** ergab Verunreinigungen, so dass nicht eindeutig die Entstehung des Reaktionsproduktes nachgewiesen werden konnte. Im Massenspektrum war der Molekülpeak zu finden, in der nachfolgenden Heck-Reaktion wurde daher das Rohprodukt eingesetzt.

In der Heck-Reaktion wurde versucht, das Diiodspiropyran **9** mit 4-Vinylbenzoesäure (**10**) umzusetzen.^[95]



Die Reaktion wurde unter Standard-Heck-Bedingungen unter Argonatmosphäre durchgeführt. DC-Analyse (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1) ergab jedoch keinen Umsatz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine weiteren Synthesearbeiten zur Darstellung eines molekularen Einzelmolekül-Schalters für die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie durchgeführt; für die folgenden Messungen wurde das kommerziell erhältliche 4,4'-Dicarboxyazobenzol als molekularer Schalter eingesetzt (siehe Abschn. 2.4.2).

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit waren zunächst organisch-synthetische Arbeiten zur Darstellung eines Spiropyrans, das als Einzelmolekül-Mechanophor dienen soll, durchzuführen. Hierbei konnte ein Spiropyran erhalten werden, das nach noch ausstehender Palladiumkomplex-katalysierter C-C-Kreuzkupplungsreaktion mit einem geeigneten Partner als molekularer Schalter dienen kann. Durch entsprechende Wahl eines Kupplungspartners sollte es möglich sein, unterschiedliche funktionelle Gruppen für die Oberflächenanbindung, z. B. Trialkoxysilyl- oder Thiol-Gruppen, über verschiedene Spacer, z. B. Polyethylenglycolketten, ins Molekül einzuführen. Hiermit ließe sich erstmals ein Spiropyran zur Verwendung als mechanisch/optisch schaltbarer Einzelmolekül-Schalter in einem Force-Clamp-Experiment mit dem AFM darstellen.

Nach Inbetriebnahme des neuen Kieler „MFP-3D Bio“-AFMs (Fa. Asylum Research, Santa Barbara) wurden zunächst Force-Ramp-Messungen an Carboxymethylamylose/DETA durchgeführt, um die Messergebnisse mit denen des „NanoWizard“-AFMs (Fa. JPK Instruments, Berlin) der Arbeitsgruppe des Kooperationspartners Prof. Dr. Clausen-Schaumann an der Fachhochschule München zu vergleichen. Eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf beiden Messgeräten konnte erfolgreich gezeigt werden. Darüber hinaus wurden weitere Force-Ramp-Messungen bei höherer Kraftladungsrate durchgeführt und die relevanten Parameter des Arrhenius-Kinetik-Modells extrahiert.

Im nächsten Schritt war die für die mechanische/optische Schaltung von Molekülen notwendige Messtechnik des Force-Clamps an kovalent verankerten Molekülen zu etablieren. Hierzu wurden – zunächst nicht-temperaturgeregelte – Messungen an Carboxymethylamylose bei pH 2.0 und Messungen mit 4,4'-Dicarboxyazobenzol und einem langkettigen PEG-Spacer bei pH 7.4 durchgeführt und die Geschwindigkeitskonstanten, die Gewichtungsfaktoren sowie die Moleküllängenverteilungen bestimmt. Weiterhin wurde der zeitliche Messverlauf in Hinblick auf eine Änderung der Geschwindigkeitskonstanten sowie der Einfluss des Umgebungsmediums, Wasser oder PBS-Puffer-Lösung, auf die Messungen untersucht. Die Messparameter während des Force-Clamps wurden im Hinblick auf die Detektion des Schaltens eines einzelnen kovalent verankerten Mechanophors wie Azobenzol oder Spiropyran optimiert. Abschließend wurden mit der neu beschafften temperaturgeregelten Messzelle temperaturstabilisierte Messungen am Azobenzol-/PEG-Spacer-System sowie Carboxymethylamylose bei pH 7.4 durchgeführt und die Messreihen auf die o. g. Aspekte hin untersucht.

Für alle erhaltenen Auswertungskurven erhielt man stets biexponentielles Verhalten. Die Messkurven wurden mit dem „Maximum Likelihood“-Schätzverfahren^[80] und einer biexponentiellen „Least Squares“-Kurvenanpassung ausgewertet, wobei die „Maximum Likelihood“-Ergebnisse als Startwerte für die Kurvenanpassung genommen wurden.

Beim Azobenzol-/PEG-Silan-System ist der Gewichtungsfaktor A_1 fast immer kleiner als A_2 , d. h., der Beitrag des Prozesses mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 ist größer als der Beitrag mit k_1 . Die Tendenz im Arrhenius-Diagramm war bei 500 pN Haltekraft entgegen der Erwartung zunehmend, was auf eine negative Aktivierungsbarriere hindeutet. Für k_1 bei 750 pN erhielt man eine abnehmende Tendenz, für k_2 wiederum eine positive Steigung. Bei 1.00 nN wurden nach der „Maximum Likelihood“-Methode für beide Geschwindigkeitskonstanten negative Steigungen in den Arrhenius-Diagrammen erhalten. Weitere Experimente zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie Messungen bei weiteren Temperaturen sollten hier mehr Klarheit bringen.

Bei der Untersuchung der Moleküllängenverteilungen ließen sich die Anbindungen von einem und zwei PEG-Silanen erkennen; wurde kein Azobenzol hinzugegeben, beobachtete man die Anbindung nur eines PEG-Silans. Dem zeitlichen Messverlauf war zu entnehmen, dass in den Messungen zunächst die langlebigeren und dann die kurzlebigeren Bindungen gebrochen wurden, entgegen der Tendenz beim CMA-/DETA-System.

Bei den temperaturstabilisierten Messungen mit CMA/DETA erhielt man bei Temperaturerhöhung eine Zunahme von k_1 und k_2 . Die Moleküllängenverteilungsanalyse ergab eine Vorzugslänge von ca. 200 nm.

Für die Zukunft ist eine weitergehende Analyse der bisher kraftspektroskopisch untersuchten Oberflächen durch weitere Oberflächen-Analysemethoden wie Ellipsometrie, Kontaktwinkel-messungen, XPS, IR-Spektroskopie etc. sinnvoll, um nähere Einblicke in die Zusammensetzung der untersuchten Oberflächen zu erhalten. Die Einzelmolekül-Kraftspektroskopie ergänzt das bestehende Repertoire der Oberflächenanalyseverfahren dabei um eine wertvolle neue Methodik, da z. B. über die Anbindungshäufigkeit Aussagen über die chemische Zusammensetzung von Oberflächen getroffen werden können.^[53]

Von Moore^[45] wurden Spiropyran-Moleküle in eine Polymermatrix eingebracht und das Polymer einer makroskopischen Zugspannung ausgesetzt. Hierbei wurden die Spiropyran-Moleküle in die Merocyanin-Form überführt, was an der makroskopischen Verfärbung des Polymers zu erkennen war. Für die Zukunft eröffnet sich hiermit das Gebiet der Mechanoindikatoren, die in Zukunft z. B. zur Erkennung von Materialermüdungserscheinungen eingesetzt

werden könnten. Ein weiteres faszinierendes Gebiet sind die sogenannten selbstheilenden Materialien, bei denen die durch mechanische Beanspruchung entstehenden Radikale eine Reaktion einleiten, die schließlich zum Verschließen des entstandenen Risses führt.^[2] All diese Phänomene sind mechanochemischer Natur und bedürfen zum Verständnis Einzelmolekülkraftspektroskopischer Analysen, für die das AFM als Spektrometer in idealer Weise geeignet ist.

Da diejenige Bindung, welche beim Anlegen der Zugspannung schließlich reißt, nur indirekt durch quantenchemische Rechnungen ermittelt werden kann, ist ein experimenteller Aufbau wünschenswert, aus dem die gerissene Bindung direkt im Experiment bestimmt werden kann. Vielversprechend ist hierbei das Schlaufenkonzept von Fernandez (siehe Abschn. 2.4.1), bei dem die schwächste Bindung vor einer Schlaufe liegt und die durch Riss der Bindung erhaltene Längenänderung, die genau der Länge der Schlaufe entspricht, gemessen wird. Hierdurch wird der Beweis erbracht, dass tatsächlich die vor der Schlaufe liegende Bindung gerissen ist. Bisher wurde dieses Konzept von Fernandez nur für bimolekulare Reduktionen von Disulfidbrücken eingesetzt, auch, da die Oberflächenverankerung über mechanisch vergleichsweise instabile Thiole erfolgte. Für die breitere Anwendung des Schlaufenkonzepts und zur Abkehr vom Riss der Silicium-Kohlenstoff-Bindung sinnvoll wäre die Entwicklung alternativer Anbindungsverfahren an Cantilever und Oberfläche. Ein prestigeträchtiges Ziel hierbei ist sicherlich die mechanische Spektroskopie der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung am einzelnen Molekül.

Eine weitere Messvariante, mit der die gesamte Kinetik aus einer einzigen Messung extrahiert werden kann, stellt die Messung mit einem Polymer wie *gem*-Dichlorcyclopropan^[96] dar (siehe Abb. 99, 100). Hierbei werden nach und nach in einem kinetischen Prozess die Cyclopropaneinheiten aufgebrochen, und man erhält somit bei ausreichender Anzahl an Monomerbausteinen die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung aus im Idealfall einer einzigen erfolgreichen Messung. Hierbei zeigt sich einmal mehr die Stärke der Force-Clamp-Messtechnik. Beschränkender Faktor bei dieser Art der Kinetikmessung ist grundsätzlich die Verfügbarkeit der entsprechenden Polymere.

