Institut für Chemie
Arbeitskreis Angewandte Polymerchemie

Entwicklung neuer stimuli-sensitiver Hydrogelfilme als Plattform für die Biosensorik

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin Polymerchemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Potsdam

von

Jens Buller

Potsdam, im März 2013

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2013/6626/
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus-66261
http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-66261

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. André Laschewsky herzlich danken für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung meiner Dissertation, für die Freiheit eigene Ideen einzubringen und für die stete Bereitschaft zu ausführlichen lehrreichen Gesprächen.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Erik Wischerhoff für die Einführung in die Oberflächenchemie, seine ansteckende Begeisterung und für zahlreiche Ermutigungen und Anstöße neue Ideen und Pläne umzusetzen. Herrn Dr. Jean-François Lutz danke ich für die Einführung in die Welt der thermoresponsiven Polymere zu Beginn meiner Dissertation.

Aufgrund des Kooperationsvertrages zwischen der Universität Potsdam und dem Fraunhofer Institut für Angewandte Polymerforschung IAP konnte ich einen Großteil meiner Arbeiten in den Räumlichkeiten des IAP durchführen. Stellvertretend danke ich daher dem Institutsleiter des IAP Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Fink für die Möglichkeit die Labore, Einrichtungen und Büros des Instituts zu nutzen. Großer Dank gilt auch meinen Kollegen aus dem FB4 für die freundliche Atmosphäre. Insbesondere danke ich Christoph und Michael für zahlreiche praktische Tipps und Anne, Kristin und Verena für viele kleine Hilfestellungen im Laboralltag. Allen anderen nämlich Daniel, Joachim, Jörg, Kristina, Lisa, Natalia, Nicole, Rene, Sabrina, Sophia, Steffi und Steffi danke ich für den sehr angenehmen kollegialen Umgang.

Meinen Mitdoktoranden danke ich für die schöne Zeit bei und neben der Arbeit. Insbesondere die Arbeit mit den „Laborboys“ Martin und Sandor wurde nie langweilig. Meinen weiteren Büronachbarn Anna, Anne und Jonas danke ich für ein stets offenes Ohr für fachliche (und andere) Diskussionen. Danke für viele Unterhaltungen beim Seminar, beim Mittagessen oder in der Kaffeepause an Christoph, Frank, Jan, Jean-Philippe, Laura, Robert, Sahika und Viet.

Große Freude bereitete mir die Arbeit mit „meinen“ Praktikanten Matthias Rohn und Daniel Stöbener sowie mit Kristin Hall während ihrer Bachelorarbeit. Speziell danke ich Matthias und Daniel für Hilfe bei der Synthese der benzophenonhaltigen bzw. der biotinhaltigen Copolymere und Kristin für Arbeiten zur Synthese des Benzophenonmonomers.

Dem Arbeitskreis Analytische Chemie der Universität Potsdam (Prof. Dr. Erich Kleinpeter) danke ich für die NMR Messungen (insbesondere Frau A. Krtitschka und Dr. M. Heydenreich), Katlen Brennenstuhl aus dem Arbeitskreis Physikalische Chemie der Universität

Potsdam (Prof. Dr. Hans-Gerd Löhmannsröben) für die Messung der Lampenspektren, Nicole Schulze aus dem Arbeitskreis Kolloidchemie der Universität Potsdam (Prof. Dr. Joachim Kötz) für Hilfe bei den Mikro-DSC Messungen. Frau Dr. Katja Uhlig vom Fraunhofer Institut für biomedizinische Technik danke ich für die Überlassung der Flusszelle für die Ellipsometrie.

Die Dissertation war eingebettet in das Verbundprojekt „Taschentuchlabor“ aus dem viele Kooperationen entstanden sind die nicht in dieser Arbeit wiederzufinden sind aber äußerst fruchtvoll und erkenntnisbringend waren. Danke an Christine Hüttl, Frau Dr. Cornelia Hettrich, Artur Fandrich, Prof. Dr. Fred Lisdat, Herrn Dr. Ralph Hölzl, Herrn Dr. Jan Szeponik, Esmaeil Heydari und Herrn Dr. Joachim Stumpe für viele Blicke über den Tellerrand.

Ganz zuletzt aber besonders herzlich danke ich meinen Geschwistern Holger, Christoph und Anja und allen Freunden für ihr Interesse und die Zeit neben der Arbeit, meiner lieben Freundin Kathleen für Alles- aber besonders für die frühmorgendlichen Radtouren und meinen Eltern für die Unterstützung während all der Jahre.

Publikationsliste

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Form von Fachartikeln oder Postern bereits publiziert:

Fachartikel:

1. **Jens Buller**, André Laschewsky, Jean-François Lutz, Erik Wischerhoff, *Tuning the Lower Critical Solution Temperature of Thermoresponsive Polymers by Biospecific Recognition,* Polym. Chem., **2011**, *2, 1486-1489.*
(doi: 10.1039/c1py00001b)

2. Artur Fandrich, **Jens Buller**, Erik Wischerhoff, André Laschewsky, Fred Lisdat, *Electrochemical Detection of the Thermally Induced Phase Transition of a Thin Stimuli-responsive Polymer Film,* ChemPhysChem, **2012**, *13, 2020-2023.*
(doi: 10.1002/cphc.201100924)

3. **Jens Buller**, André Laschewsky, Erik Wischerhoff, Artur Fandrich, Fred Lisdat, *Smart synthetic macromolecules recognizing proteins,* Polymer Preprints, **2012**, 53, 30 - 31.

4. **Jens Buller**, André Laschewsky, Erik Wischerhoff, *Photoreactive Oligoethylene Glycol Polymers – Versatile Compounds for Surface Modification by Thin Hydrogel Films,* Soft Matter, **2013**, 9, 929-937.
(doi: 10.1039/c2sm26879e)

Poster (Auswahl)**:**

1. **Jens Buller**, Martin Sütterlin, Jean-François Lutz, Erik Wischerhoff, André Laschewsky, *Hydrogel Scaffolds as Smart Sensing Materials,* Symposium Bioactive Surfaces, 20. Mai **2010**, Potsdam

2. **Jens Buller**, André Laschewsky, Erik Wischerhoff, *Proteinerkennung mittels thermoresponsiver Polymere*, 5. Senftenberger Innovationsforum Multiparameteranalytik, 4. März **2011**, Senftenberg

3. **Jens Buller**, André Laschewsky, Martin Sütterlin und Erik Wischerhoff, *Protein Recognition by Responsive Polymers*, POLYOR 2011 "Polymers on the Odra River"; 6. - 7. Juli **2011**, Oppeln (Polen), **1. Preis für das beste wissenschaftliche Poster**

4. **Jens Buller**, Martin Sütterlin, Erik Wischerhoff und André Laschewsky, *Smarte Chemie gegen Pandemie – Wie Kunststoffe bei der frühzeitigen Erkennung von Krankheiten helfen*, 4. Interdisziplinäres Doktorandensymposium der Potsdam Graduate School, 2. November **2011**, Potsdam, **1. Preis für das beste wissenschaftliche Poster**

5. **Jens Buller**, Sandor Dippel, Martin Sütterlin, Michael Päch, Erik Wischerhoff, André Laschewsky, *Responsive Polymer Hydrogels and the Modulation of their Phase Transition via Molecular Recognition,* Makromolekulares Kolloquium, 23. -25. Februar **2012**, Freiburg, **3. Preis für das beste wissenschaftliche Poster**

Wissenschaftliche Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Synthese und der Charakterisierung von thermoresponsiven Polymeren und ihrer Immobilisierung auf festen Oberflächen als nanoskalige dünne Schichten. Dabei wurden thermoresponsive Polymere vom Typ der unteren kritischen Entmischungstemperatur (engl.: *lower critical solution temperature*, LCST) verwendet. Sie sind bei niedrigeren Temperaturen im Lösungsmittel gut und nach Erwärmen oberhalb einer bestimmten kritischen Temperatur nicht mehr löslich; d. h. sie weisen bei einer bestimmten Temperatur einen Phasenübergang auf. Als Basismaterial wurden verschiedene thermoresponsive und biokompatible Polymere basierend auf Diethylenglykolmethylethermethacrylat (MEO_2MA) und Oligo(ethylenglykol)methylethermethacrylat ($OEGMA_{475}$, M_n = 475 g/ mol) über frei radikalische Copolymerisation synthetisiert. Der thermoresponsive Phasenübergang der Copolymere wurde in wässriger Lösung und in gequollenen vernetzten dünnen Schichten beobachtet. Außerdem wurde untersucht, inwiefern eine selektive Proteinbindung an geeignete funktionalisierte Copolymere die Phasenübergangstemperatur beeinflusst.

Die thermoresponsiven Copolymere wurden über photovernetzbare Gruppen auf festen Oberflächen immobilisiert. Die nötigen lichtempfindlichen Vernetzereinheiten wurden mittels des polymerisierbaren Benzophenonderivates 2-(4-Benzoylphenoxy)ethylmethacrylat (BPEM) in das Copolymer integriert. Dünne Filme der Copolymere mit ca. 100 nm Schichtdicke wurden über Rotationsbeschichtung auf Siliziumwafer aufgeschleudert und anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht vernetzt und auf der Oberfläche immobilisiert. Die Filme sind stabiler je größer der Vernetzeranteil und je größer die Molmasse der Copolymere ist. Bei einem Waschprozess nach der Vernetzung wird beispielsweise aus einem Film mit moderater Molmasse und geringem Vernetzeranteil mehr unvernetztes Copolymer ausgewaschen als bei einem höhermolekularen Copolymer mit hohem Vernetzeranteil. Die Quellbarkeit der Polymerschichten wurde mit Ellipsometrie untersucht. Sie ist größer je geringer der Vernetzeranteil in den Copolymeren ist. Schichten aus thermoresponsiven OEG-Copolymeren zeigen einen Volumenphasenübergang vom Typ der LCST. Der thermoresponsive Kollaps der Schichten ist komplett reversibel, die Kollapstemperatur kann über die Zusammensetzung der Copolymere eingestellt werden. Für einen Vergleich dieser Eigenschaften mit dem gut charakterisierten und derzeit wohl am häufigsten untersuchten thermoresponsiven Polymer Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM) wurden zusätzlich photovernetzte Schichten aus PNIPAM hergestellt und ebenfalls ellipsometrisch vermessen. Im Vergleich zu PNIPAM

verläuft der Phasenübergang der Schichten aus den Copolymeren mit Oligo(ethylenglykol)-seitenketten (OEG-Copolymere) über einen größeren Temperaturbereich.

Mit Licht einer Wellenlänge > 300 nm wurden die photosensitiven Benzophenongruppen selektiv angeregt. Bei der Verwendung kleinerer Wellenlängen vernetzten die Copolymerschichten auch ohne die Anwesenheit der lichtempfindlichen Benzophenongruppen. Dieser Effekt ließ sich zur kontrollierten Immobilisierung und Vernetzung der OEG-Copolymere einsetzen. Als weitere Methode zur Immobilisierung der Copolymere wurde die Anbindung über Amidbindungen untersucht. Dazu wurden OEG-Copolymere mit dem carboxylgruppenhaltigen 2-Succinyloxyethylmethacrylat (MES) auf mit 3-Aminopropyldimethylethoxysilan (APDMSi) silanisierte Siliziumwafer rotationsbeschichtet, und mit dem oligomeren α, ω-Diamin Jeffamin® ED-900 vernetzt. Die Vernetzungsreaktion erfolgte ohne weitere Zusätze durch Erhitzen der Proben. Die Hydrogelschichten waren anschließend stabil und zeigten neben thermoresponsivem auch pH-responsives Verhalten.

Um zu untersuchen, ob die Phasenübergangstemperatur durch eine Proteinbindung beeinflusst werden kann, wurde ein polymerisierbares Biotinderivat 2-Biotinyl-aminoethylmethacrylat (BAEMA) in das thermoresponsive Copolymer eingebaut. Der Einfluss des biotinbindenen Proteins Avidin auf das thermoresponsive Verhalten des Copolymers in Lösung wurde untersucht. Die spezifische Bindung von Avidin an das biotinylierte Copolymer verschob die Übergangstemperatur deutlich zu höheren Temperaturen. Kontrollversuche zeigten, dass dieses Verhalten auf eine selektive Proteinbindung zurückzuführen ist.

Thermoresponsive OEG-Copolymere mit photovernetzbaren Gruppen aus BPEM und Biotingruppen aus BAEMA wurden über Rotationsbeschichtung auf Gold- und auf Siliziumoberflächen aufgetragen und durch UV-Strahlung vernetzt. Die spezifische Bindung von Avidin an die Copolymerschicht wurde mit Oberflächenplasmonenresonanz und Ellipsometrie untersucht. Die Bindungskapazität der Schichten war umso größer, je kleiner der Vernetzeranteil, d. h. je größer die Maschenweite des Netzwerkes war. Die Quellbarkeit der Schichten wurde durch die Avidinbindung erhöht. Bei hochgequollenen Systemen verursachte eine Mehrfachbindung des tetravalenten Avidins allerdings eine zusätzliche Quervernetzung des Polymernetzwerkes. Dieser Effekt wirkt der erhöhten Quellbarkeit durch die Avidinbindung entgegen und lässt die Polymernetzwerke schrumpfen.

Scientific Abstract

This work describes the synthesis and characterization of thermoresponsive polymers and their immobilisation on solid substrates as nanoscale thin films. The used polymers were of the lower critical solution temperature (LCST) type. They are well soluble in a solvent below a and get insoluble above a certain temperature, thus they exhibit a phase transition at a critical temperature. Different thermoresponsive biocompatible copolymers based on oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate ($OEGMA_{475}$) and di(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (MEO_2MA) were synthesized by free radical polymerization. The phase transition was observed in solution and in thin immobilized copolymer layers. Further regarding the phase transition the influence of selective protein binding onto functionalized copolymers was studied.

Solid surfaces were modified with thermoresponsive copolymers based on MEO_2MA, $OEGMA_{475}$ and 2-(4-benzoylphenoxy)ethyl methacrylate (BPEM) as photo-crosslinkable groups. Thin films of 100 nm thickness were spin-casted onto silicon wafers and subsequently crosslinked and immobilized by irradiation with UV-light. Their stability is controlled by the crosslinker ratio and by the molar mass of the copolymers. For instance a washing process after crosslinking removes more unbound polymer if the polymer contains less crosslinker and has a lower molecular weight. The swellability of the films was investigated by ellipsometry. It gets higher with lower crosslinker ratio. Layers of thermoresponsive copolymers exhibited a swelling/ deswelling phase transition of the lower critical solution temperature (LCST) type. The transition is completely reversible and the transition temperature can be adjusted by the composition of the copolymers. Compared to similarly synthesized photo-crosslinked layers of the well investigated thermoresponsive copolymer poly-(*N*-isopropyl acrylamide) (PNIPAM) the phase transition exceeds a larger temperature range.

The photo-crosslinking of the OEG-copolymers was accomplished in a controlled manner with light of wavelengths > 300 nm. Light of smaller wavelengths crosslinked the copolymer layers even without the presence of photosensitive groups. This effect could be exploited for a controlled immobilization and crosslinking of the OEG-copolymers. As further method for crosslinking the formation of amide bonds was investigated. Therefore OEG-copolymers containing 2-succinyloxyethyl methacrylate (MES) were spin-casted onto silicon substrates silanized with (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane (APDMSi) and crosslinked with oligomeric α, ω-diamine Jeffamin® ED-900. The crosslinking reaction was carried out by annealing the dry

substrate. No further additives were added for the reaction. After annealing the hydrogel layers were stable against washing and showed thermoresponsive and pH-responsive behaviour.

In order to investigate whether the phase transition can be affected by specific protein binding, a polymerizable biotin derivative biotinyl-2-aminoethyl methacrylate (BAEMA) was integrated into the base thermoresponsive OEG-copolymer. The influence of avidin on its thermoresponsive behaviour was investigated. The specific binding of avidin to the bioitinylated copolymer caused a marked shift of the transition temperature to higher temperatures. Control experiments proved that this effect can be ascribed to a specific protein binding.

Thermoresponsive OEG-Copolymers with photo-crosslinkable groups from BPEM and biotin groups from BAEMA were spin-casted onto gold and silicon substrates and subsequently crosslinked by irradiation with UV-light. The specific binding of Avidin onto the copolymer layer was investigated by surface plasmon resonance spectroscopy and ellipsometry. The binding capacity was higher if the mesh size of the hydrogel layers was higher. Upon binding of the Avidin the swellability of the layers was increased. At temperatures below the phase transition for loosely crosslinked copolymer layers an additional crosslinking effect of Avidin was observed. This effect counteracts the swelling of the hydrogel and leads to a shrinkage of the hydrogel layer.

Verzeichnis der benutzten Abkürzungen und Variablen

AIBN	Azobis(isobutyronitril)
APDMSi	3-Aminopropyldimethylethoxysilan
ATR	Abgeschwächte Totalreflexion
ATRP	radikalische Polymerisation mit Atom-Übertragung
BAEMA	2-Biotinylaminoethylmethacrylat
BAPMA	3-Biotinylaminopropylmethacrylamid
BIS	*N*,*N*-Methylenbisacrylamid
BPEM	2-(4-Benzoylphenoxy)ethylmethacrylat
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: *bovine serum albumine*)
c	Konzentration
CTA	Kettenüberträger (engl.: *chain transfer agent*)
d	Schichtdicke
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DEA	*N*,*N*-Diethylacrylamid
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMA	*N*,*N*-Dimethylacrylamid
DMF	*N*,*N*-Dimethylformamid
DP_n	Polymerisationsgrad (engl.: *degree of polymerization*)
E	Extinktion
ε	Extinktionskoeffizient
f	Radikalausbeute für die Initiatordissoziation
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid
EGDMA	Ethylenglykoldimethacrylat
Fab	Antigen-bindendes Fragment (engl.: *Fragment antigen binding*)
FEREM	Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie
FRP	freie radikalische Polymerisation
GPC	Gelpermeationschromatographie
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-carboxylsäure
HPMA	2-Hydroxypropylmethacrylamid
$[I_2]$	Initiatorkonzentration
k	Geschwindigkeitskoeffizient
l	Weglänge
λ	Wellenlänge
LbL	Schicht für Schicht (engl.: *layer by layer*)
LCST	untere kritische Lösungstemperatur (engl.: *lower critical solution temperature*)
[M]	Konzentration des Monomers
M	Molmasse
MALLS	Vielwinkel Laser-Lichtstreuung (engl.: *multiangle laser light scattering*)
MES	2-Succinyloxyethylmethacrylat (engl.: *(mono-(2-(methacryloyloxy)ethyl) succinate)*
MEO_2MA	Diethylenglykolmethylethermethacrylat
M_n	Zahlenmittel der Molmasse
M_w	Gewichtsmittel der Molmasse
n	Stoffmenge
NHS	*N*-Hydroxysuccinimid
NMP	Nitroxid-vermittelte Polymerisation
NMR	Kernspinresonanz
OEG	Oligo(ethylenglykol)
OEGA	Oligo(ethylenglykol)methylether-acrylat
$OEGMA_{475}$	Oligo(ethylenglykol)methylether-methacrylat mit einer durchschnittlichen Molmasse von 475 g/ mol
QCM	Quarzkristall-Mikrowaage (engl.: *quartz crystal microbalance*)
$[P\cdot]$	Radikalkonzentration
PAA	Poly(acrylsäure)
PAH	Poly(allyaminhydrochlorid)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PDEAm	Poly(*N*,*N*-diethylacrylamid)
PEG	Polyethylenglykol
PDI	Polydispersitätsindex
PNIPAM	Poly(*N*-isopropylacrylamid)
POEGMA	Poly[oligo(ethylenglykol)methylether-methacrylat]
r_p	Wachstumsgeschwindigkeit
r_t	Abbruchgeschwindigkeit
RAFT	Kettenübertragung mit reversibler Addition und anschließender Fragmentierung (engl.: *reversible addition-fragmentation chain transfer*)
RIU	Brechungsindexeinheiten (engl.: *refractive index units*)
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: *ribonucleic acid*)
Rps	Umdrehungen pro Sekunde (engl.: *revolutions per second*)
SAM	Selbstorganisierende Monoschichten (engl.: *self-assembled monolayer*)
SPR	Oberflächenplasmonen-resonanzspektroskopie (engl.: *surface plasmon resonance spectroscopie*)
T	Temperatur
THF	Tetrahydrofuran
TP	Trübungspunkt
UCST	obere kritische Lösungstemperatur (engl.: *upper critical solution temperature*)
UV/vis	ultravioletter und sichtbarer Bereich der elektromagnetischen Strahlung
V	Volumen
X	Umsatz
ΔH_{mix}	Mischungsenthalpie
ΔG_{mix}	Freie Mischungsenthalpie
ΔS_{mix}	Mischungsentropie
ν	kinetische Kettenlänge

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Schaltbare Polymere auf dem Weg zur Anwendung 1

1.2 Zielstellung und Inhaltsübersicht 3

2 Theoretischer Teil 7

2.1 Thermoresponsive Polymere 7

2.1.1 Thermoresponsive Polymere zur Analytdetektion 10

2.1.2 Thermoresponsive Hydrogele 12

2.2 Immobilisierung von Hydrogelen auf Oberflächen 15

2.3 Vernetzungsreaktion benzophenonhaltiger Polymere 16

2.4 Charakterisierung nanoskaliger Polymerschichten 19

2.4.1 Ellipsometrie 19

2.4.2 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie 23

3 Ergebnisse und Diskussion 27

3.1 Immobilisierung dünner Hydrogelschichten 27

3.1.1 Immobilisierung über photovernetzbare Schichten 27

3.1.2 Immobilisierung über kürzerwellige UV-Strahlung 50

3.1.3 Immobilisierung durch Amidbildung 54

3.2 Thermoresponsive Polymere zur Proteinerkennung 64

3.2.1 Synthese und Charakterisierung biotinylierter thermoresponsiver Copolymere 64

3.2.2 Einfluss der Avidinbindung auf das Phasenverhalten 69

3.2.3 Kontrollversuche – Spezifität 73

3.3 Dünne Hydrogelschichten für die Proteinerkennung 75

3.3.1 Untersuchungen zur Permeabilität der Hydrogelschichten mittels Oberflächenplasmonenresonanz 76

3.3.2 Untersuchungen zum Einfluss der Proteinbindung auf die Quellbarkeit der Hydrogelschichten mittels Ellipsometrie 80

4 Zusammenfassung, Fazit und Ausblick 87

5 Experimenteller Teil 91

5.1 Verwendete Chemikalien 91

5.2 Verwendete (Mess)instrumente 92

5.3 HABA – Avidin – Bindungsassay 94

5.4 Schichtpräparation und –charakterisierung 94

5.4.1 Photovernetzung der Copolymerschichten 95

5.4.2 Thermische Vernetzung der Copolymerschichten 95

5.4.3 Quellmessungen an den Hydrogelmonolithen 96

5.5 Synthesen 97

5.5.1 Monomersynthesen 97

5.5.2 Polymersynthesen 102

5.5.3 Synthese der Hydrogelmonolithe 106

6 Literaturverzeichnis 107

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen 114

7.1 Abbildungen 114

7.2 Tabellen 118

Anhang ..... A

1 Einleitung

1.1 Schaltbare Polymere auf dem Weg zur Anwendung

Schaltbare (oft auch: responsive) Polymere reagieren auf spezifische externe *Stimuli* mit einer vorherbestimmten Zustandsänderung.[1] Das Wechseln zwischen den Zuständen ist reversibel. Häufig werden schaltbare Polymere unter dem Begriff intelligente Polymere (engl.: *smart polymers*) geführt, da der Zustandswechsel, angetrieben durch eine äußere Umgebungsänderung, selbstständig verläuft. Idealerweise lösen bereits kleine Änderungen in der Umgebung einen großen äußeren Effekt aus. Mögliche Auslöser für die Zustandsänderung des Polymers sind beispielsweise eine Änderung von pH-Wert,[2-4] Licht,[5-7] Ionenstärke[8, 9] oder der Temperatur.[10-12]

Ab Mitte der 1990er Jahren erlebte die Erforschung schaltbarer Materialien einen wahren Boom.[13] Waren zunächst vor allem die Charakterisierung der physikochemischen Vorgänge auf molekularem Level und auf makroskopischer Ebene wichtig, rückten später Überlegungen zur Anwendung dieser Eigenschaften schaltbarer Polymere in den Vordergrund. Potentielle Einsatzmöglichkeiten bestehen für viele Anwendungsgebiete von der Mikroelektronik über Katalysetechnik, Aktorik bis hin zur Medizintechnik.[14-17] Interessante Ansätze für den Einsatz responsiver Polymere in der Mikrofluidik lieferten beispielsweise Arbeiten aus der Gruppe von Fréchet.[18, 19] Sie zeigten, dass ein thermoresponsives, vernetztes Polymer, eingebaut in Mikrokanäle, als Mikroventil fungiert und allein über die Umgebungstemperatur gesteuert werden kann. Mechanisches oder elektrisches Einwirken ist bei diesem intelligenten Mikroventil nicht nötig.

Ein besonderer Schwerpunkt der Forschung zu responsiven Polymeren liegt in den letzten Jahren auf biomedizinischen Anwendungen. Auch in der Natur basieren viele Vorgänge auf Schaltvorgängen, die durch bestimmte *Stimuli* gesteuert werden. Eine Kopie dieser besonderen Eigenschaften für den biomedizinischen Bereich ist daher naheliegend: Potentielle Anwendungen sind beispielsweise der kontrollierte Wirkstofftransport (engl.: *drug delivery*), die Gewebekonstruktion (engl.: *tissue engineering*), die kontrollierte Zelldesorption, die

Affinitätschromatographie oder der Einsatz in Biosensoren.[20-29] Beim Einsatz responsiver Polymere in biomedizinischen Anwendungen ergeben sich besondere Herausforderungen, die nur über die Wahl eines geeigneten Polymersystems bewältigt werden können. Hier sind vor allem wasserbasierende Polymere gefragt, da sich Lebensprozesse sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nur in wässriger Umgebung abspielen. Innerhalb dieser Systeme ist die für *in vivo* Anwendungen essentielle Frage nach Unverträglichkeiten und der Toxizität synthetischer, schaltbarer Polymere noch nicht vollständig untersucht.[30] Für *in vitro* Anwendungen, insbesondere in der Bioanalytik, ist es dagegen vor allem wichtig, unspezifische Adsorption von Biomolekülen an das Polymer zu vermeiden.[31-33] In Mikroarrays führt die unspezifische Bindung beispielsweise zum so genannten Hintergrundrauschen und setzt damit die Empfindlichkeit herab.

Je nach Anwendung sind die Anforderungen an responsive Polymere teils sehr komplex. Bis heute werden daher viele neue Polymersysteme mit unterschiedlichen Eigenschaften entwickelt. Viele Untersuchungen auf dem Gebiet der schaltbaren Polymere für Bioanwendungen befassen sich daher vor allem mit der Synthese und den interessanten physikochemischen und biochemischen Eigenschaften neuer biokompatibler Polymersysteme.[34-38] Überwiegend werden dazu grundlegende Untersuchungen in Lösung durchgeführt, da homogene Systeme synthetisch leichter zugänglich und deutlich einfacher zu charakterisieren sind als heterogene Systeme.[39, 40] Für Anwendungen sind Polymerlösungen allerdings nur in Ausnahmefällen einsetzbar. Eine Immobilisierung der Polymersysteme auf Oberflächen bietet verschiedene Vorteile: Im Gegensatz zu Systemen in Lösung sind feste Substrate wesentlich einfacher zu benutzen. Für technische Anwendungen und automatisierte Prozesse sind definierte Abmessungen und ein fester Träger unerlässlich. Oberflächengebundene Systeme sind zudem haltbarer und weniger anfällig gegenüber falscher Handhabung als Flüssigkeiten. Darüber hinaus können oberflächengebundene Systeme wesentlich komplexer aufgebaut werden. In Biosensoren wird dadurch beispielsweise die Detektion mehrerer Parameter gleichzeitig auf einem Chip möglich. Außerdem kann durch die kleine Dimensionierung dünner Schichten die Verwendung des oftmals knappen Probenmaterials minimiert werden.

Für den Einsatz neuer biokompatibler, responsiver Polymermaterialien in biomedizinischen Anwendungen müssen praktikable Systeme für die Immobilisierung gefunden werden. Neue Ansätze zur Ausnutzung der responsiven Eigenschaften müssen weiter untersucht werden, dabei ist die Charakterisierung der Systeme in anwendungsrelevanten Formen wie dünnen Schichten unverzichtbar.