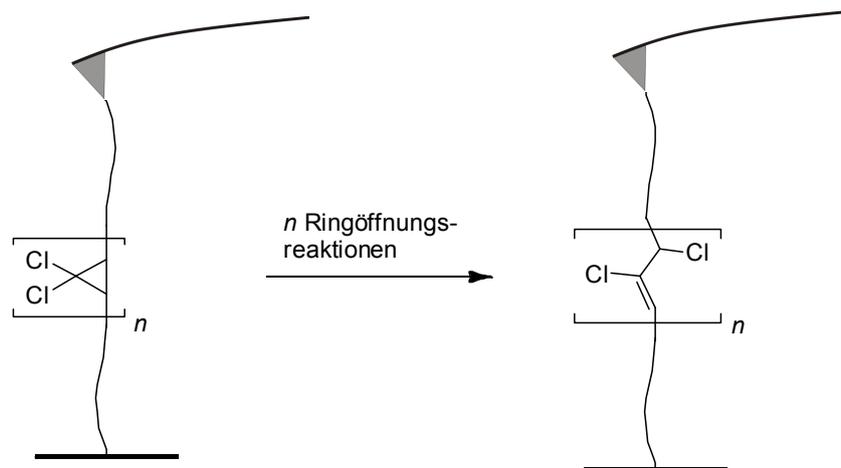


Abb. 99. Schematische Darstellung der Ringöffnungsreaktionen vom *gem*-Dichlorcyclopropanpolymer zum 2,3-Dichloralkenpolymer.

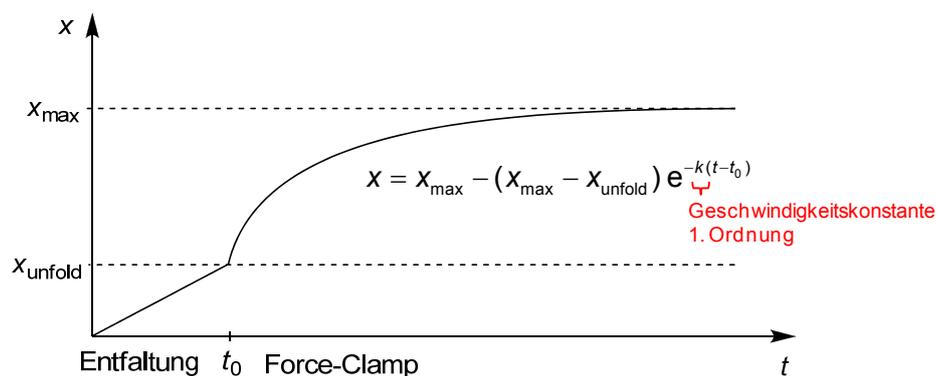


Abb. 100. Zu erwartende, idealisierte Auslenkungs-Zeit-Kurve einer Messung mit einem Polymer wie Poly-*gem*-Dichlorcyclopropan mit der Formel zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung nach Beyer.^[97]

Für die Zukunft wünschenswert ist sicherlich auch die Messung in wasserfreiem Medium, um den Einfluss des Lösungsmittels auf den Bindungsriß zu untersuchen sowie um den Prozess einer Hydrolyse der gespannten Bindung ggf. ausschließen zu können. Ein beschränkender Faktor ist hierbei momentan noch die Lösungsmittelverträglichkeit der AFM-Komponenten, besonders der Dichtungsringe, die mit der Flüssigkeit in Kontakt stehen, da diese z. B. noch keine ausreichende Stabilität gegenüber Dimethylsulfoxid aufweisen (die zentralen Bauteile

bestehen u. a. aus „Viton“ oder Siliconkautschuk, die beide eine geringe Dimethylsulfoxid-Verträglichkeit zeigen). Dadurch, dass die temperaturgeregelte Messzelle des „BioHeaters“ mit einer Klammer dicht abgeschlossen werden kann, besteht prinzipiell auch die Möglichkeit, in leichter flüchtigen Lösungsmitteln zu messen, wenngleich eine möglichst geringe Toxizität des verwendeten Lösungsmittels trotzdem wünschenswert ist, da zumindest durch den Druckausgleichsschlauch aus der Zelle stets auch Lösungsmittel in die Laborluft entweichen kann. Durch geeignete Absaugmaßnahmen sowie ggf. die Nachführung frischen Lösungsmittels in den „BioHeater“ durch einen der Ansatzstutzen sollte dieses Problem jedoch in den Griff zu bekommen sein.

Weiterhin ist es für weitere Messungen interessant, unter Sauerstoffausschluss im entgasten Lösungsmittel zu messen, um ggf. den Einfluss einer Sauerstoffradikal-Anlagerung an die gespannte Bindung ausschließen zu können.

5 Experimentelle Vorbereitung der Messungen

5.1 Reinigung vor der Silanisierung

Reinigung der Cantilever: Die Cantilever wurden 1.5 h unter einer intensitätsstarken UV-Lampe (Ozonerzeugung) unter atmosphärischen Bedingungen gereinigt. Anschließend wurden sie kurz in Ethanol und dann vor Einsetzen des Trocknungsprozesses in die reaktive Silanlösung getaucht. Beim Eintauchen in die Lösungen war darauf zu achten, die Cantilever möglichst nur geringen Oberflächenkräften auszusetzen, was am Besten durch seitliches Eintauchen und Herausziehen gelang.

Reinigung der Objektträger: Alle Objektträger, die im „BioHeater“ verwendet werden sollten, wurden zunächst mit Aceton und Ethanol abgespült. Alle Objektträger wurden 1 h mit verdünnter Salzsäure benetzt und anschließend 30 min mit verdünnter Salzsäure im Ultraschallbad behandelt. Dann wurden die Objektträger dreimal je 10 min mit destilliertem Wasser im Ultraschallbad behandelt und mit destilliertem Wasser abgespült.

5.2 Silanisierung

Es wurde eine Mischung aus 95 mL Ethanol und 5 mL destilliertem Wasser hergestellt, der pH-Wert mit Eisessig auf pH 5 eingestellt und 2 mL (7.8 mmol) DETA (alternativ 10 mg [2.9 μ mol] PEG-Silan) hinzugegeben. Cantilever und Objektträger wurden mit der Reaktionsmischung benetzt und 1 h bei Zimmertemperatur zur Reaktion gebracht. Die Cantilever und die Objektträger wurden mit Ethanol gewaschen und 20 min bei 110 °C im Trockenschrank behandelt. Cantilever und Objektträger wurden höchstens eine Woche lang im Exsikkator aufbewahrt.

5.3 Reaktionsprotokoll bei pH 7.4

In 1 mL destilliertem Wasser (alternativ PBS-Puffer) wurden 10 mg Natriumcarboxymethylamylose (CMA) (alternativ 5 mg [0.019 mmol] 4,4'-Dicarboxyazobenzol), 10 mg (0.005–

0.015 mmol) 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (polymergebunden, 2 % vernetzt mit 1,4-Divinylbenzol, Beladung 0.5–1.5 mmol/g) (EDC) und 5 mg (0.045 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) suspendiert. Die Reaktionsmischung wurde 10 min geschüttelt. Der Objektträger wurde mit der Suspension benetzt, 10 min bei Zimmertemperatur zur Reaktion gebracht und mit destilliertem Wasser (alternativ PBS-Puffer) unter Druck abgespült.

5.4 Reaktionsprotokoll bei pH 2.0

1 mL destilliertes Wasser (alternativ PBS-Puffer) wurde mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2.0 gebracht. In der Mischung wurden 10 mg Natriumcarboxymethylamylose (CMA) (alternativ 5 mg [0.019 mmol] 4,4'-Dicarboxyazobenzol) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 10 min geschüttelt. Der Objektträger wurde mit der Lösung benetzt, 10 min bei Zimmertemperatur zur Reaktion gebracht und mit destilliertem Wasser (alternativ PBS-Puffer) unter Druck abgespült.

6 Synthesevorschriften

Verwendete Chemikalien

Benzyltriethylammoniumchlorid, > 98 %, Fa. Fluka

Bis(dibenzylidenaceton)palladium(0), Fa. Sigma-Aldrich

Calciumcarbonat, *techn.*, Laborbestand

Chloroform, *dest.*, Laborbestand

Cyclohexan, *dest.*, Laborbestand

4,4'-Dicarboxyazobenzol, 95 %, Fa. ABCR

Dichlormethan, *dest.*, Laborbestand

N,N-Dimethylformamid, ≥ 99.5 %, Fa. Fluka

Eisessig, *techn.*, Laborbestand

Ethanol, ≥ 98.8 %, Fa. Carl Roth

1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimid (EDC), *polymergebunden*, 2 % vernetzt mit
1,4-Divinylbenzol, Fa. Sigma-Aldrich

Ethylendiamin, *p. a.*, Fa. Sigma-Aldrich

N-Hydroxysuccinimid (NHS), 98 %, Fa. Sigma-Aldrich

Iodmonochlorid, 1 M in Dichlormethan, Fa. Sigma-Aldrich

Iodmonochlorid, 98 %, Fa. Sigma-Aldrich

Methanol, *dest.*, Laborbestand

Natriumbisulfit, *techn.*, Laborbestand

Natriumcarbonat, *techn.*, Laborbestand

Natriumcarboxymethylamylose (CMA), *techn.*, Fa. Sigma-Aldrich

Natriumchlorid, *p. a.*, Laborbestand

Natriumhydroxid, *techn.*, Laborbestand

Natriumhypochlorit, 13 % in Wasser, Laborbestand

Natriumiodid, *techn.*, Laborbestand

Natriumsulfat, *techn.*, Laborbestand

Natriumsulfit, *techn.*, Laborbestand

PBS-Puffer, *techn.*, Fa. Sigma-Aldrich (pH 7.4; 0.685 mmol/L Natriumchlorid, 50 mmol/L

Phosphatpuffer, 13.5 mmol/L Kaliumchlorid)
Salicylaldehyd, > 98 %, Fa. Fluka
Salpetersäure, konz., *techn.*, Laborbestand
Salzsäure, 2 M, *techn.*, Laborbestand
Salzsäure, konz., *techn.*, Laborbestand
Triethoxy-PEG-Silan, *techn.*, MW 3400 u, Fa. Nanocs
2-[2-(3-Trimethoxysilylpropylamino)ethylamino]ethylamin (DETA), *techn.*, Fa. Sigma-Aldrich
1,3,3-Trimethyl-2-methylenindolin, ≥ 96.0 %, Fa. Fluka
4-Vinylbenzoesäure, 97 %, Fa. Sigma-Aldrich

In der organischen Analytik eingesetzte Spektrometer

FT-NMR-Spektrometer „AC 200“, Fa. Bruker, Karlsruhe (200 MHz)
FT-NMR-Spektrometer „ARX 300“, Fa. Bruker, Karlsruhe (300 MHz)
FT-NMR-Spektrometer „DRX 500“, Fa. Bruker, Karlsruhe (500 MHz bzw. 126 MHz)

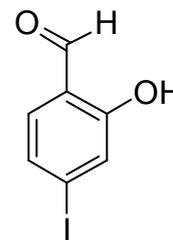
Massenspektrometer (ESI) „Esquire-LC 76“, Fa. Bruker Daltonik, Bremen

FT-IR-Spektrometer „Spectrum 100“, Fa. Perkin–Elmer, Überlingen, mit
„MKII Golden Gate Single Reflection ATR System“, Fa. Specac, Slough

Elementaranalysengerät „EuroEA3000“, Fa. EuroVector, Mailand

6.1 4-Iodsalicylaldehyd (2)

Zu einer Mischung von 12.4 mL (0.12 mol) Salicylaldehyd (1) und 70 mL Dichlormethan wurde über 2 h eine Mischung von 5.8 mL (0.12 mol) Iodmonochlorid und 35 mL Dichlormethan bei Zimmertemperatur hinzuge tropft. Der Ansatz wurde über Nacht gerührt, und 100 mL einer gesättigten wässrigen Lösung von Natriumsulfit wurden hinzugegeben. Die Phasen wurden getrennt, und die organische Phase wurde mit 150 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus je 150 mL Cyclohexan umkristallisiert. Man erhielt gelbe, nadelförmige Kristalle.