1.2 Zielstellung und Inhaltsübersicht

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Charakterisierung thermoresponsiver, funktionalisierter und oberflächengebundener Hydrogele (**Abbildung 1-1a**). Solche Systeme könnten beispielsweise Anwendung als Matrix für Biosensoren finden. Eine der wichtigsten Verbindungsklassen in der medizinischen Diagnostik sind Proteine. Das thermoresponsive Hydrogel sollte daher als Matrixmaterial für eine selektive Proteinbindung maßgeschneidert werden. In diesem Zusammenhang dient das thermoresponsive Hydrogel als Träger für die Erkennungseinheiten, an die die Analytmoleküle binden sollen (**Abbildung 1-1b**). Für responsive Hydrogele sind bereits einige Beispiele aus der Literatur bekannt, in denen der Phasenübergang direkt zur Analytdetektion eingesetzt werden kann (s. Kapitel 2.1.1). Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war es daher zu testen, ob das thermoresponsive Verhalten des Hydrogels, über die passive Funktion als Träger hinaus, direkt für die Detektion von Proteinen nutzbar ist.

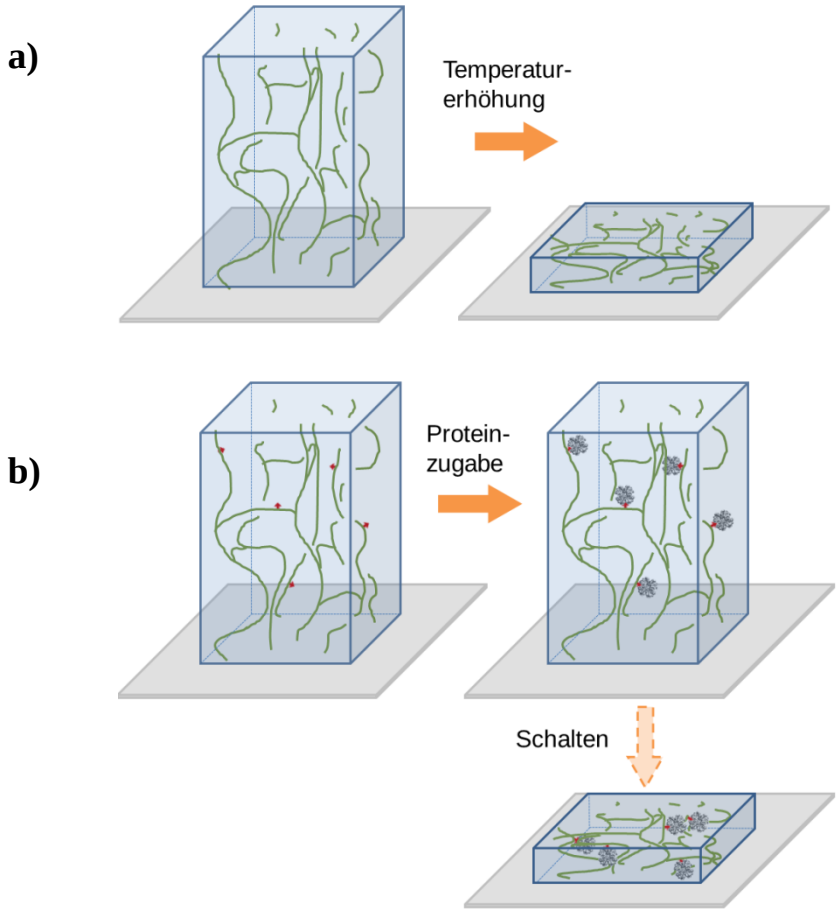


Abbildung 1-1: Schema zur Zielstellung dieser Arbeit. **a)** Immobilisierung eines thermoresponsiven Hydrogels auf eine Oberfläche. **b)** Einstellen der Hydrogeleigenschaften: Das Hydrogel soll als Matrixmaterial für eine selektive Proteinbindung dienen. Zusätzlich soll getestet werden, ob das Hydrogel direkt auf eine Proteinbindung reagieren kann.

Aus dem avisierten Anwendungsprofil ergeben sich verschiedene Anforderungen an das Hydrogel: Zunächst sollte das Polymergerüst des Hydrogels möglichst wenige unspezifische Bindungen mit Biomolekülen zulassen. Die spezifische Bindung von Proteinen mit funktionellen Einheiten im Hydrogel muss aber gewährleistet bleiben. Die Bindung der Analyten soll sowohl an der Oberfläche als auch im Inneren der Schicht möglich sein, da durch die zusätzliche Bindung innerhalb der Hydrogelschicht die Bindekapazität und damit die Sensitivität erhöht wird. Dazu muss das Hydrogel eine ausreichende Maschenweite aufweisen, um die Diffusion der Analyten nicht zu behindern.[41-43] Für Proteine mit einer typischen Größe von 3 – 15 nm sollte die Maschenweite des Hydrogels beispielsweise größer als 15 nm sein. Darüber hinaus ist es für eine hohe Bindungskapazität erstrebenswert, dass die Dicke der Hydrogelschicht ein Vielfaches der Analytabmessungen beträgt. Gleichzeitig darf die Schichtdicke aber nicht zu hoch gewählt werden, um eine rasche Diffusion des Analyten in das Innere der Schicht zu gewährleisten. Schließlich muss das eingesetzte Polymer responsiv sein und darf diese Eigenschaft bei der Immobilisierung nicht verlieren.

Die Umsetzung der Zielsetzung erfolgte in drei Abschnitten, wie sich in Kapitel 3 - Ergebnisse und Diskussion -wiederspiegelt. Zunächst wurde nach Methoden für die Synthese und Immobilisierung dünner Schichten gesucht. Wegen des speziellen Anwendungsprofils der Schichten stand gleichzeitig die genaue Charakterisierung ihrer Eigenschaften im Vordergrund. Danach wurde überprüft, ob das Schalten thermoresponsiver Polymere mit Proteinen grundsätzlich möglich ist, und schließlich wurde die Proteinbindefähigkeit und -schaltbarkeit von dünnen Schichten untersucht.

Für die Herstellung der Schichten wurde der Ansatz gewählt, zunächst ein unvernetztes Grundpolymer herzustellen und dieses dann an einer Oberfläche zu immobilisieren und zu vernetzen. Verschiedene Wege für die Immobilisierung des Grundpolymers werden in Kapitel 3.1 vorgestellt. Untersuchungen zur Variation der Schichtdicke, zur Schichtstabilität und zur kontrollierten Einstellung der Maschenweite finden sich in Kapitel 3.1.1. Eine große Herausforderung stellt die Charakterisierung gequollener nanoskaliger Hydrogelschichten dar. Für die Analyse der Hydrogelschichten wurde die Ellipsometrie verwendet. Diese Methode ermöglichte sowohl die Untersuchung ungequollener und gequollener Hydrogelschichten, als auch die Untersuchung des thermoresponsiven Verhaltens der Hydrogelschichten.

Das thermoresponsive Verhalten des Polymers sollte direkt zur Proteindetektion genutzt werden. Ein theoretisches Konzept für die Modifizierung thermoresponsiver Polymere zu

proteinresponsiven Polymeren ist in Kapitel 2.1.1 beschrieben. Um dessen Realisierbarkeit zu überprüfen, war zunächst eine grundlegende Untersuchung notwendig. Diese wird in Kapitel 3.2 vorgestellt. Das Kapitel beinhaltet die Synthese und Charakterisierung eines Protein-bindenden Polymers. Das veränderte Lösungsverhalten des Polymers bei Proteinzugabe wird beschrieben und weitere Untersuchungen zur Selektivität und Spezifität dieses Effekts werden dargelegt.

Kapitel 3.3 vereinigt die Ergebnisse für die Herstellung einer kontrollierten Schicht-architektur mit dem Konzeptbeweis. Hier wird ein Weg zur Herstellung proteinresponsiver Schichten vorgestellt. Dazu wurden proteinbindenende Polymere immobilisiert und vernetzt. Die Durchlässigkeit der hergestellten Schichten, die Bindekapazität, sowie das Schaltverhalten nach Proteinzugabe wurden untersucht.

2 Theoretischer Teil

2.1 Thermoresponsive Polymere

Thermoresponsive Polymere in Lösung weisen bei einer bestimmten Temperatur einen Übergang von einem gelösten Einphasen- in ein Zweiphasensystem auf.[44] Je nach Richtung des Phasenübergangs lassen sie sich in zwei Kategorien einteilen. Polymere mit einer oberen kritischen Entmischungstemperatur (engl.: *upper critical solution temperature*, UCST) sind unterhalb der kritischen Temperatur im Lösungsmittel unlöslich und gehen darüber in ein gelöstes Einphasensystem über. Im Wesentlichen entspricht dieses Verhalten also dem von niedermolekularen Stoffen, außer dass der Übergang bei Polymeren sehr abrupt bei einer definierten Temperatur erfolgen kann. Polymere mit einer unteren kritischen Entmischungstemperatur (engl.: *lower critical solution temperature*, LCST) sind dagegen bei niedrigeren Temperaturen im Lösungsmittel löslich und werden bei Temperaturen oberhalb der LCST unlöslich. Wegen dieses außergewöhnlichen Verhaltens und den damit möglichen Anwendungen, z. B. vor allem im biomedizinischen Bereich, sind besonders LCST-Polymere in den letzten Jahren in den Fokus intensiver Forschung gerückt.[22-24, 26, 45] Auch in dieser Arbeit sollen im Folgenden ausschließlich LCST-Polymere betrachtet werden.

Der temperaturinduzierte Phasenübergang ist für Polymerlösungen mit bloßem Auge sichtbar: Im Falle von LCST-Polymeren wird beispielsweise eine Polymerlösung beim Erhitzen über den sogenannten Trübungspunkt trübe. Der Trübungspunkt entspricht einem Punkt auf der Phasengrenze im Phasendiagramm der Polymerlösungen. Anders als die LCST, die am Minimum der Phasengrenze definiert ist, ist der Trübungspunkt also konzentrationsabhängig.

Prinzipiell existieren kritische Entmischungstemperaturen für Polymerlösungen in verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen.[11] Wasser ist allerdings das einzige für biologische Systeme praktisch relevante Lösungsmittel für biobasierte Anwendungen. Hier tritt für wasserlösliche Polymere, insbesondere bei nichtionischen Polymeren, das Phänomen der temperaturinduzierten Phasenseparation sehr häufig auf.[11]

Der Grund für das LCST-Verhalten lässt sich aus einer strukturellen Gemeinsamkeit aller dieser Polymere ableiten. Sie enthalten sowohl hydrophilere Gruppen wie Amid- oder Ethergruppen, als auch hydrophobe Anteile wie beispielsweise das Polymerrückgrat. Im gelösten Zustand sind Wassermoleküle mit den polaren Gruppen der Polymere über Wasserstoffbrückenbindungen verbunden, während sie um die hydrophoben Anteile eine geordnete Hydratationsschicht bilden. Für die Thermodynamik des Systems bedeutet das, dass beim Lösen des Polymers durch die Anordnung der Wassermoleküle um die hydrophoben Anteile die Mischungsentropie ΔS_{mix} negativ wird. Insgesamt wird der Beitrag zur freien Mischungsenthalpie ΔG_{mix} also positiv (Formel 2-1). Die Mischungsenthalpie ΔH_{mix} ist ebenso negativ und trägt damit bei jeder Temperatur zu einer freien Mischungsenthalpie $\Delta G_{mix} < 0$ bei:

$$\Delta G_{mix} = \Delta H_{mix} - T\Delta S_{mix} \qquad \textbf{\textit{Formel 2-1}}$$

Bei Temperaturerhöhung überwiegt ab der kritischen Temperatur der Entropieterm, die freie Mischungsenthalpie wird positiv und Polymer und Lösungsmittel entmischen sich. In neueren Berechnungen wird zusätzlich zu dieser rein entropischen Erklärung berücksichtigt, dass auch die Mischungsenthalpie eine gewisse Temperaturabhängigkeit zeigen kann. Je nach Polymersystem muss der Phasenübergang demnach nicht unbedingt rein entropiegetrieben sein.[46]

Die strukturelle Voraussetzung dafür, dass Polymere in wässrigen Medien eine LCST aufweisen, nämlich ein Gleichgewicht der hydrophilen und hydrophoben Bereiche, findet sich in vielen Polymeren. So existieren LCST-Polymere auch in verschiedensten Polymerklassen wie beispielsweise in Poly(meth-)acrylamiden, Polyvinylethern, Polyoxazolinen[47], Polypeptiden[48], Polyglycinen[49], zyklische Poly(*N*-vinylamid)en, Polyvinylphosphonaten[50] oder Polymeren mit Oligoethylenglykolseitenketten. Beispiele für häufig verwendete Polymere mit LCST in wässrigen Medien sind in **Abbildung 2-1** aufgeführt.[11] Jedes LCST-Polymer weist eine eigene charakteristische Entmischungstemperatur auf. Eine Vorhersage der Übergangstemperatur aufgrund der Struktur der Polymere ist schwierig, allerdings kann die LCST der Polymere über einen weiten Bereich verschoben werden, indem man hydrophilere oder hydrophobere Gruppen über Comonomere,[51] oder über eine nachträgliche polymeranaloge Reaktion einführt.[52]

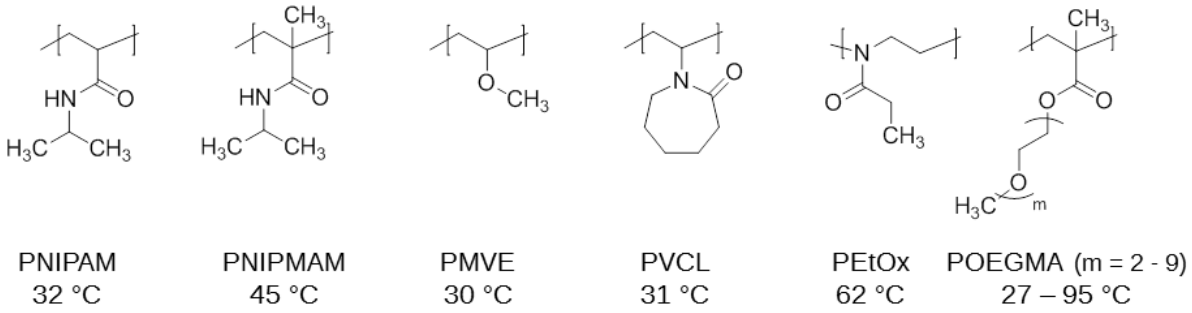


Abbildung 2-1: Strukturen häufig verwendeter thermoresponsiver Polymere mit zugehöriger LCST.[11] Von links nach rechts: Poly-(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM), Poly-(*N*-isopropylmethacrylamid) (PNIPMAM), Poly-(methylvinylether) (PMVE), Poly-(*N*-vinyl-ε-caprolactam), (PVCL), Poly-(2-ethyl-2-oxazolin), (PEtOx), Poly-((oligoethylenglykol)methylethermethacrylat), (POEGMA, LCST je nach Seitenkettenlänge).

Eines der in den letzten beiden Jahrzehnten am meisten untersuchten thermoresponsiven Polymere ist Poly-(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM).[51, 53-58] Daneben sind in den letzten Jahren auch Poly(oligoethylenglykol) -acrylate (OEGAs) und –methacrylate (OEGMAs) in den Fokus der Forschung gerückt.[59-65] Diese Polymere zeigen LCSTs, die jeweils von der Länge der Oligo(ethylenglykol)-Seitenketten und den Seitenkettenendgruppen abhängen.[66-69] Über die Kombination von Monomeren mit unterschiedlich langen Seitenketten kann die LCST derartiger Copolymere in einem weiten Temperaturbereich eingestellt werden, ohne das Polymersystem grundlegend zu ändern.[36, 70] OEGMAs und OEGAs, ebenso wie PEG selbst, sind dafür bekannt, sehr geringe unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen aufzuweisen.[71-76] Die Abwesenheit von ionischen und hydrophoben Gruppen, die mit Proteinen unspezifisch wechselwirken könnten, trägt wahrscheinlich erheblich zu dieser Eigenschaft bei. Außerdem spielt die hohe Mobilität der PEG-Ketten und die damit verbundene hohe Entropie des Systems eine Rolle. Bei Bindung eines Proteins würde die Beweglichkeit reduziert, was zu einer abstoßenden Komponente führt (Entropieelastizität).[72] Insbesondere diese *antifouling* Eigenschaften machen PEG-basierte thermoresponsive Polymere interessant für biomedizinische Anwendungen. In dieser Arbeit sollte insbesondere die unspezifische Bindung von Proteinen an das Polymer unterdrückt werden. Die Synthese eines thermoresponsiven Basismaterials erfolgte daher auf der Grundlage OEG-basierter Polymere.

2.1.1 Thermoresponsive Polymere zur Analytdetektion

Eine Möglichkeit thermoresponsive Polymere in Bioanwendungen zu nutzen ist deren Schaltbarkeit auf Biomoleküle zu übertragen. Dazu werden thermoresponsive Polymere oft in sogenannten Biokonjugaten mit Biomolekülen verknüpft.[77-79] Hoffman *et al.* veränderten auf diese Weise die Bindungstasche eines Proteins derart, dass seine Bindungsfähigkeit über die Temperatur an- und ausgeschaltet werden konnte.[80] In der Umkehrung dieses Konzepts wird ein Schaltvorgang durch die Bindung eines Biomoleküls an ein thermoresponsives Polymer induziert. Eine mögliche Strategie dafür ist, zusätzliche Vernetzungsstellen durch die Bindung des Analytmoleküls in ein Hydrogel einzubringen, oder umgekehrt, Vernetzungsstellen durch die Einwirkung eines Biomoleküls aufzulösen.[81-84] Die Verwendung von thermoresponsiven Polymeren ist bei dieser Strategie nicht zwingend notwendig. Miyata *et al.* führten beispielsweise in ein permanent wasserlösliches Poly(acrylamid) -Hydrogel über Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen zusätzliche Vernetzungsstellen ein, die bei Zugabe freien Antigens durch kompetitive Verdrängung wieder gelöst wurden (**Abbildung 2-2a**).[85]

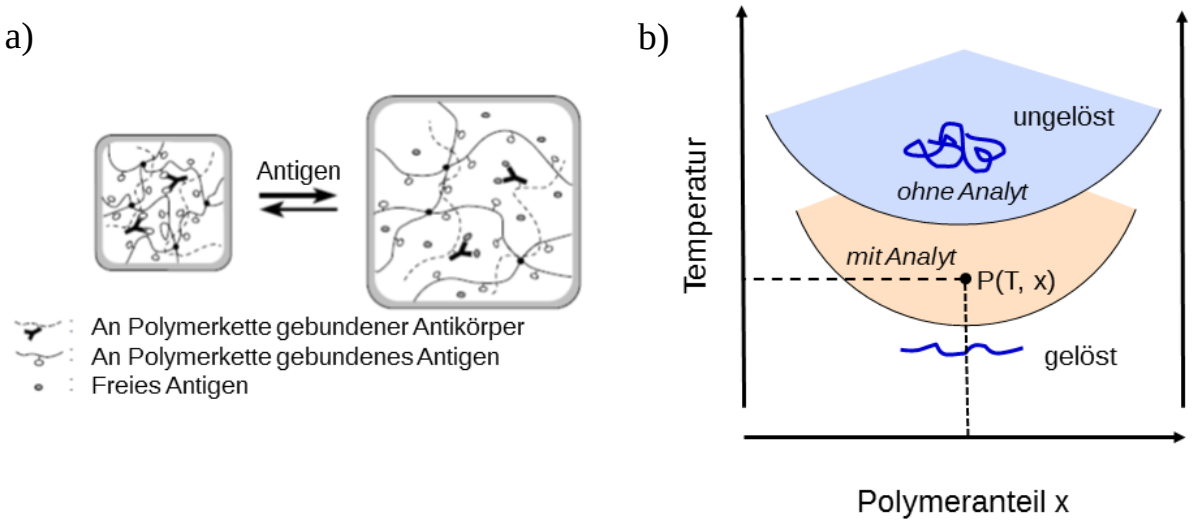


Abbildung 2-2: a) Strategie für die Realisierung eines Antikörper-responsiven Hydrogels mittels kompetitiver Verdrängung nach Miyata et al..[85] *Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature*, T. Miyata et al., 1999, 399, 766-769, *copyright 1999.*
b) Strategie für das direkte Ausnutzen der Thermoresponsivität des Polymers. Die Analytzugabe verschiebt die Phasengrenze des Systems, der Phasenzustand verändert sich dadurch.

In einer anderen Strategie wird die Thermoresponsivität des Polymers direkt für den Schaltvorgang ausgenutzt: Wenn sich durch die Bindung des Analyten das Löslichkeitsverhalten des Polymers ändert, wird die kritische Entmischungstemperatur verschoben (**Abbildung 2-2b**). Ist die LCST in einem passenden Temperaturbereich und wird sie durch die Analytbindung

ausreichend verschoben, befindet sich das Polymer vor der Bindung in einem anderen Lösungszustand als nach der Bindung. Man kann damit von einem analytinduzierten Phasenübergang sprechen. Im vereinfachten Schema in **Abbildung 2-2 b** liegt beispielsweise das Polymer am Punkt P vor der Analytzugabe gelöst vor. Nach der Analytzugabe erfolgt unter isothermen Bedingungen eine Phasenseparation des Polymers. In diesem Fall wirkt also die Präsenz des Analyten als Stimulus.

Nach diesem Prinzip können alle Einflüsse, die sich auf die Hydrophilie eines thermoresponsiven Polymers auswirken als Stimulus genutzt werden. Bei geeigneter Modifikation des Polymers können thermoresponsive Polymere beispielsweise licht-[7, 86] oder pH-sensitiv[4] gemacht werden. Werden verschiedene selektiv bindende Gruppen in das Polymer eingebaut, ist auch die Detektion molekularer Analyte möglich. Beispielsweise können über polymergebundene Kronenether Kationen detektiert werden.[8, 9] Ein viel untersuchtes System für die Detektion verschiedener natürlicher Diole wie niedermolekularer Glukose, oder auch höhermolekularer Nukleotide, RNA oder Glykoproteine, basiert auf deren Wechselwirkung mit Phenylboronsäure.[87-93] Durch die Stabilisierung der geladenen Form der polymergebundenen Phenylboronsäure bei der Bindung des Diols wird die Wasserlöslichkeit des Polymers erhöht. Dadurch wird, wie für das Konzept der analytinduzierten Phasenänderung erforderlich, die Phasengrenze zu höheren Temperaturen verschoben. Ein ähnliches Konzept wurde auch für bestimmte andere Biomakromoleküle angewendet: Quervernetzte PNIPAM Hydrogele mit eingebauten Fab-Fragmenten (Antigen-bindende Fragmente, engl.: *Fragments antigen binding*) von anti-Fluoreszein-Antikörpern quellen, wenn sie in Kontakt mit Fluoreszein kommen.[82] Ebenso quillt ein mit Lektin funktionalisiertes PNIPAM-Hydrogel, wenn es mit einer Lösung von Dextransulfat Natriumsalz in Kontakt kommt.[94] Auch für Bakterien als große Analyten wurde bereits von einer Beeinflussung der LCST eines thermoresponsiven Polymers durch spezifische Bindung berichtet. [95, 96] Allerdings beziehen sich alle diese Beispiele auf besonders große oder geladene, modifizierte Analyten. Für native Proteine, als eine der wichtigsten Analytklassen in der medizinischen Diagnostik, existieren noch keine Untersuchungen zur proteininduzierten Phasenänderung. Auch die Anwendbarkeit des Konzepts auf Oberflächen ist noch nicht untersucht. In dieser Arbeit wird sowohl der Einfluss einer selektiven Proteinbindung auf das Löslichkeitsverhalten eines thermoresponsiven Polymers, als auch die Übertragung des Konzepts auf Oberflächen untersucht.

2.1.2 Thermoresponsive Hydrogele

Basis für Gele sind Polymernetzwerke, in denen Polymerketten über physikalische Wechselwirkungen oder kovalente Bindungen miteinander verknüpft sind.[97, 98] Innerhalb dieser Netzwerke befindet sich ein flüssiges Quellmittel, welches, was Volumen und Masse betrifft, Hauptbestandteil des Gels ist. Bei Hydrogelen ist das Quellmittel Wasser. In einigen Fällen kann der Quellmittelanteil ein tausendfaches des Trockengewichts des Polymernetzwerkes ausmachen.[99] Wegen dieser Zusammensetzung können kleine Moleküle leicht in Hydrogele eindringen. Trotzdem weisen Gele noch typische Eigenschaften eines Feststoffes wie Formbeständigkeit oder elastisches Verhalten auf. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Hydrogele in der lebenden Natur eine weitverbreitete Zustandsform. Beispiele aus dem menschlichen Körper sind z. B. Kollagen oder Knorpel.

Eine wichtige Charakterisierungsgröße für Hydrogele ist der Quellgrad (engl.: *swelling ratio*, SR). Er gibt an wie viel Wasser das Hydrogel gegenüber seinem Trockengewicht aufnimmt. Er wird bestimmt nach:

$$SR = \frac{\phi_{P,0}}{\phi_{P,q}} \approx \frac{m_q}{m_0} \qquad \textbf{\textit{Formel 2-2}}$$

Mit $\phi_{P,0}$ als Volumenanteil des Polymers im ungequollenen Zustand und $\phi_{P,q}$ als Volumenanteil des Polymers im gequollenen Zustand. m_q bzw. m_0 ist die Masse des Hydrogels im gequollenen bzw. ungequollenen Zustand. Der Massequotient entspricht exakt dem Quellgrad, wenn die Dichte des reinen Polymernetzwerkes der von Wasser entspricht (= 1,0 g/ cm³). Da der Brechungsindex des Hydrogels vom Anteil der beiden Einzelkomponenten Wasser und Polymer abhängt, kann der Quellgrad auch über den gemischten Brechungsindex des Hydrogels n_{mix} bestimmt werden. Dazu wird in einer sogenannten effektiven Medium Approximation von den optischen Eigenschaften der Einzelkomponenten (Brechungsindex des Wassers n_{H2O} und Brechungsindex des Polymers $n_{Polymer}$) auf den Volumenanteil und damit auf den Quellgrad geschlossen: [122, 123]

$$SR = \frac{\frac{n_{Polymer}^2-1}{n_{Polymer}^2+2} - \frac{n_{H2O}^2-1}{n_{H2O}^2+2}}{\frac{n_{mix}^2-1}{n_{mix}^2+2} - \frac{n_{H2O}^2-1}{n_{H2O}^2+2}} \qquad \textbf{\textit{Formel 2-3}}$$

Liegt das Hydrogel immobilisiert als dünne Schicht vor, kann es nur in eine Raumrichtung quellen. Der Quellgrad ist für solche Systeme daher allein über die Schichtdicke d und die Trockenschichtdicke d_0 bestimmt:

$$SR_{film} = \frac{d}{d_0} \qquad \textit{Formel 2-4}$$

Quellen Hydrogele, bindet zunächst das Wasser direkt an polare Gruppen und solvatisiert hydrophobe Gruppen der Polymerketten (primär- und sekundär gebundenes Wasser). Über den osmotischen Druck wird weiter Wasser (freies Wasser) in das Netzwerk gezogen, bis die elastische Rückstellkraft des Netzwerkes einem weiteren Quellen entgegenwirkt.[28] Eine thermodynamische Betrachtung dieses Gleichgewichtzustandes liefert den Ansatzpunkt für die Flory-Rehner-Theorie, die ein gequollenes Hydrogel mathematisch beschreibt. Nach der Flory-Rehner-Theorie ist der Quellgrad proportional zur Anzahl der Monomereinheiten zwischen den Vernetzungspunkten N_c [100, 101]:

$$SR_{bulk} \propto N_c^{\frac{3}{5}} \qquad \textit{Formel 2-5}$$

Umgekehrt bedeutet das, dass die Maschenweite eines Hydrogelnetzwerkes über den Quellgrad bestimmt ist. Untersuchungen zur Maschenweite eines Hydrogels können damit über den einfacher zugänglichen Quellgrad erfolgen.