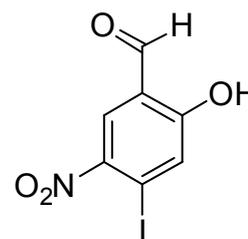


Ausbeute: 12.8 g (43 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 10.94$ (d, $^4J = 0.4$ Hz, 1 H; CHO), 9.83 (d, $^4J = 0.6$ Hz, 1 H; OH), 7.84 (m_c, 1 H; 3-H), 7.76 (m_c, 1 H; 6-H), 6.79 ppm (m_c, 1 H; 5-H)

6.2 4-Iod-5-nitrosalicylaldehyd (3)

3.32 g (13.4 mmol) 4-Iodsalicylaldehyd (2) wurden in 20 mL Eisessig gelöst und 5 mL rauchende Salpetersäure hinzuge tropft. Die Reaktionsmischung wurde 4 h bei Zimmertemperatur gerührt, mit 500 mL Wasser verdünnt und mit verdünnter Natronlauge neutralisiert. Der Ansatz wurde dreimal mit je 200 mL Chloroform extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

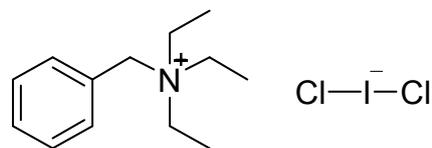


Ausbeute: 1.41 g (37 %) (Lit.:^[91] 63 %)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 10.28$ (bs, 1 H; CHO), 10.03 (bs, 1 H; OH), 8.45 (m_c, 1 H; 6-H), 8.31 ppm (m_c, 1 H, 3-H)

6.3 Benzyltriethylammoniumdichloriodat (8) (Syntheseweg I)

0.67 g (4.5 mmol) Natriumiodid und 6 mL konz. Salzsäure wurden zusammengegeben. Der Ansatz wurde auf 0 °C gekühlt und 2 mL einer 13%igen Natriumhypochlorit-Lösung hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde tropfenweise zu einer Lösung von 2.03 g (8.92 mmol) Benzyltriethylammoniumchlorid (7) in 5 mL Wasser gegeben. Hierbei fiel ein gelber Feststoff aus. Der Feststoff wurde abfiltriert und mehrere Stunden im Vakuum getrocknet.

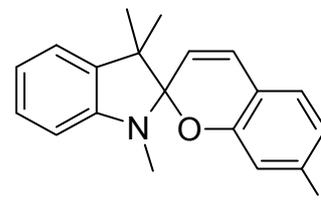


Ausbeute: 1.98 g (57 %) (Lit.:^[94] 99 %)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.60–7.30 (m, 5 H; arom. H), 1.50 (q, 9 H; CH₃), 1.30 ppm (t, 6 H; CH₂)

6.4 Einfach iodiertes Spiropyran ohne Nitrogruppe (6)

4.3 g (17 mmol) 4-Iodsalicylaldehyd (2) wurden in 180 mL Ethanol gelöst und 3 mL (17.3 mmol) 1,3,3-Trimethyl-2-methylenindolin (4) hinzugegeben. Der Ansatz wurde 3 h auf 70 °C unter Argon-Atmosphäre erhitzt. Die Farbe der Lösung schlug dabei von rot nach violett um, und es fiel ein Feststoff aus. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Rohprodukt in der Wärme in 10–20 mL Chloroform aufgenommen. Nach mehreren Stunden fiel aus der Lösung ein Feststoff aus. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und der feste Rückstand mehrfach mit Chloroform extrahiert. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Cyclohexan/Dichlormethan, 2:1, R_f = 0.60) gereinigt. Man erhielt einen hellbraunen Feststoff.



Ausbeute: 2.97 g (43 %)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.34 (m_c, 2 H; arom. H), 7.17 (m_c, 1 H; arom. H), 7.06 (m_c, 1 H; arom. H), 6.84 (m_c, 1 H; arom. H), 6.76 (d, ³J = 10.2 Hz, 1 H; CH), 6.52 (m_c, 1 H;

arom. *H*), 6.49 (m_c, 1 H; arom. *H*), 5.70 (d, ³*J* = 10.3 Hz, 1 H; *CH*), 2.71 (s, 3 H; *NCH*₃), 1.28 (s, 3 H; *CH*₃), 1.15 ppm (s, 3 H; *CH*₃)

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 154.35 (quart. C), 148.02 (quart. C), 138.20, 136.52 (quart. C), 134.99, 128.23, 127.65, 121.50, 121.28 (quart. C), 120.50, 119.30, 117.40, 106.85, 104.54 (quart. C), 81.40 (quart. C), 51.90 (quart. C), 28.89, 25.83, 20.09 ppm

MS (ESI, MeOH): *m/z* (%) = 404 (84) [*M*+*H*]⁺

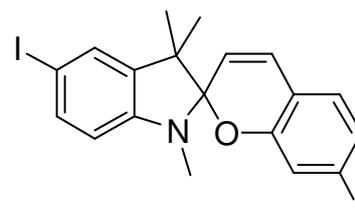
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2964 (w), 1651 (w), 1607 (m), 1487 (s), 1471 (s), 1363 (s), 1305 (m), 1251 (s), 1183 (m), 1157 (m), 1124 (s), 1105 (s), 1019 (s), 952 (s), 888 (m), 870 (s), 810 (s), 778 (m), 741 (s)

Elementaranalyse: C₁₉H₁₈INO (403.04 u), ber.: C: 56.59 %, H: 4.50 %, N: 3.47 %.; gef.: C: 58.4 %, H: 4.93 %, N: 3.70 %

Das ¹H-NMR-Spektrum der Substanz zeigte noch leichte Verunreinigungen mit Wasser und Lösungsmittel.

6.5 Zweifach iodiertes Spiropyran (9)

0.89 g (2.20 mmol) des einfach iodierten Spiropyrans **6** wurden in 100 mL Dichlormethan gelöst und 0.45 g (4.50 mmol) Calciumcarbonat hinzugegeben. 1.27 g (3.26 mmol) Benzyltriethylammoniumdichloriodat (**8**) wurden in 50 mL Dichlormethan gelöst und langsam hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 24 h bei Zimmertemperatur unter Argon-Atmosphäre gerührt. Der Ansatz wurde filtriert und 150 mL Wasser hinzugegeben. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase mit 150 mL 5%iger Natriumbisulfatlösung, 150 mL Wasser und 150 mL gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Man erhielt einen dunkelroten Feststoff.



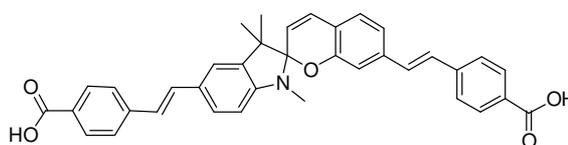
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 7.48–6.26 (m, 7 H; arom. *H*, *CH*), 5.67 (m_c, 1 H; *CH*), 2.67 (s, 3 H; *NCH*₃), 1.25 (s, 3 H; *CH*₃), 1.15 ppm (s, 3 H; *CH*₃)

MS (ESI, MeOH): m/z (%) = 529 (5) $[M+H]^+$

Da nur das Rohprodukt von **9** isoliert wurde, ist keine weitergehende Analytik von **9** durchgeführt worden.

6.6 Versuch der Synthese des zweifach iodierten Spiropyrans (**9**) mit 4-Vinylbenzoesäure (**10**)

800 mg (ca. 0.29 mmol) Diiodspiropyran (Rohprodukt) (**9**), 860 mg (5.81 mmol) 4-Vinylbenzoesäure (**10**), 89.0 mg Bis(dibenzylidenace-



ton)palladium(0) und 430 μL Triethylamin wurden in 50 mL *N,N*-Dimethylformamid gelöst. Die Reaktionsmischung wurde 24 h auf 80 °C unter Argonatmosphäre erhitzt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. DC-Analyse (Cyclohexan/Ethylacetat, 1:1) ergab keinen Umsatz.

7 Einfache Kopplungschemie zur Anbindung von Carbonsäuren an Siliciumdioxid-Oberflächen unter sauren Bedingungen

”Simple Coupling Chemistry Linking Carboxyl-Containing Organic Molecules to Silicon Oxide Surfaces under Acidic Conditions“

S. W. Schmidt, T. Christ, C. Glockner, M. K. Beyer, H. Clausen-Schaumann
Langmuir **2010**, 26, 15333–15338.

Reproduced with permission from *Langmuir* **2010**, 26, 15333–15338.