Toomey *et al.* erweiterten den thermodynamischen Ansatz der Flory-Rehner-Theorie für eine Beschreibung des Quellgrades oberflächengebundener Systeme[102]:

$$SR_{film} \propto N_c^{\frac{1}{3}} \qquad \textit{Formel 2-6}$$

Da oberflächengebundene Hydrogele beim Quellen in zwei Freiheitsgraden eingeschränkt sind, unterscheidet sich deren Quellgrad gegenüber dem von makroskopischen Hydrogelen. Der mathematische Zusammenhang zwischen den beiden Quellgraden ist entgegen einfachen geometrischen Überlegungen, nicht über die Kubikwurzel gegeben, sondern komplizierter. Für oberflächengebundenes PDMAAm konnten Toomey *et al.* den mathematisch hergeleiteten Zusammenhang aus **Formel 2-6** experimentell belegen.[102]

Das thermoresponsive Verhalten von Hydrogelen kann sich je nach Art der Vernetzung sehr unterschiedlich darstellen. Physikalisch vernetzte Hydrogele sind über zwischenmolekulare Kräfte wie elektrostatische Wechselwirkungen, kristalline Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen vernetzt. Die Bindungen in physikalisch vernetzten Systemen sind wegen der geringen Bindungsstärke physikalischer Wechselwirkungen dynamisch, und können beispielsweise durch thermische Energie gelöst werden. Das Hydrogel wird so in einen flüssigen Zustand überführt (Sol). Ein typisches Alltagsbeispiel für ein physikalisch vernetztes Hydrogel mit thermoreversibler Gelierung ist Gelatine. Die Vernetzung erfolgt bei Gelatine über Wasserstoffbrückenbindungen. Beim Erwärmen einer Lösung von Gelatine in Wasser werden diese gelöst, und die Gelatine wird verarbeitbar. Ein eleganter synthetischer Ansatz für die Herstellung von thermoreversiblen Gelen mittels hydrophober Wechselwirkungen wird bei der Gelierung von amphiphilen Blockcopolymeren verfolgt.[103-107] In Wasser vernetzen diese über hydrophobe Wechselwirkungen der wasserunlöslichen Blöcke. Wird in den Blockcopolymeren entweder der hydrophobe oder der hydrophile Block durch ein thermoresponsives Polymer schaltbar gemacht, erfolgt bei Temperaturerhöhung über die LCST des Polymers eine Gelierung oder Auflösung des Hydrogels. Die Übergangstemperatur für den Sol-Gel-Übergang kann in beiden Fällen über das thermoresponsive Polymer sehr präzise eingestellt werden.

In chemisch vernetzten Hydrogelen sind die konstituierenden Polymerketten über kovalente Bindungen verknüpft. Sie können daher als ein einziges großes Makromolekül angesehen werden und sind nicht ohne weiteres wieder aufzulösen. Je nach Syntheseweg können chemisch vernetzte Hydrogele als makroskopische Hydrogele, als Mikrogele oder in vernetzten dünnen Schichten hergestellt werden.[91, 108-112] Bei Hydrogelen aus kovalent vernetzten thermoresponsiven Polymeren erfolgt bei einer Temperaturerhöhung über die Schalttemperatur des Polymers hinaus ein Volumenphasenübergang. Bei der Temperaturerhöhung verringert sich die Wasserlöslichkeit des Polymergerüstes, Wasser wird dadurch aus dem Polymernetzwerk verdrängt, das Hydrogel schrumpft, und der Quellgrad nimmt ab. Da beim Volumenphasenübergang keine Bindungen gebrochen oder geknüpft werden, ist er reversibel.

2.2 Immobilisierung von Hydrogelen auf Oberflächen

Die Methoden zur Immobilisierung von Hydrogelen auf Oberflächen lassen sich, wie die Methoden zur Immobilisierung von Polymeren allgemein, in zwei verschiedene mechanistische Ansätze einteilen.

Bei der sogenannten „*grafting-from*"-Strategie werden die Polymere während der Immobilisierung, *in situ* synthetisiert. Das Kettenwachstum findet an der Substratoberfläche statt, die Polymerketten wachsen in die Reaktionslösung hinein. Bei entsprechender Funktionalisierung der Oberfläche mit geeigneten initiierenden Gruppen ist „*grafting-from*" mit verschiedenen Polymerisationstechniken, wie beispielsweise FRP[113], ATRP[32, 114, 115], RAFT[116] oder auch anionischer[117] und kationischer Polymerisation[118] möglich. Ein wesentlicher Vorteil des „*grafting-from*" ist, dass die Polymerketten auf den Oberflächen mit einer hohen Dichte immobilisiert werden können[119]. Um neben Polymerbürsten auch quervernetzte Systeme herzustellen, müssen entweder Vernetzermoleküle zur Reaktionsmischung hinzugefügt werden oder die einzelnen Polymerketten in einem zusätzlichen Schritt miteinander verbunden werden. In der praktischen Anwendung spielt *„grafting-from"* noch eine untergeordnete Rolle, da es meist unter Inertgas durchgeführt werden muss und das Verhältnis von eingesetztem zu tatsächlich genutztem Material oft sehr ungünstig ist. Darüber hinaus ist die Analyse des immobilisierten Polymers schwer zu realisieren und die möglichen Polymerschichtdicken beschränken sich auf den Nanometerbereich.

Beim „*grafting-to*" werden bereits synthetisierte Polymere auf einem Substrat fixiert. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die vorsynthetisierten Polymere vor dem Auftragen auf die Oberfläche auch mit Analysemethoden charakterisiert werden können, die lösliche Polymere erfordern. Tragen die Polymere keine reaktiven Gruppen, können sie beispielsweise über Plasmabehandlung immobilisiert werden.[120, 121] Bei diesem hochenergetischen Verfahren werden die Polymerketten gleichzeitig mit der Immobilisierung auf dem Substrat untereinander quervernetzt. In einem anderen Ansatz bilden amphiphile Blockcopolymere selbstorganisierte Strukturen und binden über hydrophobe Wechselwirkungen an Oberflächen.[122] Auch Polymere mit reaktiven Gruppen können direkt an aktivierte Substrate binden. Die Möglichkeiten zur Wechselwirkung der Polymere mit der Oberfläche sind vielfältig. Im „*layer-by-layer*-Verfahren" binden Polyelektrolyte beispielsweise rein über elektrostatische Wechselwirkungen,[123-125] Meist werden reaktive Polymere allerdings über kovalente Bindungen mit den Substraten verknüpft. Ähnlich wie beim „*grafting-from*" Ansatz müssen bei dieser Methode auch die Substrate für die

Reaktion aktiviert, d. h. mit funktionellen Gruppen versehen sein. Eine weitverbreitete Strategie dafür ist die Herstellung von selbstorganisierenden Monoschichten (engl.: *self-assembled monolayer*, SAM). Für deren Herstellung auf Silizium oder Glassubstraten eignen sich beispielsweise funktionale Silane[126, 127], für die Herstellung auf Goldoberflächen Thiole[128, 129]. Werden auf diese Weise weitere Funktionalitäten eingeführt, wie Amine oder Carboxylgruppen, können diese mit Polymeren mit komplementären funktionellen Gruppen reagieren (beispielsweise unter der Ausbildung von Amidbindungen).[130]

Gleichzeitig mit der Immobilisierung des Polymers auf der Oberfläche kann auch eine Quervernetzung erfolgen. Dazu muss zusätzlich ein Vernetzer mit zwei oder mehreren adäquaten funktionellen Gruppen (z. B. Diamine oder Dicarbonsäuren) zugesetzt werden. Je nach Anzahl der funktionellen Gruppen kann so auch die Vernetzungsdichte eingestellt werden.

2.3 Vernetzungsreaktion benzophenonhaltiger Polymere

Neben der Vernetzung über reaktive funktionelle Gruppen können Polymere auch über Photovernetzer vernetzt werden. Photovernetzer generieren unter UV-Bestrahlung Radikale, die mit nahezu jedem organischen Material reagieren können.

Benzophenone werden seit vielen Jahren als Photoinitiatoren verwendet.[131] Bei der Bestrahlung mit UV-Licht generieren sie in der Reaktionsmischung reaktive Radikale, die wiederum eine radikalische Kettenreaktion starten. Werden Benzophenone als Photovernetzer verwendet, müssen sie direkt an das Polymer gebunden sein. Diese Strategie wird auch in dieser Arbeit verfolgt. Der Vorteil der UV-Vernetzung gegenüber Elektronenstrahlung oder Gammastrahlung liegt in den wesentlich milderen Bedingungen. Durch das UV-Licht können die UV-aktiven Gruppen selektiv angeregt werden, was eine bessere Kontrolle der Vernetzungsreaktion erlaubt.

Die Anregung des Benzophenons erfolgt über den n,π*-Übergang der Carbonylgruppe, der aufgrund des ausgedehnten konjugierten π-Elektronensystems gegenüber gewöhnlichen isolierten Carbonylgruppen bathochrom verschoben ist. Dadurch ist eine Anregung im milden

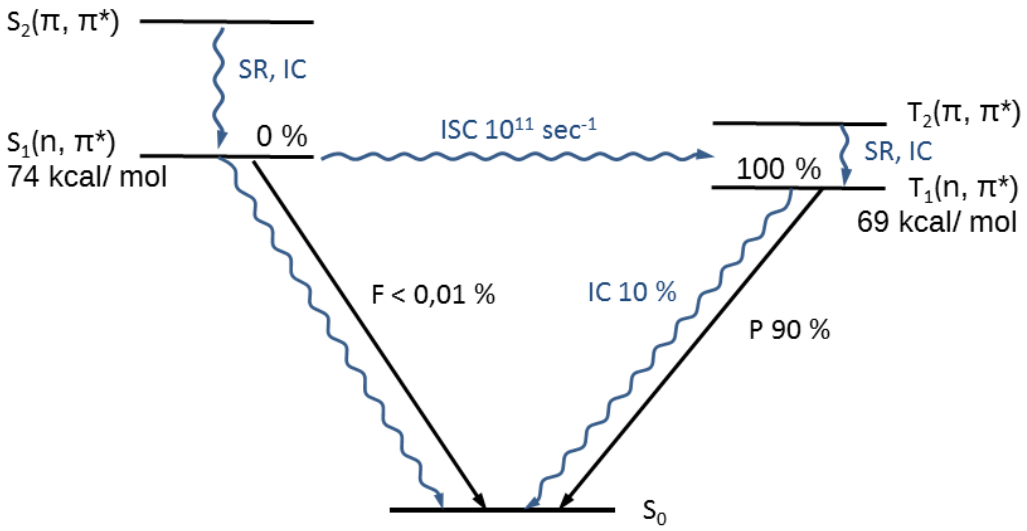


Abbildung 2-3: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm für Benzophenon bei 77 K.[132] Dargestellt sind die elektronischen Niveaus des Grundzustands S_0, der angeregten Singulettzustände S_1, S_2, der Triplettzustände T_1, T_2, sowie die Übergänge zwischen den Niveaus in Richtung des Grundzustands. Blaue, gekringelte Pfeile markieren strahlungslose Übergänge (Schwingungsrelaxation SR, Innere Umwandlung IC und Interkombination ISC), schwarze Pfeile Übergänge, die mit Aufnahme oder Abgabe elektromagnetischer Strahlung verbunden sind (Fluoreszenz F und Phosphoreszenz P). Aufgrund der geringen Energieunterschiede zwischen den Niveaus erfolgt die Interkombination sehr schnell.

UV-A – Bereich möglich. **Abbildung 2-3** zeigt ein vereinfachtes Jablonski Diagramm für Benzophenon. Nach der Anregung in das S_1-Niveau erfolgt nahezu vollständig ein *intersystem-crossing* ISC zum energetisch nahe liegenden T_2-Niveau. Da die Phosphoreszenz sehr langsam verläuft, reichern sich aktivierte Benzophenonmoleküle nach einem strahlungslosen Übergang im T_1-Niveau an. Dieser Zustand entspricht dem eines Biradikals.

Das gebildete reaktive Biradikal ist in der Lage Wasserstoffatome von organischem Material zu abstrahieren (vgl. **Abbildung 2-4**). Dabei hängt die Reaktionsrate für die Abstraktion davon ab, wie hoch die Dissoziationsenergie der gespaltenen CH-Bindung ist. Da CH-Bindungen in Nachbarschaft zu Heteroatomen X die ein freies Elektronenpaar tragen eine geringere Dissoziationsenergie aufweisen als CH-Bindungen in reinen gesättigten Kohlenwasserstoffketten, sind sie für eine homolytische Spaltung eher geeignet.[133] Durch die H-Abstraktion entstehen zwei Radikale. Beide können mit jedem anderen Radikal rekombinieren. Auf diese Weise können auch zwei Polymerketten ohne Photovernetzer verbunden werden, oder zwei aktivierte Benzophenongruppen miteinander rekombinieren. Nach Hayward *et al.* ist für Polymer-gebundene Systeme allerdings die Rekombination der beiden direkt gebildeten Radikale am Benzophenon und an der Polymerkette die wahrscheinlichste Reaktion.[134] In jedem Fall wird eine neue C-C-Bindung ausgebildet.

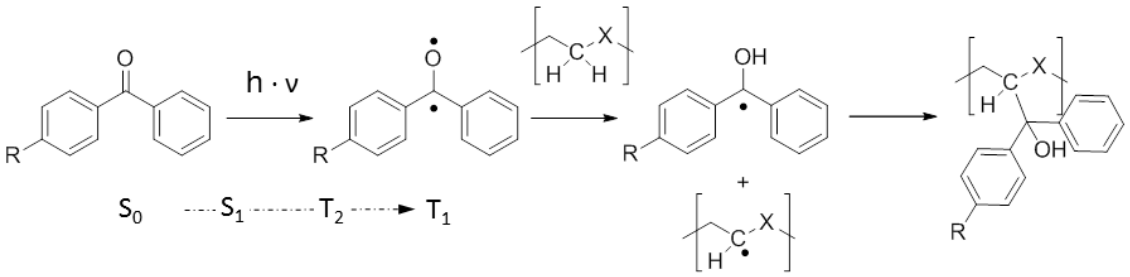


Abbildung 2-4: Vernetzungsreaktion polymergebundener Benzophenone durch Photoaktivierung. Atom X steht für verschiedene Elemente: Kohlenstoff oder Heteroatome. Bei Heteroatomen mit freiem Elektronenpaar ist die H-Abstraktion energetisch begünstigt.

Die Strategie, Benzophenone zur Synthese von Polymernetzwerken auszunutzen, wurde bereits für die Herstellung von Polymernetzwerken in Masse[135] als auch für die Anbindung von Polymerketten auf Oberflächen genutzt.[136, 137] Ein möglicher Weg für die Oberflächenfunktionalisierung ist, Benzophenone als Haftvermittler direkt auf der Oberfläche zu fixieren.[138, 139] Die generierten Radikale reagieren dann mit organischem Material in ihrer Umgebung. Ist die Oberfläche selbst organisch, funktioniert auch das umgekehrte Prinzip: Bei polymergebundenen Benzophenonen resultiert die Rekombination mit einem Radikal auf der Oberfläche in einer Immobilisierung des Polymers, eine Rekombination mit einer zweiten Polymerkette in einer Quervernetzung des Systems. Bei dieser UV-Vernetzung erfolgt daher die Immobilisierung und die Quervernetzung in einem Schritt.

2.4 Charakterisierung nanoskaliger Polymerschichten

Die Bestimmung der Schichtdicke nanoskaliger Polymerschichten erfordert wegen der geringen Abmessungen eine hohe Präzision und eine genaue vertikale Auflösung der Charakterisierungsmethode. Zur eingehenden Charakterisierung dünner thermosensitiver Hydrogelschichten muss in wässrigem Medium gearbeitet und die Temperatur variiert werden können. Mit Mikroskopiemethoden wie Rasterelektronenmikroskopie (REM), Feldemissions-Rasterelektronenmikroskopie (FEREM) oder Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist das nicht möglich. Die Messung wird zusätzlich durch die geringe Festigkeit und die Elastizität des Materials erschwert. Insbesondere im gequollenen Zustand des Hydrogels sind Methoden wie die Rasterkraftmikroskopie (engl.: *atomic force microskopie*, AFM), die einen direkten Kontakt mit dem Material erfordern, nicht ohne spezielle Modifikationen anzuwenden.[140] Aus dem gleichen Grund sind auch mit der Quarzkristallmikrowaage (QCM) bei gequollenen Hydrogelen nur geringe Schichtdicken (bis ca. 100 nm) verlässlich messbar.[141, 142] Bei größeren Schichtdicken werden die entfernteren Bereiche des Hydrogels durch die Schwingungen der QCM nicht mehr angeregt und sind dadurch quasi unsichtbar.

Aufgrund der besonderen Anforderungen an die Charakterisierungsmethoden der nanoskaligen Schichten erscheinen vor allem kontaktfreie, optische Methoden geeignet. Im Folgenden werden zwei solcher Charakterisierungstechniken vorgestellt. Beide wurden in dieser Arbeit angewendet.

2.4.1 Ellipsometrie

Ellipsometrie ist ein Verfahren, mit dem sich die Schichtdicke sowie die optischen Eigenschaften dünner Schichten bestimmen lassen.[143] Die Ellipsometrie verwendet dabei polarisiertes Licht, das heißt Licht, in dem der senkrecht polarisierte Anteil (s-Anteil) und der parallel polarisierte Anteil (p-Anteil) definierte Amplituden haben und in einer festen Phasenbeziehung zueinander stehen.[144]

Trifft Licht auf die Oberfläche einer Probe, wird ein Teil des Lichts gebrochen und der andere Teil reflektiert. Nach den Fresnelgleichungen wechselwirken in polarisiertem Licht der p- und s-Anteil des Lichts unterschiedlich mit der Probe. Der Polarisationszustand ändert sich daher

nach der Reflexion (**Abbildung 2-5**). Linear polarisiertes Licht, das auf die Probe eingestrahlt wird, wird in der Regel als elliptisch polarisiertes Licht reflektiert.

Bei Multischichtsystemen wird der an der ersten Grenzfläche (Oberfläche) gebrochene Lichtstrahl an der nächsten Grenzfläche erneut gebrochen und reflektiert (**Abbildung 2-5**). Bei der Rückreflexion durch die Oberfläche wird der reflektierte Lichtstrahl wiederum gebrochen und verläuft dann mit einer definierten Phasendifferenz kolinear zum ersten an der Oberfläche reflektierten Strahl. Durch Überlagerung von reflektiertem und durchtretendem Strahl verändern sich die s- und p-Anteile des Messlichts. Durch jede zusätzliche Schicht kommt es durch erneute Reflektion und Brechung zu weiteren, für jedes Schichtsystem charakteristischen Veränderungen der senkrechten und parallelen Anteile. Unter Berücksichtigung mathematischer Schichtmodelle können durch Analyse des Polarisationszustandes vor und nach Wechselwirkung mit der Oberfläche die verschiedenen Schichtdicken d berechnet werden.

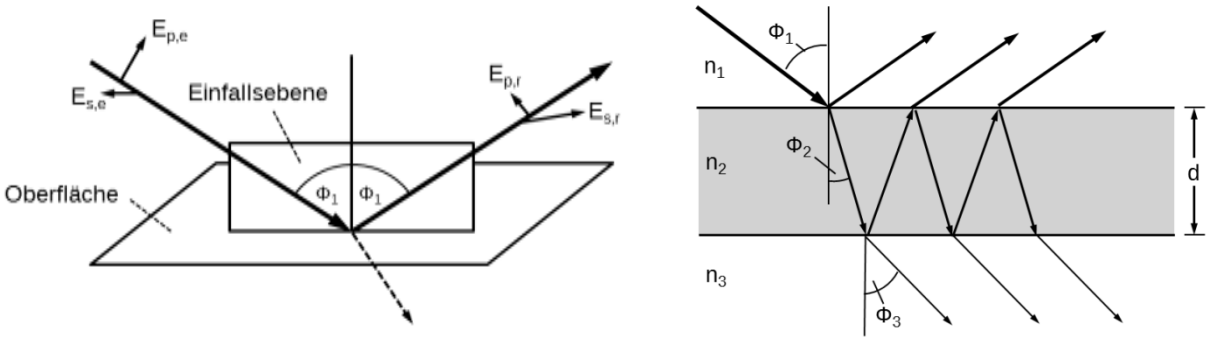


Abbildung 2-5: Links: Reflexion und Brechung eines polarisierten Lichtstrahls an einer Oberfläche. Bei der Reflexion ändert sich der Polarisationszustand. Rechts: Reflexion und Brechung eines Lichtstrahls an einem Multischichtsystem mit verschiedenen Brechungsindizes n.

In einem typischen Aufbau für ein Nullellipsometer (**Abbildung 2-6**) läuft das Licht durch einen Polarisator und einen Kompensator in einem bestimmten Winkel Φ auf die Probe. Nach der Reflexion von der Probe durchläuft das Licht zunächst einen Polarisationsfilter als Analysator und trifft schließlich auf den Detektor, bei dem die Intensität des eintreffenden Lichts bestimmt wird. Die Änderung des Polarisationszustandes bei der Reflexion von der Probe kann über das geschickte Einstellen des Polarisators und des Analysators bestimmt werden. Dafür werden diese in die Position gebracht, bei der kein- bzw. nur minimal Licht auf den Detektor trifft. Eine Weiterentwicklung dieses Prinzips arbeitet mit gleichmäßig rotierenden optischen Elementen. In diesem Fall wird die Intensität des ankommenden Lichts als Funktion der Zeit

aufgezeichnet, eine Fouriertransformation liefert dann den tatsächlichen Polarisationszustand des Lichts.

Die Änderung der Polarisation wird durch die relative Phasenänderung Δ sowie durch die relative Amplitudenänderung tan(Ψ) beschrieben. Diese beiden Größen werden direkt durch das Ellipsometer gemessen und sind über die Fundamentalgleichung der Ellipsometrie mit den Fresnelkoeffizienten der Reflexion r_p und r_s verbunden (**Formel 2-7**). Die beiden Größen Δ und Ψ sind komplexe Funktionen des Einfallswinkels Φ, der Wellenlänge λ, der optischen Konstanten des Substrates NS, des umgebenden Mediums n_0, der Schichten N_j und den Schichtdicken der Schichten d_j.

$$\tan\Psi\, e^{i\Delta} = \frac{r_p}{r_s} = f(\Phi, \lambda, \mathrm{NS}, n_0, N_j, d_j) \qquad \textit{Formel 2-7}$$

Ein großer Vorteil der Ellipsometrie ist, dass die Messung der beiden Größen Δ und Ψ gleichzeitig und sehr präzise erfolgt. Allerdings können streng genommen der Brechungsindex und die Schichtdicke einer Probe nur für ein Ein-Schicht-System genau berechnet werden.

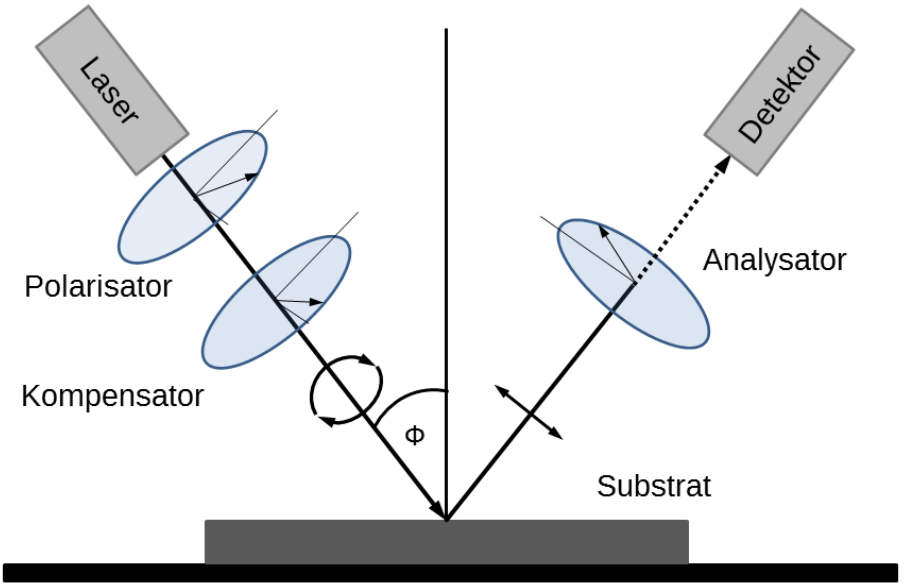


Abbildung 2-6: Schematischer Aufbau eines Nullellipsometers: Das Licht fällt unter einem festen Winkel ϕ auf das Substrat. Der Polarisationszustand wird durch Polarisator und Kompensator bestimmt. Die optischen Elemente werden so eingestellt, dass nach Durchlaufen des Analysators die Lichtintensität minimal wird.

Für die Berechnung in einem Multischichtsystem muss ein genaues Modell mit bekannten optischen Parametern für die weiteren Schichten vorliegen. Die Berechnung erfolgt dann über

eine Regressionsanalyse mit einem Computerprogramm. Die Lösung der komplexen Gleichung zeigt für die Schichtdicke eine für die Eingabeparameter charakteristische Periodizität (periodische Schichtdicke d_p). Wird eine bestimmte Schichtdicke d berechnet, ist also stets auch die Schichtdicke plus eine oder mehrere Perioden ($d + n_i * d_p$) eine richtige Lösung. Eine eindeutige Lösung erhält man beispielsweise mittels spektroskopischer Ellipsometrie über den Einsatz verschiedener Wellenlängen oder über den Vergleich der berechneten Schichtdicke mit den Ergebnissen anderer Messmethoden.

2.4.2 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl.: *surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR) ist eine optische Methode zur Untersuchung von dünnen Filmen auf bzw. von Ereignissen in unmittelbarer Umgebung zu Metalloberflächen.[145] Grundlage des Verfahrens ist eine Abschwächung der Totalreflexion (engl.: *attenuated total reflection*, ATR) an der Metalloberfläche. Verglichen mit anderen Charakterisierungsmethoden ist SPR als Methode noch jung: erst 1968 konnte das Phänomen der abgeschwächten Totalreflexion an Metalloberflächen physikalisch erklärt werden,[146] 1983 wurde erstmals ein SPR-Sensor zur Untersuchung biomolekularer Interaktionen vorgestellt[147] und 1990 kam durch Biacore ein SPR-basiertes Sensorsystem als erste kommerzielle Anwendung auf den Markt. Bis heute ist die Untersuchung von biomolekularen Interaktionen das Hauptanwendungsgebiet von SPR.

Trifft ein Lichtstrahl von einem optischen Medium n_1 auf ein anderes optisches Medium n_2, so wird ein Teil des Lichtstrahls reflektiert und der andere Teil gebrochen (vgl. Ellipsometrie). Nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz ändert sich bei einer Vergrößerung des Einfallswinkels der Anteil des reflektierten Lichts. Ist $n_1 > n_2$, wird ab einem bestimmten Winkel, dem Winkel der Totalreflexion θ_T, alles Licht reflektiert. Oberhalb θ_T fällt das elektrische Feld

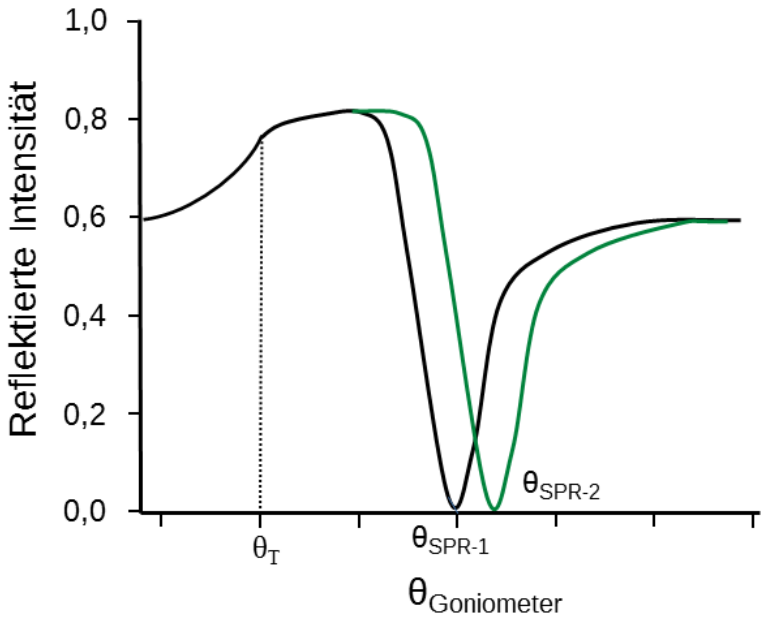


Abbildung 2-7: Reflektierte Intensität an einer Metalloberfläche in Abhängigkeit des Einstrahlwinkels. Oberhalb des Winkels der Totalreflexion θ_T erreicht die reflektierte Intensität ein Maximum. Beim Resonanzwinkel θ_{SPR-1} werden die Oberflächenplasmonen resonant angeregt. Binden Moleküle an die Metalloberfläche (grüne Kurve), verschiebt sich der Resonanzwinkel zu θ_{SPR-2}.