Copyright 2010 American Chemical Society

DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/la102435f>

Zu dieser Veröffentlichung wurden folgende Punkte beigetragen:

- Schema 1, das die EDC-/NHS-vermittelte Amidbindungsbildung zwischen einer Aminofunktionalisierten Oberfläche und Carboxymethylamylose zeigt
- Die Interpretation, dass es sich bei der Reaktion von Carboxymethylamylose mit den Oberflächen sehr wahrscheinlich um eine säurekatalysierte Esterbildung handelt
- Zur Untermauerung dieser Annahme wurde vorgeschlagen, den pH-Wert einer erfolgreichen Messreihe mit Natriumhydroxid stark zu erhöhen

Simple Coupling Chemistry Linking Carboxyl-Containing Organic Molecules to Silicon Oxide Surfaces under Acidic Conditions

Sebastian W. Schmidt,^{†,‡,§} Timo Christ,[†] Christian Glockner,[‡] Martin K. Beyer,^{*,‡} and Hauke Clausen-Schaumann^{*,‡,§}

[†]Department of Precision- and Micro-Engineering, Engineering Physics, Munich University of Applied Sciences, Lothstr. 34, 80335 Munich, Germany, [‡]Institut für Physikalische Chemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Olshausenstr. 40, 24098 Kiel, Germany, and [§]Center for NanoScience (CeNS), Geschwister-Scholl-Platz 1, 80539 Munich, Germany

Received June 15, 2010. Revised Manuscript Received August 6, 2010

The coupling chemistry of carboxymethylated amylose with organo-silanized silicon oxide surfaces at pH 7.4 and 2.0 was investigated using atomic force microscopy (AFM) based single-molecule force spectroscopy. At close to neutral pH, carbodiimide activation of a carboxylic acid affords formation of an amide bond with an amino surface linker. At pH 2.0, no activation with carbodiimide was required to anchor carboxymethylated amylose between an AFM tip and a glass substrate. At the same time, the mean bond rupture force f_r dropped from 1.65 ± 0.37 nN at pH 7.4 to 1.39 ± 0.30 nN at pH 2.0 without carbodiimide, indicating that a different link to the surface can be formed at low pH. The coupling mechanism at pH 2.0 was elucidated by a series of experiments, in which the surface was functionalized with four different organosilanes, each containing characteristic functional groups. The results are rationalized with an acid-catalyzed ester condensation between a carboxyl group and a free, unreacted silanol group in the surface anchor or on the surface.

Introduction

The use of organosilanes as versatile linkers between organic molecules and inorganic surfaces covers a wide range of technological applications ranging from enhanced surface coatings^{1–3} to the fabrication of functional self-assembled monolayers^{4–6} and the immobilization of biomaterials.^{7–12} The latter is frequently achieved via organosilane compounds with terminal amines. Such

amino-functionalized surfaces are able to form stable amide bonds and are therefore used for the adsorption of DNA,^{13–16} protein immobilization,^{10,17–19} and the coupling of polymers.^{20–22}

Usually, a stable chemical link between silanes and an inorganic surface, for example, a silica substrate, is obtained by hydrolytic deposition, that is, the hydrolysis of the alkoxy substituents of the organosilanes followed by a condensation reaction of the remaining hydroxyl and a silanol group of the substrate surface. The hydrolyzable alkoxy groups are commonly either methoxy or ethoxy groups.²³ It is believed that on amorphous silicon oxide surfaces usually only one of the typically three identical alkoxy substituents forms a covalent bond to the substrate.²⁴ The two remaining groups are either present in condensed form, that is, forming siloxane bonds with adjacent silane molecules, or remain as unreacted silanol groups.^{25–28}

*To whom correspondence should be addressed. (H.C.-S.) E-mail: clausen-schaumann@hm.edu. Telephone +49(0)89-1265 1671. Fax +49(0)89-1265 1480. (M.K.B.) E-mail: beyer@phc.uni-kiel.de. Telephone +49(0)431-880 2831. Fax +49(0)431-880 1480.

(1) Hozumi, A.; Ushiyama, K.; Sugimura, H.; Takai, O. *Langmuir* **1999**, *15*, 7600–7604.

(2) Song, X. Y.; Zhai, J.; Wang, Y. L.; Jiang, L. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 4048–4052.

(3) Lai, Y. K.; Lin, C. J.; Huang, J. Y.; Zhuang, H. F.; Sun, L.; Nguyen, T. *Langmuir* **2008**, *24*, 3867–3873.

(4) Schwartz, D. K. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, *52*, 107–137.

(5) Zhang, F. X.; Srinivasan, M. P. *Langmuir* **2004**, *20*, 2309–2314.

(6) Calhoun, M. F.; Sanchez, J.; Olaya, D.; Gershenson, M. E.; Podzorov, V. *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 84–89.

(7) Bensimon, A.; Simon, A.; Chiffaudel, A.; Croquette, V.; Heslot, F.; Bensimon, D. *Science* **1994**, *265*, 2096–2098.

(8) Fritz, M.; Radmacher, M.; Cleveland, J. P.; Allersma, M. W.; Stewart, R. J.; Gieselmann, R.; Janmey, P.; Schmidt, C. F.; Hansma, P. K. *Langmuir* **1995**, *11*, 3529–3535.

(9) Elender, G.; Kühner, M.; Sackmann, E. *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 565–577.

(10) Bohanon, T.; Elender, G.; Knoll, W.; Köberle, P.; Lee, J. S.; Offenhäuser, A.; Ringsdorf, H.; Sackmann, E.; Simon, J.; Tovar, G.; Winnik, F. M. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **1996**, *8*, 19–39.

(11) Nakagawa, T.; Tanaka, T.; Niwa, D.; Osaka, T.; Takeyama, H.; Matsunaga, T. *J. Biotechnol.* **2005**, *116*, 105–111.

(12) Wang, G.; Otuonye, A. N.; Blair, E. A.; Denton, K.; Tao, Z. M.; Asefa, T. *J. Solid State Chem.* **2009**, *182*, 1649–1660.

(13) Kneuer, C.; Sameti, M.; Haltner, E. G.; Schiestel, T.; Schirra, H.; Schmidt, H.; Lehr, C.-M. *Int. J. Pharm.* **2000**, *196*, 257–261.

(14) Charles, P. T.; Vora, G. J.; Andreadis, J. D.; Fortney, A. J.; Meador, C. E.; Dulcey, C. S.; Stenger, D. A. *Langmuir* **2003**, *19*, 1586–1591.

(15) Albrecht, C.; Blank, K.; Lalic-Multhaler, M.; Hirler, S.; Mai, T.; Gilbert, I.; Schiffmann, S.; Bayer, T.; Clausen-Schaumann, H.; Gaub, H. E. *Science* **2003**, *301*, 367–370.

(16) Park, M. E.; Chang, J. H. *Mater. Sci. Eng., C* **2007**, *27*, 1232–1235.

(17) Kacher, C. M.; Weiss, I. M.; Stewart, R. J.; Schmidt, C. F.; Hansma, P. K.; Radmacher, M.; Fritz, M. *Eur. Biophys. J.* **2000**, *28*, 611–620.

(18) Ma, M.; Zhang, Y.; Yu, W.; Shen, H.-Y.; Zhang, H.-Q.; Gu, N. *Colloids Surf., A* **2003**, *212*, 219–226.

(19) Heyes, C. D.; Kobitski, A. Y.; Amirgoulova, E. V.; Nienhaus, G. U. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 13387–13394.

(20) Grandbois, M.; Beyer, M.; Rief, M.; Clausen-Schaumann, H.; Gaub, H. E. *Science* **1999**, *283*, 1727–1730.

(21) Kenausis, G. L.; Voros, J.; Elbert, D. L.; Huang, N.; Hofer, R.; Ruiz-Taylor, L.; Textor, M.; Hubbell, J. A.; Spencer, N. D. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 3298–3309.

(22) Schmidt, S. W.; Beyer, M. K.; Clausen-Schaumann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3664–3668.

(23) Sanchez, C.; Julian, B.; Belleville, P.; Popall, M. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3559–3592.

(24) Iarlori, S.; Ceresoli, D.; Bernasconi, M.; Donadio, D.; Parrinello, M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8007–8013.

(25) Arkles, B. *CHEMTECH* **1977**, *7*, 766–778.

(26) Köhler, J.; Chase, D. B.; Farlee, R. D.; Vega, A. J.; Kirkland, J. J. *J. Chromatogr.* **1986**, *352*, 275–305.

(27) Kamisetty, N. K.; Pack, S. P.; Nonogawa, M.; Devarayapalli, K. C.; Kodaki, T.; Makino, K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 1649–1655.

(28) Smith, A. E.; Chen, W. *Langmuir* **2008**, *24*, 12405–12409.

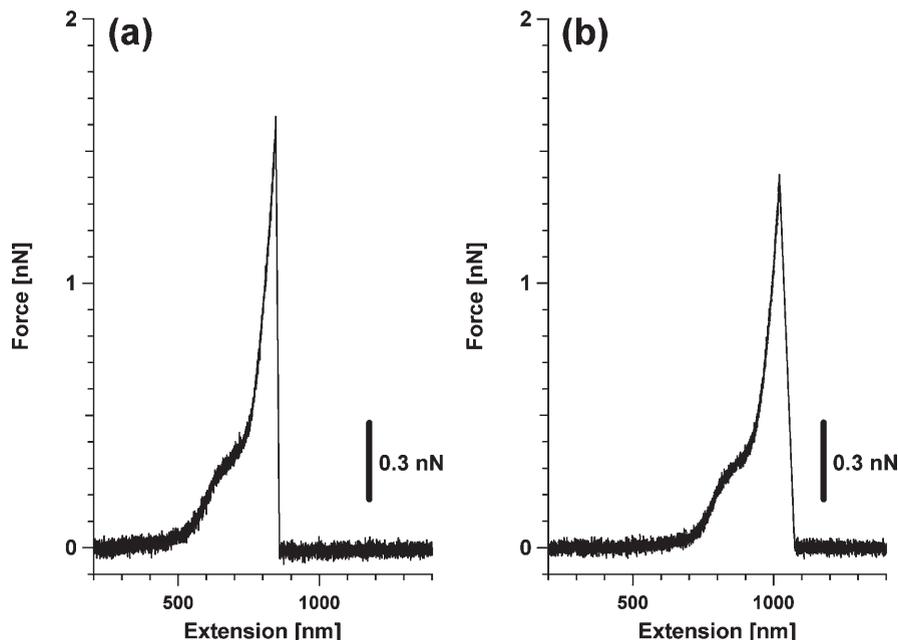


Figure 1. Two force–extension curves, where CMA was stretched between two DETA-functionalized surfaces (a) at pH 7.4 with EDC/NHS and (b) at pH 2.0, where CMA was coupled without EDC/NHS. The chair–boat transition of CMA monomers leads to a pronounced plateau at around 0.3 nN. Further extension of the molecules leads to a sharp force increase. At a force of around 1.65 nN (a) and 1.41 nN (b), the bond ruptures and the force drops to zero.