des einfallenden Lichtstrahls an der Grenzfläche allerdings nicht direkt auf null ab, sondern verläuft als evaneszentes Feld mit einer exponentiellen Dämpfung senkrecht zur Grenzfläche im optisch dünneren Medium n_2 weiter, ohne dabei Energie abzugeben. Ragt eine Schicht, die Energie absorbiert, in das evaneszente Feld hinein, ändert sich auch die Intensität des reflektierten Lichts. Findet die Totalreflexion an einem dünnen Metallfilm statt, wechselwirkt das evaneszente Feld mit dem Elektronengas des Metalls. Bei einem bestimmten kritischen Winkel (Resonanzwinkel θ_{SPR}) kommt es zu einer resonanten Kopplung der Photonen mit den Elektronen, wodurch eine Plasmaschwingung (Plasmon) erzeugt wird. Dabei sinkt die

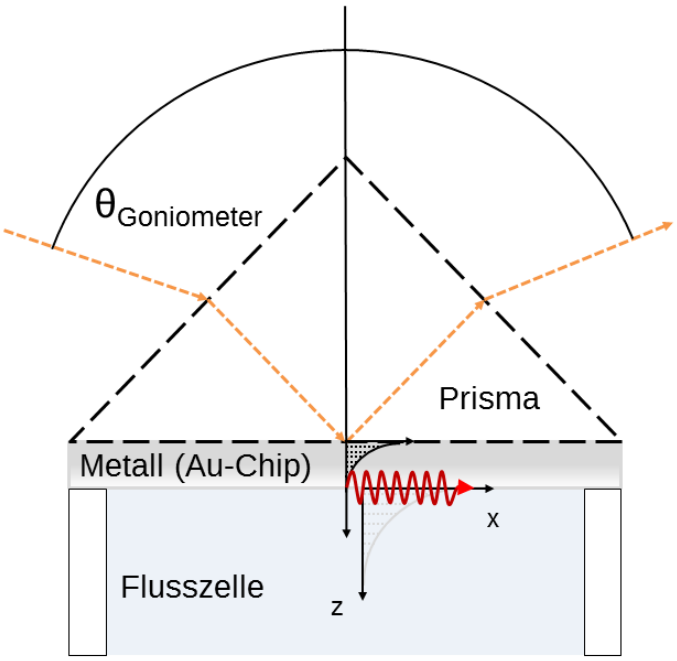


Abbildung 2-8: Aufbau eines SPR-Gerätes nach der Kretschmann-Konfiguration. Das Licht wird über ein Prisma auf die Metalloberfläche geleitet, wo es die Oberflächenplasmonen anregt. Die reflektierte Lichtintensität wird bei verschiedenen Winkeln θ über einen mit einem Goniometer verknüpften Detektor gemessen.

reflektierte Intensität auf ein Minimum. Die resonante Plasmonenschwingung erzeugt wiederum ein eigenes elektrisches Feld, das exponentiell zu beiden Seiten der Grenzfläche abfällt. Werden innerhalb dieses Feldes Moleküle an die Oberfläche adsorbiert oder ändert sich der Umgebungsbrechungsindex durch andere Phänomene, ändert sich auch die Resonanzbedingung für die Plasmonen. Der Resonanzwinkel θ_{SPR} verschiebt sich (**Abbildung 2-7**). Durch die Bestimmung des Resonanzwinkels kann auf die Veränderung in der Umgebung der Metalloberfläche

geschlossen werden. Die Größe der Änderung des Resonanzwinkels ist dabei proportional zur Änderung des Brechungsindexes Δn_S und zur Dicke der adsorbierten Schicht d_S:

$$\Delta\Theta_{SPR} \propto \Delta n_S \times d_S \qquad \textbf{\textit{Formel 2-8}}$$

Wenn auf eine bestimmte Substanz kalibriert wird, kann über die Änderung des Resonanzwinkels auch auf die Menge der adsorbierten Substanz gefolgert werden. Typisch ist beispielsweise eine Kalibration auf Proteine.

Für die technische Umsetzung des Konzepts der SPR existieren zwei mögliche Anordnungen: Die Otto-Konfiguration und die Kretschmann-Konfiguration. Die Messungen in dieser Arbeit basierten auf der Kretschmann-Konfiguration (**Abbildung 2-8**). Der entsprechende Aufbau wurde auch in dieser Arbeit verwendet. Das Licht wird dabei über ein Glasprisma auf das Metall geleitet. Die Oberflächenplasmonen im Metall werden angeregt und auf der Rückseite kann adsorbiertes Material in einer Flusszelle mit dem elektrischen Feld der Oberflächenplasmonen wechselwirken. Die Resonanzwinkel mit und ohne Analyten werden über ein Goniometer bestimmt. Die Änderung des Resonanzwinkels kann sowohl im Scanmodus als auch im Kinetikmodus über die Aufnahme eines sogenannten Sensorgramms verfolgt werden. Beim Kinetikmodus wird die reflektierte Intensität bei einem festen Winkel aufgenommen. Das ist möglich, da das Verschieben des Resonanzwinkels auch die Intensität bei diesem festen Winkel verändert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie wesentlich schneller ist, als ein kompletter Winkelscan. Mit dieser Einstellung können daher auch Adsorptionskinetiken bestimmt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Immobilisierung dünner Hydrogelschichten

Die Immobilisierung von Polymeren auf Oberflächen wird überwiegend für die Modifikation oder die Veredelung von Materialien genutzt. Im Gegensatz dazu fungiert die Oberfläche im avisierten System ausschließlich als Träger für die Hydrogelmatrix. OEG-basierte Copolymere sind interessante Kandidaten für die Hydrogelmatrix. Neben exzellenten Antifouling-Eigenschaften weisen sie, je nach Länge der OEG-Seitenketten, auch ein thermoresponsives Verhalten auf.[39] Bislang existieren Untersuchungen zum (thermischen) Verhalten oberflächenfixierter Systeme aus diesem Material lediglich für Bürstenarchitekturen.[115, 148] Trotz der verhältnismäßig einfachen Herstellungsmöglichkeiten wurden dünne quervernetzte Filme aus diesem Material noch nicht untersucht. Da die Eigenschaften eines gelösten Polymersystems nicht direkt auf fixierte Systeme übertragen werden können, ist zunächst eine Charakterisierung solcher oberflächenfixierter Systeme notwendig. Bei der Immobilisierung dünner Filme aus OEG-Copolymeren sollte daher sichergestellt werden, dass grundlegende Eigenschaften des Systems, wie die Thermoresponsivität, analysiert werden können. Die Eigenschaften sollten durch den Immobilisierungsschritt selbst möglichst wenig modifiziert werden. Daher sollten eventuell für die Bindung von Biomolekülen nötige Funktionalitäten erst in einem nächsten Schritt in das Schichtsystem miteingebaut werden.

3.1.1 Immobilisierung über photovernetzbare Schichten

Eine Möglichkeit zur Immobilisierung dünner Polymerschichten ist die Photovernetzung über photoreaktive Gruppen. Mittels Licht der passenden Wellenlänge können photoreaktive Gruppen kontrolliert und je nach Energie der Strahlung sehr schonend angeregt werden. Ein weiterer Vorteil der Photovernetzung ist, dass photosensitive Gruppen verwendet werden können die die Eigenschaften des Basissystems nur wenig verändern. Im Gegensatz dazu werden beispielsweise bei der Vernetzung über reaktive funktionelle Gruppen (z. B. Amine oder Carboxylgruppen) häufig Ladungen in das Polymernetzwerk eingebaut. Da Ladungen einen

starken Einfluss auf die thermoresponsiven Eigenschaften eines Polymers haben, würde ihre Anwesenheit das System stark beeinflussen. Für die Charakterisierung bedeutet das, dass dieser Effekt den Effekt anderer Parameter wie Monomersystem oder Vernetzerdichte überlagern würde. Um das Basissystem grundsätzlich hinsichtlich der Quell- und der thermoresponsiven Eigenschaften zu charakterisieren wurde daher die Photovernetzung als Vernetzungsmethode gewählt.

Benzophenone sind bereits seit langem als Photoinitiatoren etabliert.[131] Auch als photoreaktive Gruppen in photovernetzbaren Polymeren wurden sie bereits untersucht. [79, 80, 82-85] Wie in Kapitel 2.3 gezeigt, bilden Benzophenone bei der Bestrahlung mit UV-Licht Radikale, die mit nahezu jedem organischen Material reagieren können. Mit Benzophenonen funktionalisierte Polymere können also auf organischen Substraten zur gleichen Zeit immmobilisiert und mit benachbarten (organischen) Polymerketten quervernetzt werden. Wenn der Vernetzungsvorgang effektiv abläuft, lässt sich die Vernetzungsdichte einfach über den Gehalt der Benzophenongruppen im Polymer oder über die Bestrahlungsdauer einstellen.[102] Die Effizienz der Quervernetzung hängt allerdings stark davon ab, wie effizient die homolytische Spaltung der Wasserstoff-Kohlenstoff-Bindung, also die Radikalgenerierung, an der benachbarten Polymerkette abläuft. Da, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, aliphatische Polyether leicht Wasserstoffradikale abspalten, sollten OEGMA Copolymere für die Vernetzung über Benzophenongruppen gut geeignet sein.[149-152] Die Immobilisierung OEG-basierter Copolymere sollte daher mittels inkorporierten Benzophenongruppen erfolgen.

3.1.1.1 Synthese der photovernetzbaren Polymere

Der Einbau der Benzophenongruppen in OEG-basierte Copolymere erfolgte über das polymerisierbare Derivat 2-(4-Benzoylphenoxy)ethylmethacrylat (BPEM) (**Abbildung 3-1**). BPEM und das analoge Acrylat wurden bereits seit 1992 als niedermolekularer Photoinitiator verwendet und auch in Polymere eingebaut.[153, 154] Allerdings beschränkten sich die Untersuchungen hauptsächlich auf die photochemischen und -physikalischen Eigenschaften.[154, 155] Über den Einsatz von BPEM als Photovernetzer liegen noch keine Untersuchungen vor. Hier könnte BPEM einige Vorteile bieten: Da die BPEM Einheit einen Methacrylrest trägt, ist es besonders für die Copolymerisation mit anderen Methacrylaten wie den OEG-Comonomeren geeignet. Der kurze Ethylspacer zwischen Phenylring und der Estergruppe des BPEM gleicht die polymerisierbare Methacrylgruppe in BPEM und den OEG-Monomeren zusätzlich elektronisch

und sterisch an. Gegenüber anderen oft verwendeten Benzophenonmonomeren[102, 134] sind damit verbesserte Voraussetzungen für eine ideal azeotrope Copolymerisation mit den OEG-Monomeren gegeben. Demnach ist zu erwarten, dass die Benzophenoneinheiten zufallsstatistisch in den Copolymerketten verteilt werden. Insbesondere beim Einsatz als Photovernetzer ist eine möglichst gleichmäßige Verteilung der BPEM-Einheiten im Copolymer wünschenswert, um nach der Vernetzung eine entsprechend gleichmäßige Maschenweite im Hydrogel zu erreichen. Ein weiterer Vorteil des BPEM liegt in der Stabilität der Esterbindung: Der über den Ethylspacer eingeführte aliphatische Ester sollte den üblicherweise verwendeten Phenolestern hinsichtlich seiner Hydrolysestabilität überlegen sein. Damit wird das Risiko minimiert, dass nach der UV-Vernetzung bei längerem Verbleib in wässrigen Medien Vernetzungspunkte gelöst werden.

Die Synthese von BPEM erfolgte, ähnlich wie von Zvara *et al.* vorgeschlagen, über zwei Stufen.[155] Zunächst wurde über eine Williamson-Ether-Synthese Ethylenglykol an 4-Hydroxy-benzophenon gebunden und dann in einem zweiten Schritt der gebildete primäre Alkohol mit Methacrylsäurechlorid umgesetzt. Das UV-Spektrum des aufgereinigten BPEM zeigt die typischen Banden für donor-substituierte Benzophenone. In Hexan findet sich ein intensiver $\pi \rightarrow \pi^*$ - Übergang bei 277 nm und ein schwacher $n \rightarrow \pi^*$- Übergang bei 342 nm (**Abbildung 3-2**). Im polar protischen Lösungsmittel Ethanol ist dagegen der $n \rightarrow \pi^*$- Übergang nicht zu sehen, vermutlich wegen starker H-Brücken zwischen dem Lösungsmittel und BPEM.[156]

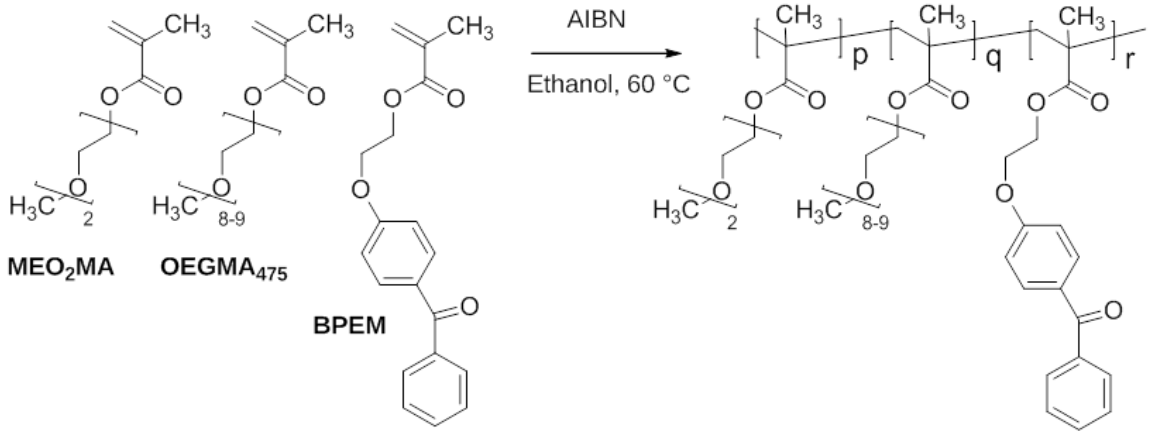


Abbildung 3-1: Syntheseschema für die frei radikalische Copolymerisation des photovernetzbaren Copolymers.