In the present study, we have determined the pH-dependence of bond rupture forces and coupling efficiencies of carboxymethylated amylose (CMA) linked to silanized silicon oxide surfaces,²⁰ using atomic force microscopy (AFM) based single-molecule force spectroscopy.^{29–35} CMA was covalently anchored between glass substrates and AFM cantilevers, both of which were functionalized with various organosilanes. In the event of a successful bond formation, single CMA tethers were stretched until the applied force exceeded the strength of the connection between glass substrate and AFM tip and the link between tip and substrate was lost. From the experiments, we have extracted the mean bond rupture forces and the coupling efficiencies, defined as the fraction of binding events per tip–surface contact, for a number of different surface functionalizations and pH values. Our results clearly show that, under acidic conditions, anchoring of organic molecules can be achieved even without amino groups present in the surface linker. In this case, carboxyl groups on the CMA may undergo ester condensation with free silanol groups in the surface linker or on the surface.

Experimental Section

Organosilicon Compounds. All organosilicon compounds were used as received without further purification. *N*¹-[3-(trimethoxysilyl)-propyl]diethylenetriamine (DETA) was purchased from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany), and (3-aminopropyl)-dimethylethoxysilane (APDMES), acetoxypropyltrimethoxysilane

(APTMS), and bis(trimethoxysilylpropyl)amine (BTSPA) were obtained from ABCR (Karlsruhe, Germany).

Sample Preparation. Glass microscope slides (Menzel, Braunschweig, Germany) were cleaned in 2.5% hydrochloric acid in double distilled water (henceforth referred to as water) for 120 min, sonicated in this solution for 60 min, and rinsed three times with water. Silicon nitride AFM cantilevers with a nominal force constant between 10 and 20 mN/m (MLCT-AU, Veeco Instruments GmbH, Mannheim, Germany) and 20 mN/m (OMCL-TR400PSA, Olympus Corp., Tokyo, Japan) were irradiated with UV light for 60 min and immersed in ethanol (p.a., Merck, Darmstadt, Germany). To examine if other cleaning protocols alter the coupling efficiencies to unsilanized surfaces, glass slides and AFM cantilevers were immersed in a 1:1 solution of hydrogen peroxide (30%, Merck, Darmstadt, Germany) and sulfuric acid (95–97%, Merck, Darmstadt, Germany) for 15 min and rinsed with water or cleaned with oxygen plasma at 100 W for 4 min (Plasmalab, Oxford Instruments, Abingdon, U.K.). For functionalization of the surfaces, a 10:1 solution of ethanol and water was prepared and adjusted to pH 4.5–5.5 with diluted acetic acid. Then, organosilane was added to 2 vol %, and both slides and cantilevers were incubated for 60 min in this solution. Afterward, slides and cantilevers were rinsed with ethanol and cured at 110 °C for 20 min. Silanized glass slides and AFM tips were then stored in vacuum at room temperature.

Prior to individual force-spectroscopy experiments, CMA was allowed to react with the functionalized glass surface. At pH 7.4, 10 mg of carboxymethylated amylose (CMA), 20 mg of polymer-bound 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide (EDC), and 10 mg of *N*-hydroxysuccinimide (NHS) were suspended in 1 mL of phosphate buffered saline (PBS; buffer composed of 0.137 M NaCl, 0.010 M Na₂HPO₄, 0.003 M KCl, and 0.002 M KH₂PO₄, pH 7.4 at *T* = 25 °C). For the control experiments, 10 mg of CMA was dissolved in 1 mL of PBS buffer. CMA, EDC, NHS, and PBS were purchased from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany). To perform experiments under acidic conditions, the PBS buffer was titrated to pH 2.0 with diluted hydrochloric acid. Depending on the experiment, CMA together with NHS and EDC, or CMA alone was dissolved in this solution, and the mixture was transferred to the organosilanized microscope slide.

(29) Florin, E. L.; Moy, V. T.; Gaub, H. E. *Science* **1994**, *264*, 415–417.

(30) Hinterdorfer, P.; Baumgartner, W.; Gruber, H. J.; Schilcher, K.; Schindler, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 3477–3481.

(31) Rief, M.; Gautel, M.; Oesterhelt, F.; Fernandez, J. M.; Gaub, H. E. *Science* **1997**, *276*, 1109–1112.

(32) Marszalek, P. E.; Oberhauser, A. F.; Pang, Y. P.; Fernandez, J. M. *Nature* **1998**, *396*, 661–664.

(33) Smith, B. L.; Schäffer, T. E.; Vlani, M.; Thompson, J. B.; Frederick, N. A.; Kindt, J.; Belcher, A.; Stuckyll, G. D.; Morse, D. E.; Hansma, P. K. *Nature* **1999**, *399*, 761–763.

(34) Beyer, M. K.; Clausen-Schaumann, H. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2921–2948.

(35) Garcia-Manyes, S.; Liang, J.; Szoszkiewicz, R.; Kuo, T.-L.; Fernandez, J. M. *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 236–242.

After a reaction period of 10 min, the slide was thoroughly rinsed with nearly neutral or acidic PBS buffer to remove excess CMA from the slide.

Single-Molecule Force Spectroscopy. The AFM experiments were performed as described previously.²² The prepared slide was immediately mounted on the AFM stage and covered with several hundred microliters of PBS buffer at the desired pH. Then, the AFM tip was brought into contact with CMA bound on the glass slide, and force-piezo-distance curves were recorded with the atomic force microscope (NanoWizard, JPK Instruments, Berlin, Germany) at room temperature. In all cases, the maximum contact force between the AFM tip and substrate prior to recording a force curve was kept below 0.3 nN. The contact time was kept between 0.0 and 0.5 s.

Results and Discussion

Evidence for pH-Dependent Coupling Chemistry. Two typical force–extension curves of single CMA polymers attached between an amino-silanized glass substrate and an amino-silanized AFM tip are displayed in Figure 1. The force–extension curve shown in Figure 1a was recorded at pH 7.4 using EDC and NHS to activate carboxyl groups of CMA, while the force–extension curve in Figure 1b was recorded at pH 2.0 without EDC and NHS as coupling agents.

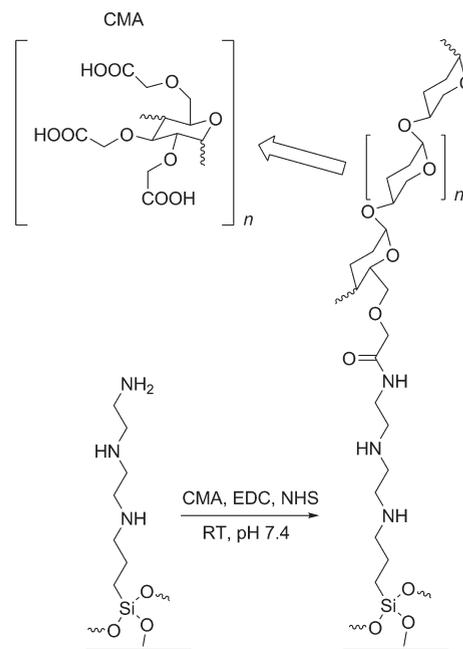
Both curves show a characteristic plateau at around 300 pN, which has been attributed to a chair–boat conformational transition of the sugar rings of single CMA polymers, during which the length increases by 0.875 Å per CMA monomer.^{32,36–38} This plateau can be used to confirm that the picked up molecule is CMA and that only one single molecule is stretched at a time.^{20,22} At the end of the plateaus in Figure 1, the force increases rapidly until the connection between substrate surface and AFM tip is lost and the force drops to zero. The rupture forces in these particular examples are 1.65 nN at pH 7.4 (Figure 1a) and 1.41 nN at pH 2 (Figure 1b).

It is generally assumed that, in order to trigger amide bond formation between the amine and the carboxylic acid, activation of the carboxyl group, for example, with EDC, is required (cf. Scheme 1).^{39,40} Addition of NHS leads to a more stable activated complex, increasing the efficiency of the coupling reaction. The fact that, in the example shown in Figure 1b, even without EDC and NHS, a stable link bearing up to 1.41 nN was formed between the substrate surface and the AFM tip is rather surprising. In control experiments without EDC and NHS at pH 7.4, no stable bond formation has been observed, if the contact force was kept below 0.3 nN.^{20,22} This indicates an acid-promoted or catalyzed formation of a covalent bond between the carboxyl group and a reactive group in the surface linker or on the surface.

In order to test this hypothesis, three different rupture force distributions have been recorded at pH 7.4 and at pH 2.0. Figure 2a–c shows all three normalized rupture force distributions together with corresponding Gauss curves. In all three cases, CMA was stretched between a DETA-functionalized glass substrate and a DETA-coated AFM tip, at force-loading rates of 150 ± 50 nN/s.

Figure 2a summarizes rupture events at pH 7.4 using EDC and NHS to stimulate amide bond formation between the carboxyl group and the amino group. The mean rupture force was $1.65 \pm$

Scheme 1. EDC/NHS-Mediated Amide Bond Formation between an Amino-Functionalized Surface and CMA



0.37 nN, and the coupling efficiency, that is, the number of successful bond formations per AFM tip approach to the substrate surface, was 10–20%. Rupture events obtained at pH 2.0 without the activation with EDC and NHS are shown in Figure 2b. Here the mean bond rupture force was 1.39 ± 0.30 nN, and the coupling efficiency increased to approximately 20–40%, 2 times higher than that at pH 7.4. Finally, the rupture forces summarized in Figure 2c were obtained after activation with EDC and NHS, but now the experiments were carried out under acidic conditions, at a pH value of 2.0. In this case, the mean bond rupture force was 1.55 ± 0.48 nN and the coupling efficiency was again between 20–40%.

The observation of different bond rupture forces at pH 7.4 with EDC/NHS and at pH 2.0 without EDC/NHS could be caused by two alternative binding mechanisms which in turn would lead to different rupture pathways. The much broader rupture force distribution obtained with EDC/NHS at pH 2.0 (Figure 2c) further supports this hypothesis. It looks like in Figure 2c two rupture force distributions are superimposed, leading to a histogram with two distinct peaks. This proposition is further illustrated in Figure 2d, where a linear combination of two Gaussians was fitted to the experimental bond rupture distribution of Figure 2c.

Identification of Reactive Group at pH 2.0. In order to elucidate the binding mechanism at pH 2.0, we have systematically varied the pH and the silanization reagents used on the AFM tip and glass substrate. Table 1 summarizes these experiments and compares them with the experiments described above (Table 1, exp. no. 1–3). The observed coupling efficiency is given in the column at the far right of Table 1.

To investigate a possible bond formation at neutral pH without the activation of the carboxyl groups, a control experiment without EDC and NHS was performed at pH 7.4 (Table 1, exp. no. 4). In this case, the coupling efficiency was 0%; that is, no links were observed between the AFM tip and substrate surface. As already mentioned, it is well documented in the literature that the direct condensation of a carboxyl group and an amino group is unlikely under the described conditions without activating the

(36) Rief, M.; Oesterhelt, F.; Heymann, B.; Gaub, H. E. *Science* **1997**, *275*, 1295–1297.

(37) Li, H. B.; Rief, M.; Oesterhelt, F.; Gaub, H. E.; Zhang, X.; Shen, J. C. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *305*, 197–201.

(38) Heymann, B.; Grubmüller, H. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *305*, 202–208.

(39) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.

(40) Valeur, E.; Bradley, M. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *38*, 606–631.

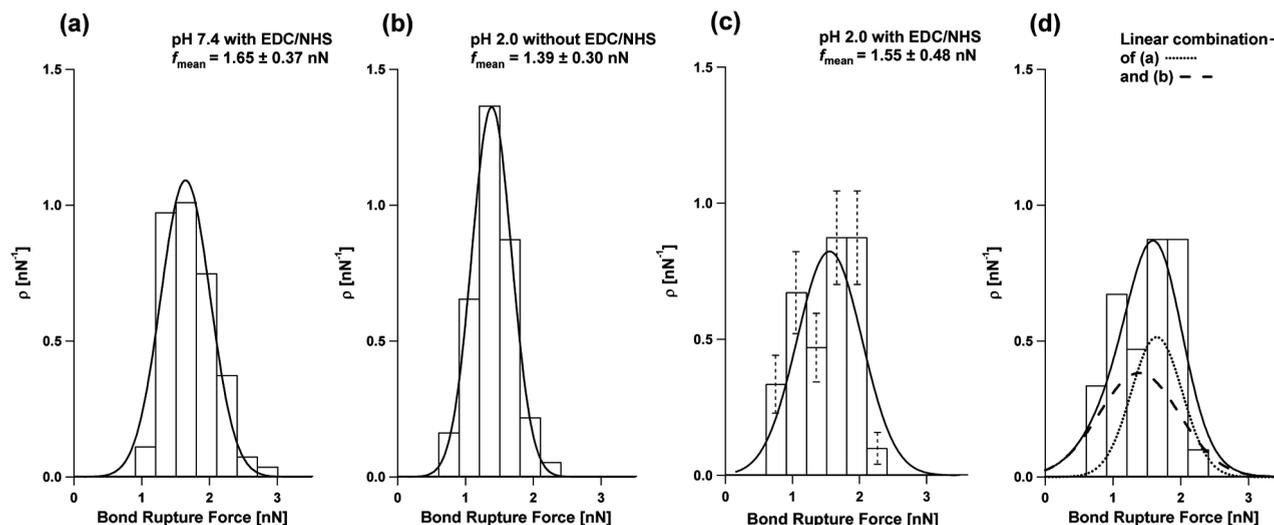


Figure 2. Normalized rupture force distributions (bins), together with normalized Gauss curves (solid lines, a–c). (a) Rupture force distribution extracted from experiments at pH 7.4, with EDC and NHS ($n = 89$). (b) Rupture force distribution obtained at pH 2.0 without EDC and NHS ($n = 61$). (c) Rupture force distribution obtained at pH 2.0 with EDC and NHS ($n = 99$), and (d) the same distribution as in (c) together with a linear combination (solid line) of the Gauss curves of (a) (dotted line) and (b) (dashed line). For all four histograms, a bin width of 0.30 nN was chosen. The force-loading rate was 150 ± 50 nN/s in all bond rupture experiments. The dotted lines in (c) are error bars for the individual bins.

Table 1. Coupling Efficiencies of CMA Covalently Attached between an AFM tip and a Glass Substrate for Various Organosilane Surface Coatings at pH 2.0 and 7.4

exp. no.	silanization AFM tip	silanization glass substrate	coupling reagents	pH-value solvent	acid/base	coupling efficiency ^d
1	DETA ^a	DETA	EDC ^b , NHS ^c	7.4		10–20%
2	DETA	DETA	EDC, NHS	2.0	HCl	20–40%
3	DETA	DETA		2.0	HCl	20–40%
4	DETA	DETA		7.4		0%
5	DETA	DETA		2.0/> 10.0 ^g	HCl/NaOH	20–40%/0%
6	BTSPA ^d	BTSPA		2.0	HCl	20–40%
7	APTMS ^e	DETA		2.0	HCl	5–20%
8	APDEMS ^f	APDEMS		2.0	HCl	0%
9				2.0	HCl	0–16% ^h
10	DETA			2.0	HCl	0–17% ^h

^a DETA = N^1 -[3-(trimethoxysilyl)-propyl]diethylenetriamine. ^b EDC = 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide. ^c NHS = *N*-hydroxysuccinimide. ^d BTSPA = bis(trimethoxysilylpropyl)amine. ^e APTMS = acetoxypropyltrimethoxysilane. ^f APDEMS = (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane. ^g Experiment has been performed in a solution at pH 2.0 followed by the addition of concentrated NaOH, so that the final pH value was adjusted to >10. ^h The coupling efficiency corresponds to the average number of successful bond formations between the AFM tip and substrate surface per number of performed approaches. ⁱ Depends on the batch of the cantilever and the glass substrate: in some experiments, the coupling efficiency was 0%, and in others it was as much as 17%.

carboxyl group.^{39–41} An experiment at pH 2.0 without the coupling agents EDC and NHS, followed by the addition of concentrated sodium hydroxide solution (Table 1, exp. no. 5), serves as additional evidence that low pH is required for bond formation without EDC/NHS. At pH 2.0, the coupling efficiency was again 20–40%. After concentrated sodium hydroxide solution was added, the pH increased to >10 and no further binding events were observed.

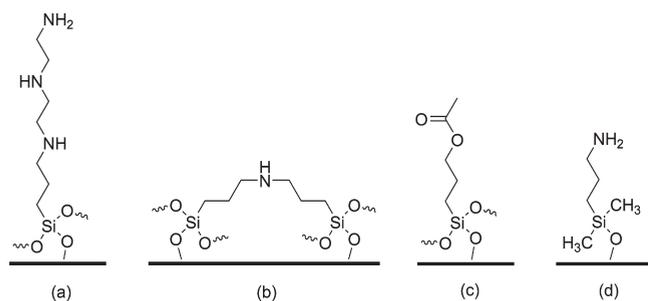
In experiments 6–10, the pH was kept constant at 2.0, and the surface functionalization is modified in order to identify the reactive group on the surface. On the CMA polymer chain, the carboxyl groups are the only plausible sites for a proton-induced reaction, most likely an acid-catalyzed condensation. Possible reaction sites on the DETA-silanized surfaces are primary amines in the terminal amino group of DETA, secondary amines in the aliphatic chain of the anchor, and free, unreacted silanol groups in the surface anchor or on the surface.^{25–28} To find out which of these groups is responsible for bond formation under acidic

conditions, we compared the coupling efficiency on DETA-functionalized surfaces (Scheme 2a) to the coupling efficiencies of surfaces functionalized with BTSPA (Scheme 2b), APTMS (Scheme 2c), and APDEMS (Scheme 2d).

When the AFM tip and substrate surface were functionalized with the dipodal organosilane BTSPA (Scheme 2b), which exhibits a secondary amine and possibly up to five free silanol groups, but no primary amine, the observed coupling efficiency at pH 2.0 was again 20–40% (Table 1, exp. no. 6). Since no difference is observed between the BTSPA and DETA functionalization at pH 2.0, the terminal amine of DETA cannot be responsible for the coupling at pH 2.0.

A slightly lower coupling efficiency, between 5% and 20%, was observed when we used DETA on the glass substrate and APTMS on the AFM tip (Table 1, exp. no. 7). APTMS contains an acetoxy group and up to two free silanol groups, but no amines (Scheme 2c). The reduced coupling efficiency could therefore point to a contribution of secondary amines in the acid mediated coupling mechanism. Nevertheless, the fact that coupling was still possible clearly shows that amino groups are not required for covalent bond formation under acidic conditions. The reduced

(41) Arnold, K.; Davies, B.; Giles, R. L.; Grosjean, C.; Smith, G. E.; Whiting, A. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 813–820.

Scheme 2.^a

^a (a) DETA-functionalized surface with one primary amine, two secondary amines, and up to two free silanol groups. (b) Surface treated with BTSPA, which is a dipodal coupling agent exhibiting a secondary amine and up to five free silanol groups. (c) APTMS-functionalized surface exhibiting an acetoxy group as functional group and up to two free silanol groups, and (d) surface functionalized with the monoalkoxysilane APDEMS, exhibiting a terminal amine.

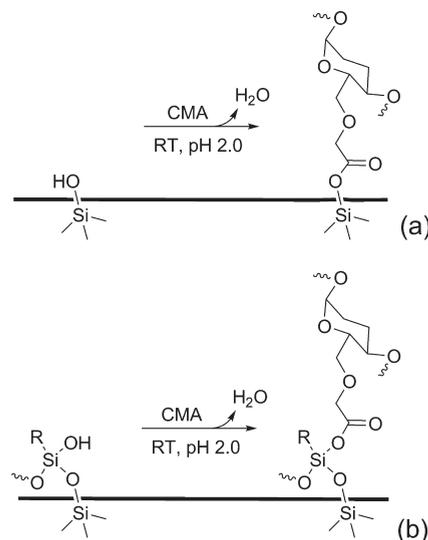
coupling efficiency in this case could also be caused by an incomplete coverage of the surface with silane: In APTMS, the hydrolysis of methoxy groups proceeds slower than in the other organo-silanes used,⁴² and incomplete hydrolysis during surface silanization, which was carried out at pH 4.5–5.5, might leave the surface only partially covered with silane. In fact, it turned out that the APTMS-functionalized surfaces were more hydrophobic than all other surfaces investigated in this study, which is an indication of incomplete surface functionalization. It should be noted, however, that the coupling experiments were carried out at pH 2.0, where the hydrolysis of remaining methoxy groups should occur somewhat faster, leaving free silanol groups on the surface.

APDEMS is a monoalkoxysilane with a terminal amine, which once bound to the surface has no remaining free silanol group.^{43,44} Experiments with APDEMS-functionalized surfaces (Scheme 2d) resulted in a coupling efficiency of 0% (Table 1, exp. no. 8), which clearly demonstrates that free silanol groups are required for a successful bond formation under acidic conditions. The most plausible scenario for such an acid-catalyzed bond formation is the ester condensation of a carboxyl group in CMA with a free silanol group.

Silicon oxide surfaces also exhibit free silanol groups, which might also serve as starting points for an ester condensation. We therefore tried to connect CMA to nonsilanized silicon oxide surfaces under acidic conditions (Table 1, exp. no. 9 and 10). Indeed, even without silane or with only single-sided silane functionalization, stable connections between the AFM tip and substrate surface could be observed. However, unlike in all other experiments, where the observed coupling efficiencies were quite reproducible, without silane or with only single-sided silanization, the observed coupling efficiencies varied strongly between different batches of AFM cantilevers and glass substrates. Furthermore, with approximately 0–15%, the coupling efficiencies never reached the 20–40% observed for two thoroughly functionalized surfaces at pH 2.0, and even after surface treatment with piranha etch or oxygen plasma the coupling efficiencies did not exceed 15%. Free silanol groups on the silicon oxide surface may therefore play a role, but deliberate surface silanization seems to be important for obtaining high and reproducible coupling efficiencies under acidic conditions.

Our results indicate an acid-catalyzed ester condensation between a carboxylic acid group in CMA and a free silanol group

Scheme 3. Acid-Catalyzed Ester Condensation between Carboxylic Acids in the CMA and Free Silanol Groups on the Bare Silicon Oxide Surface (a) and Unreacted Silanol Groups in the Surface Anchor (b)



on the surface or in the surface anchor, as depicted in Scheme 3. A direct alcohol condensation between carboxyl groups and nonhydrolyzed methoxy groups of the silane is in principle also possible. However, the surface silanization was carried out in an alcohol–water solution at pH 4.5–5.5, followed by the CMA immobilization in aqueous solution at pH 2.0. Under these conditions, the hydrolysis of the methoxy groups usually proceeds much faster than the alcohol condensation.²⁵ Therefore, except for APTMS coated surfaces, where an incomplete hydrolysis of methoxy groups cannot be ruled out, the hydrolysis of methoxy groups followed by an ester condensation of carboxylic acid and silanol should be kinetically favored over a direct alcohol condensation of the methoxy groups.^{24,45}

Furthermore, because of the reduced coupling efficiency to APTMS in exp. no. 7 (Table 1), a contribution of the direct reaction of a secondary amine with a carboxyl group cannot be rigorously ruled out. However, the proposed ester condensation is in general favored over amide bond formation.³⁹ Moreover, a primary amine like that in APDEMS should be more reactive toward the carboxyl group than a secondary amine.^{46,47} Since with APDEMS-functionalized surfaces (Table 1, exp. no. 8) no coupling events were observed, we attribute the reduced coupling efficiency in exp. no. 7 (Table 1) to an incomplete surface coverage with APTMS.

Acid-catalyzed condensation reactions between carboxylic acids and silanol groups have been reported in solution, where this reaction has been used for the rapid cross-linking of silica gels in sol–gel technology.^{48,49} Physisorption of carboxylic acids has been used to prepare ordered films of poly(acrylic acid) on silica surfaces.^{50,51} However, in this case, carboxylate and silanol groups are connected merely via hydrogen bonds, and no covalent cross-link to the substrate is formed. Our results show that free silanol groups can also be used to covalently link carboxyl containing organic molecules to silicon or to silane-functionalized

(45) Mazúr, M.; Mlynárik, V.; Valko, M.; Pelikán, P. *Appl. Magn. Reson.* **1999**, *16*, 547–557.

(46) Zhu, D.; van Ooij, W. J. *Prog. Org. Coat.* **2004**, *49*, 42–53.

(47) Metroke, T.; Wang, Y.; van Ooij, W.; Schaefer, D. J. *Sol-Gel Sci. Technol.* **2009**, *51*, 23–31.

(48) Sharp, K. G. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **1994**, *2*, 35–41.

(49) Abe, Y.; Gunji, T. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 149–182.

(50) Kurihara, K.; Mizukami, M. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **2001**, *77*, 115–120.

(51) Zhang, L.; Mizukami, M.; Kurihara, K. *Macromol. Symp.* **2008**, *270*, 40–47.

(42) Arkles, B.; Larson, G. *Silicon Compounds: Silanes and Silicones*, 2nd ed.; Gelest, Inc.: Morrisville, PA, 2008.

(43) White, L. D.; Tripp, C. P. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *232*, 400–407.

(44) Kanan, S. M.; Tze, W. T. Y.; Tripp, C. P. *Langmuir* **2002**, *18*, 6623–6627.

inorganic surfaces, provided the organic molecules can be exposed to acidic environments without destroying or denaturing them. This may considerably simplify the coupling chemistry for immobilizing organic molecules on inorganic surfaces: In standard coupling protocols, the carboxylic acid is first activated with EDC and NHS, before it is linked to an amino group of the surface linker. Moreover, the proposed reaction mechanism should in principle also be applicable with other reactive groups besides carboxyl groups, for example, alcohols.^{52–55} Regarding the stability of the formed link, it should be noted that the ester bond can in principle be hydrolyzed again in basic or in alkaline solution. First experiments, where we increased the pH value to 7.4 after ester bonds were formed at pH 2.0, show that these bonds are stable under nearly neutral conditions. For the alkaline hydrolysis of ester bonds, usually higher pH values are required.⁵⁶ Because the pH value should affect the strength of the ester bond, a systematic investigation of the pH-dependent bond strength is currently being carried out in our laboratory.

Conclusions

We have investigated the pH-dependent linkage of carboxymethylated amylose to organosilanized surfaces using AFM

(52) Ballard, C. C.; Broge, E. C.; Iler, R. K.; John, D. S. S.; McWhorter, J. R. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 20–25.

(53) Utsugi, H.; Horikoshi, H.; Matsuzawa, T. *J. Colloid Interface Sci.* **1975**, *50*, 154–161.

(54) Ossenkamp, G. C.; Kemmitt, T.; Johnston, J. H. *Langmuir* **2002**, *18*, 5749–5754.

(55) Hunter, T. N.; Wanless, E. J.; Jameson, G. J. *Colloids Surf., A* **2009**, *334*, 181–190.

(56) Mabey, W.; Mill, T. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1978**, *7*, 383–415.

based single-molecule force spectroscopy. As expected, at pH 7.4, activation with EDC/NHS chemistry is required to form a stable link between the AFM tip and the substrate surface. In this case, an amide bond can be formed between a carboxylic acid of CMA and an amino group of the DETA-functionalized surface. At pH 2.0, we found that no additional coupling agents are required for bond formation. In this case, the mean bond rupture force decreases and at the same time the coupling efficiency increases, compared to experiments at pH 7.4. The difference in bond rupture forces indicates that, at pH 7.4 with EDC/NHS and at pH 2.0 without EDC/NHS, the scission of two different bonds is observed. The systematic variation of the organosilane functionalization of AFM tip and substrate surface showed that coupling at pH 2.0 without EDC/NHS requires free silanol groups in the surface linker, or alternatively on the uncoated silicon surface. Amino groups most likely do not contribute to coupling at low pH. The most likely scenario for bond formation at pH 2.0 is acid-catalyzed ester condensation between a carboxylic acid group of CMA and a free silanol group in the surface anchor or the silicon surface. In the future, this could serve as a simple and efficient coupling chemistry for linking organic molecules containing carboxylic acids, alcohol or similar reactive groups to silicon or silane-functionalized inorganic surfaces.

Acknowledgment. S.W.S. and H.C.-S. gratefully acknowledge financial support of the German Excellence Initiative via the “Nanosystems Initiative Munich (NIM)”. M.K.B. gratefully acknowledges startup funds from the Sonderforschungsbereich 677 “Function by Switching” supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

8 Literaturverzeichnis

- [1] M. K. Beyer, H. Clausen-Schaumann, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2921–2948.
- [2] M. M. Caruso, D. A. Davis, Q. Shen, S. A. Odom, N. R. Sottos, S. R. White, J. S. Moore, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5755–5798.
- [3] A. Bruckmann, A. Krebs, C. Bolm, *Green Chem.* **2008**, *10*, 1121–1236.
- [4] B. Rodríguez, A. Bruckmann, T. Rantanen, C. Bolm, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 2213–2233.
- [5] B. Rodríguez, A. Bruckmann, C. Bolm, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 4710–4722.
- [6] L. H. Thompson, L. K. Doraiswamy, *Ind. Eng. Chem. Res.* **1999**, *38*, 1215–1249.
- [7] G. Cravotto, P. Cintas, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5573–5575; G. Cravotto, P. Cintas, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 5476–5478.
- [8] K. L. Berkowski, S. L. Potisek, C. R. Hickenboth, J. S. Moore, *Macromolecules* **2005**, *38*, 8975–8978.
- [9] J. Sohma, *Prog. Polym. Sci.* **1989**, *14*, 451–596.
- [10] C. R. Hickenboth, J. S. Moore, S. R. White, N. R. Sottos, J. Baudry, S. R. Wilson, *Nature* **2007**, *446*, 423–427.
- [11] J. Friedrichs, M. Lussmann, I. Frank, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 3339–3342.
- [12] R. Hoffmann, R. B. Woodward, *Science* **1970**, *167*, 825–831.
- [13] S. R. White, N. R. Sottos, P. H. Geubelle, J. S. Moore, M. R. Kessler, S. R. Sriram, E. N. Brown, S. Viswanathan, *Nature* **2001**, *409*, 794–797.
- [14] W. Zhang, X. L. Yang, C. Y. Li, M. Liang, C. H. Lu, Y. L. Deng, *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 257–263.
- [15] S. S. Pesetskii, B. Jurkowski, O. V. Filimonov, V. N. Koval, V. V. Golubovich, *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *119*, 225–234.
- [16] C. I. Onwulata, R. P. Konstance, P. H. Cooke, H. M. Farrell, *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 3775–3782.
- [17] R. M. van den Einde, A. J. van der Goot, R. M. Boom, *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 2396–2404.
- [18] H. Clausen-Schaumann, M. Seitz, R. Krautbauer, H. E. Gaub, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 524–530.
- [19] A. Ashkin, *Phys. Rev. Lett.* **1970**, *24*, 156–159.

- [20] A. Ashkin, K. Schütze, J. M. Dziedzic, U. Euteneuer, M. Schliwa, *Nature* **1990**, 348, 346–348.
- [21] A. Ashkin, *J. Opt. Soc. Am. A* **1985**, 2, P50–P50.
- [22] A. Ashkin, J. E. Bjorkholm, S. Chu, *Nature* **1986**, 323, 585–585.
- [23] L. Hollberg, S. Chu, J. E. Bjorkholm, A. Cable, A. Ashkin, *J. Opt. Soc. Am. A* **1985**, 2, P50–P50.
- [24] J. C. Meiners, S. R. Quake, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, 84, 5014–5017.
- [25] C. Gosse, V. Croquette, *Biophys. J.* **2002**, 82, 3314–3329.
- [26] A. R. Bausch, W. Moller, E. Sackmann, *Biophys. J.* **1999**, 76, 573–579.
- [27] D. Salerno, D. Brogioli, V. Cassina, D. Turchi, G. L. Beretta, D. Seruggia, R. Ziano, F. Zunino, F. Mantegazza, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 7089–7099.
- [28] A. Kishino, T. Yanagida, *Nature* **1988**, 334, 74–76.
- [29] A. Ishijima, Y. Harada, H. Kojima, T. Funatsu, H. Higuchi, T. Yanagida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 199, 1057–1063.
- [30] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, *Nature* **1999**, 397, 50–53.
- [31] D. F. J. Tees, D. J. Goetz, *News Physiol. Sci.* **2003**, 18, 186–190.
- [32] D. P. E. Smith, *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, 66, 3191–3195.
- [33] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56, 930–933.
- [34] M. E. McConney, S. Singamaneni, V. V. Tsukruk, *Polym. Rev.* **2010**, 50, 235–286.
- [35] C. D. Frisbie, L. F. Rozsnyai, A. Noy, M. S. Wrighton, C. M. Lieber, *Science* **1994**, 265, 2071–2074.
- [36] P. Hinterdorfer, Y. F. Dufrene, *Nat. Methods* **2006**, 3, 347–355.
- [37] A. Ebner, L. Wildling, R. Zhu, C. Rankl, T. Haselgruber, P. Hinterdorfer, H. J. Gruber, *Top. Curr. Chem.* **2008**, 285, 29–76.
- [38] T. Ito, I. Grabowska, S. Ibrahim, *Trends Anal. Chem.* **2010**, 29, 225–233.
- [39] V. I. Minkin, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2751–2776.
- [40] G. Berkovic, V. Krongauz, V. Weiss, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1741–1753.
- [41] R. Hatz, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1965**, 207, 397–397.
- [42] Y. Yokoyama, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1717–1739.
- [43] B. L. Feringa, R. A. van Delden, N. Koumura, E. M. Geertsema, *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1789–1816.

- [44] H. Tian, S. J. Yang, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 85–97.
- [45] D. A. Davis, A. Hamilton, J. Yang, L. D. Cremar, D. van Gough, S. L. Potisek, M. T. Ong, P. V. Braun, T. J. Martínez, S. R. White, J. S. Moore, N. R. Sottos, *Nature* **2009**, *459*, 68–72.
- [46] E. L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub, *Science* **1994**, *264*, 415–417.
- [47] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, *Science* **1997**, *276*, 1109–1112.
- [48] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, H. E. Gaub, *Science* **1997**, *275*, 1295–1297.
- [49] M. Grandbois, M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, *Science* **1999**, *283*, 1727–1730.
- [50] S. W. Schmidt, M. K. Beyer, H. Clausen-Schaumann, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3664–3668.
- [51] J. R. Vig, *J. Vac. Sci. Technol., A* **1985**, *3*, 1027–1034.
- [52] J. J. Cras, C. A. Rowe-Taitt, D. A. Nivens, F. S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 683–688.
- [53] S. W. Schmidt, T. Christ, C. Glockner, M. K. Beyer, H. Clausen-Schaumann, *Langmuir* **2010**, *26*, 15333–15338.
- [54] C. E. Zybilla, H. G. Ang, L. Lan, W. Y. Choy, E. F. K. Meng, *J. Organomet. Chem.* **1997**, *547*, 167–172.
- [55] D. Kowalczyk, S. Slomkowski, M. M. Chehimi, M. Delamar, *Int. J. Adhes. Adhes.* **1996**, *16*, 227–232.
- [56] A. V. Krasnoslobodtsev, S. N. Smirnov, *Langmuir* **2002**, *18*, 3181–3184.
- [57] B. Arkles, *Chemtech* **1977**, *7*, 766–778.
- [58] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2. Aufl., Elsevier, London, **2008**.
- [59] M. C. Desai, L. M. S. Stramiello, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7685–7688.
- [60] D. Sehgal, I. K. Vijay, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 87–91.
- [61] N. Nakajima, Y. Ikada, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 123–130.
- [62] M. A. Gilles, A. Q. Hudson, C. L. Borders, *Anal. Biochem.* **1990**, *184*, 244–248.
- [63] D. G. Hoare, D. E. Koshland, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 2447–2453.
- [64] Z. Grabarek, J. Gergely, *Anal. Biochem.* **1990**, *185*, 131–135.
- [65] J. V. Staros, R. W. Wright, D. M. Swingle, *Anal. Biochem.* **1986**, *156*, 220–222.

- [66] S. Iarlori, D. Ceresoli, M. Bernasconi, D. Donadio, M. Parrinello, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8007–8013.
- [67] E. Evans, K. Ritchie, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1541–1555.
- [68] S. Kim, K. D. Kihm, T. Thundat, *Exp. Fluids* **2010**, *48*, 721–736.
- [69] G. I. Bell, *Science* **1978**, *200*, 618–627.
- [70] A. R. Bizzarri, S. Cannistraro, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16449–16464.
- [71] M. K. Beyer, *J. Chem. Phys.* **2000**, *112*, 7307–7312.
- [72] D. Schütze, Diplomarbeit, Universität Kiel, **2010**.
- [73] A. P. Wiita, S. R. K. Ainavarapu, H. H. Huang, J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 7222–7227.
- [74] W. Kauzmann, H. Eyring, *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 3113–3125.
- [75] J. Ribas-Arino, M. Shiga, D. Marx, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4254–4257; J. Ribas-Arino, M. Shiga, D. Marx, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4190–4193.
- [76] A. F. Oberhauser, P. K. Hansma, M. Carrion-Vazquez, J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 468–472.
- [77] S. Garcia-Manyes, J. Liang, R. Szozkiewicz, T.-L. Kuo, J. M. Fernandez, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 236–242.
- [78] J. Liang, J. M. Fernandez, *ACS Nano* **2009**, *3*, 1628–1645.
- [79] T. Hugel, N. B. Holland, A. Cattani, L. Moroder, M. Seitz, H. E. Gaub, *Science* **2002**, *296*, 1103–1160.
- [80] S. Brandt, *Data Analysis: Statistical and Computational Methods for Scientists and Engineers*, 3. Aufl., Springer, Berlin, **1998**.
- [81] S. W. Schmidt, A. Kersch, M. K. Beyer, H. Clausen-Schaumann, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 5994–5999.
- [82] A. F. Holleman, N. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, 101. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, **1995**, S. 198.
- [83] F. Oesterhelt, M. Rief, H. E. Gaub, *New J. Phys.* **1999**, *1*, 6.1–6.11.
- [84] J. P. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, P. K. Hansma, *Rev. Sci. Instrum.* **1993**, *64*, 403–405.
- [85] J. E. Sader, I. Larson, P. Mulvaney, L. R. White, *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, *66*, 3789–3798.
- [86] J. E. Sader, J. W. M. Chon, P. Mulvaney, *Rev. Sci. Instrum.* **1999**, *70*, 3967–3969.
- [87] C. T. Gibson, G. S. Watson, S. Myhra, *Nanotechnology* **1996**, *7*, 259–262.

-
- [88] J. L. Hutter, J. Bechhoefer, *Rev. Sci. Instrum.* **1993**, *64*, 1868–1873.
- [89] „MFP-3D“ Spring Constant Tutor, Fa. Asylum Research, Santa Barbara, **2008**, S. 1.
- [90] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 4. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **1997**, S. 507.
- [91] H. H. Hodgson, T. A. Jenkinson, *J. Chem. Soc.* **1928**, 2272–2280.
- [92] N. Shao, J. Y. Jin, H. Wang, J. Zheng, R. H. Yang, W. H. Chan, Z. Abliz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 725–736.
- [93] J. Yang, M.-K. Ng, *Synthesis* **2006**, *18*, 3075–3079.
- [94] D. V. Kosynkin, J. M. Tour, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 991–992.
- [95] T. Doi, H. Inoue, M. Tokita, J. Watanabe, T. Takahashi, *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 135–141.
- [96] J. M. Lenhardt, A. L. Black, S. L. Craig, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10818–10819.
- [97] M. K. Beyer, pers. Mitteilung, **2010**.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation – abgesehen von der Beratung durch den Betreuer Prof. Dr. Martin K. Beyer – nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist.

Die Arbeit wurde weder ganz, noch zum Teil einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Sie wurde in ihrer Gesamtheit nicht veröffentlicht und auch nicht zur Veröffentlichung eingereicht.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den 27.06.2011

Christian Glockner