Um BPEM in wasserlösliche Copolymere einzubauen, wurde das synthetisierte Monomer frei radikalisch in einer binären Mischung mit $OEGMA_{475}$ (Copolymere B-x in **Tabelle 3-1**, in **Abbildung 3-1** p = 0) und in einer ternären Mischung mit $OEGMA_{475}$ und MEO_2MA

copolymerisiert (Copolymere T-x in **Tabelle 3-1**). Da die Proben bereits unter dem Einfluss von wenig Tageslicht vernetzten und anschließend nicht mehr aufzulösen waren, wurden die Synthese und die Aufreinigung der Copolymere unter Ausschluss von Licht bzw. in einem abgedunkelten Labor unter Gelblicht durchgeführt. Für die Synthese von Copolymeren mit höheren Molmassen (B-2b und B-3b) wurden die Bedingungen der Copolymerisation leicht modifiziert. Gemäß der Geschwindigkeitsgesetze der frei radikalischen Copolymerisation ist

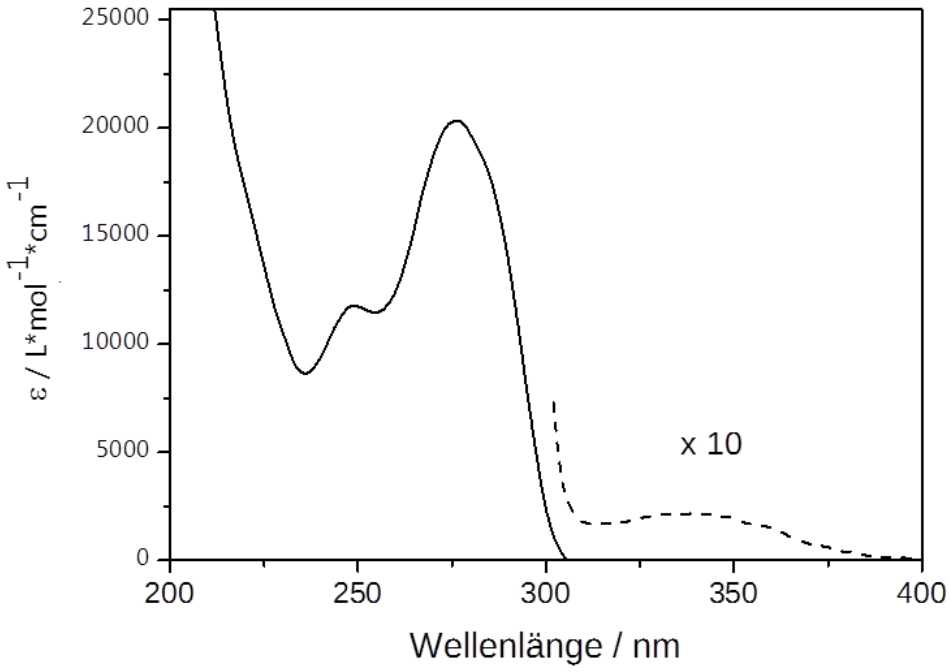


Abbildung 3-2: UV/vis – Spektrum des Monomers BPEM in n-Hexan (--- 10-fache Vergrößerung).

die kinetische Kettenlänge ν proportional von der Monomerkonzentration [M] und umgekehrt proportional zu der Wurzel der Initiatorkonzentration [I_2] (**Formel 3-1**).[157] Daher wurde die Monomerkonzentration erhöht und die Initiatorkonzentration verringert (Experimenteller Teil). Die Molmassenanalyse mittels Gelpermeationschromatographie ergab für die so synthetisierten Copolymere B-2b und B-3b deutlich höhere Molmassen als für die in der Zusammensetzung vergleichbaren Copolymere B-2a und B-3a (**Tabelle 3-1**).

Die Zusammensetzung der Copolymere wurde mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie ermittelt. Die Menge der eingebauten Benzophenoneinheiten wurde über den Vergleich der Integrale der Signale der Benzophenonprotonen im Aromatenbereich mit denen der Estergruppen bei einer chemischen Verschiebung von 4,2 ppm sichergestellt werden. Der Anteil der Benzophenonderivate entsprach im Rahmen der Messgenauigkeit der Methode der Reaktionsmischung (**Tabelle 3-1**). Wie zu erwarten, sind die binären Copolymere mit

$OEGMA_{475}$ über den gesamten betrachteten Temperaturbereich von 10 °C bis 90 °C wasserlöslich. Die ternären Copolymere zeigen dagegen in wässriger Lösung ein LCST-Verhalten. Verglichen mit binären Copolymeren aus MEO_2MA und $OEGMA_{475}$ sind die Trübungspunkte der Copolymere mit Benzophenongruppen zu deutlich tieferen Temperaturen verschoben.[39] Der Trübungspunkt des ternären Copolymers T-5 mit einem Anteil von

$$\nu = \frac{r_p}{r_t} = \frac{k_p[P\cdot][M]}{k_t[P\cdot]^2} = \frac{k_p[M]}{\sqrt{f k_t k_d [I_2]}} \qquad \textit{Formel 3-1}$$

r_p Wachstumsgeschwindigkeit; r_t Abbruchgeschwindigkeit; k_p, k_t, k_d Geschwindigkeitskoeffizienten für Kettenwachstum, Kettenabbruch und Initiatordissoziation; [P·] Radikalkonzentration; [M] Monomerkonzentration; f Radikalausbeute; [I_2] Initiatorkonzentration.

Tabelle 3-1: Charakterisierung der synthetisierten Copolymere

Polymer	OEGMA/ MEO_2MA	BPEM in der Reaktions-mischung (mol-%)	BPEM eingebaut im Copolymer[a] (mol-%)	M_n [b] (kg/mol)	DP_n [c]	BPEM Einheiten pro Polymer-kette [d]	Trübungs punkt [e] „onset“ (°C)	Trübungs-punkt bei 50 % Trans-mission (°C)	Erwarteter Trübungs-punkt für OEGMA/ MEO_2MA Copolymere [f] (°C)
POEGMA	100:0	0	0	79	166	0	-	-	<100
B-1	100:0	0,1	0,1	138	291	0,3	-	-	<100
B-2a	100:0	0,25	0,26	91	192	0,5	-	-	<100
B-2b	100:0	0,25	0,25	292	615	1,5	-	-	<100
B-3a	100:0	0,5	0,5	80	169	0,9	-	-	<100
B-3b	100:0	0,5	0,8	350	738	3,7	-	-	<100
B-4	100:0	1,0	1,3	49	104	1,0	-	-	<100
T-1	0:100	0,5	0,7	125	664	3,3	24,8	25,7	28,0
T-2	10:90	0,5	0,6	84	385	1,9	35,5	36,1	38,4
T-3	21:79	0,5	0,7	130	529	2,6	49,2	50,8	49,8
T-4	33:67	0,5	0,7	147	536	2,7	56,6	57,9	62,3
T-5	3:97	1,0	1,0	68	344	3,4	22,3	23,1	31,0
PNIPAM-x	NIPAM	0,5	0,5	23	201	1,0	32,0	33,2	-

[a] Berechnet aus ^{1}H-NMR Spektroskopie. [b] Apparentes Zahlenmittel der Momasse M_n bestimmt über GPC in DMF kalibriert mit Polystyrolstandards. [c] Berechnet aus GPC und Monomerfeed. [d] Durchschnitt berechnet aus NMR und GPC. [e] Temperatur bei Einsetzen der Trübung („onset“). [f] Trübungspunkt bei 50 %Transmission für äquivalente MEO_2MA/ $OEGMA_{475}$ Copolymere mit gleichem Molverhältnis MEO_2MA/ $OEGMA_{475}$ und ohne BPEM (aus Ref [39]).

1 % BPEM ist beispielsweise bereits um 8 °C niedriger, der des Copolymers T-2 mit einem Anteil von 0,5 % BPEM immerhin noch um 2 °C niedriger als in einem analogen binären Copolymer ohne BPEM aber mit dem gleichen molaren Verhältnis von MEO_2MA zu $OEGMA_{475}$. Die Verschiebung der Trübungstemperatur ist auf den hydrophoben Charakter der

Benzophenongruppe zurückzuführen. Der Effekt kann allerdings leicht durch einen höheren Anteil des hydrophileren $OEGMA_{475}$ im Copolymer kompensiert werden.

3.1.1.2 Herstellung und Charakterisierung der Schichten

Für die Immobilisierung der mit Benzophenon funktionalisierten Copolymere sind organische Oberflächen nötig. Daher wurden Siliziumwafer mit einer definierten Oxidschicht mit 3-Aminopropyldimethylethoxysilan silanisiert. Bei der Silanisierung entsteht eine sogenannte selbstorganisierte Monoschicht des organischen Silans auf der Siliziumoxidoberfläche. Über die so modifizierte Oberfläche kann anschließend die Anbindung der Polymerketten erfolgen. Die so auf der Siliziumoberfläche eingeführten Amingruppen wurden ausschließlich für ein verbessertes Benetzungsverhalten während der Rotationsbeschichtung genutzt, eine selektive Umsetzung der Amingruppen mit entsprechenden funktionellen Gruppen erfolgt nicht. Wurden Polymere beispielsweise durch Rotationsbeschichtung auf einen mit Dodecyltriethoxysilan funktionalisierten Wafer, also mit hydrophober Oberfläche, aufgetragen, rissen die Filme je nach verwendetem Lösungsmittel oder bildeten separierte kleine Inseln. Darüber hinaus wird durch das Heteroatom in der Silanschicht, ähnlich wie im Copolymer, die Abstraktion eines Wasserstoffatoms am benachbarten Kohlenstoffatom durch eine photochemisch aktivierte Benzophenoneinheit wahrscheinlicher. Dies ist gleichbedeutend mit einer Erhöhung der Wahrscheinlichkeit für eine Anbindung des Polymers an die Oberfläche.

Die Auftragung der Copolymere auf die Siliziumwafer erfolgte mittels Rotations-beschichtung. Die Homogenität und die Dicke der Schicht hängen bei dieser Methode von der Wahl des Lösungsmittels, der Polymerkonzentration, der Rotationsgeschwindigkeit sowie der Molmasse und der Art des Polymers ab. Die Auswahl geeigneter Parameter ermöglicht es, homogene Filme herzustellen, deren Schichtdicke über einen weiten Bereich variierbar ist. In **Abbildung 3-3** sind exemplarisch die durch Rotationsbeschichtung aus Ethylacetat erhaltenen Schichtdicken für Polymer B-3a in Abhängigkeit der Polymerkonzentration und der Rotationsgeschwindigkeit dargestellt. Für beide Parameter zeigt sich ein linearer Zusammenhang gegenüber der gemessenen Schichtdicke. Für die anderen OEG-basierten Copolymere gleicher Molmasse sind die erhaltenen Schichtdicken bei gleichen Bedingungen innerhalb der Fehlergrenze identisch, für die Copolymere mit höheren Molmassen sind die Schichtdicken bei ansonsten gleichen Bedingungen jeweils größer. Um vergleichbare Schichtdicken im Bereich um

100 nm herzustellen, wurden daher für die Copolymere mit niedrigeren Molmassen Polymerlösungen mit einer Konzentration von 2 g/ L, für die höheren Molmassen Polymerlösungen mit 1 g/ L Polymer bei 50 rps aufgeschleudert. Als Lösungsmittel wurde jeweils Ethylactetat verwendet. Mit anderen Lösungsmitteln wie Toluol, THF, Chloroform, Ethanol oder Wasser konnten homogene Schichten nur bis zu einer Schichtdicke von 100 nm, oder überhaupt nicht hergestellt werden.

Die Dicken der aufgeschleuderten Polymerschichten wurden mittels Einwellenlängen-ellipsometrie bestimmt. Als Modell zur Berechnung der Schichtdicken aus den ellipsometrischen Winkeln Δ und Ψ diente ein Vierschichtsystem, bestehend aus dem umgebenden Medium Luft (n = 1,000, k = 0), der Polymerschicht (n = 1,4800, k = 0), Siliziumdioxid (d = 1,0 nm, n = 1,4580, k = 0) und Silizium (n = 3,8858, k = -0,0200). Die optischen Parameter für Luft, Siliziumdioxid und Silizium sind aus der Literatur bekannt,[124] der Brechungsindex der Polymerschicht wurde für das Homopolymer POEGMA mit Hilfe eines Refraktometers bestimmt (n_D^{20} = 1,480) und für alle Copolymere unter der Annahme gleicher Werte übernommen.

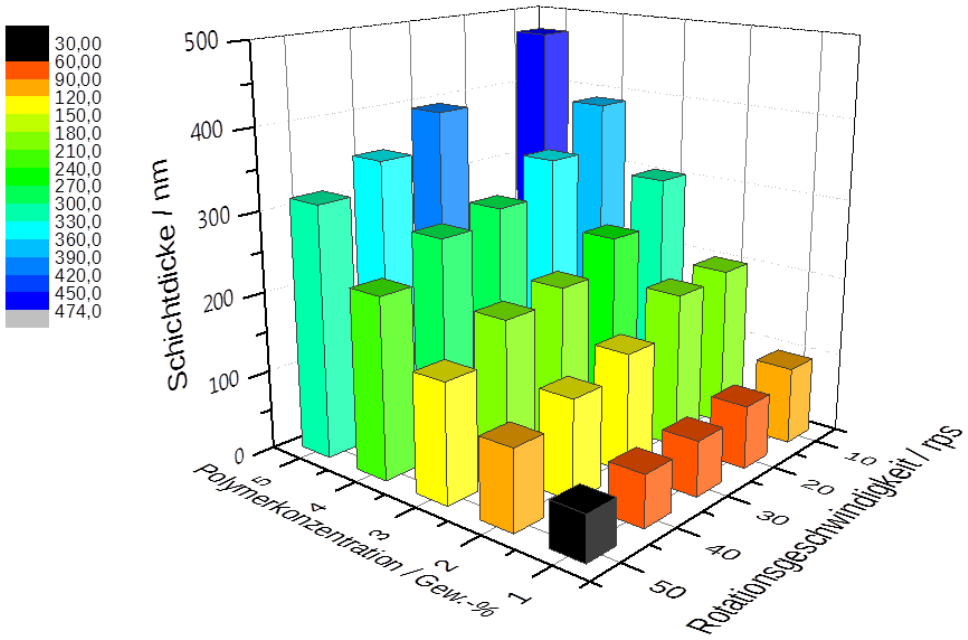


Abbildung 3-3: Polymerschichtdicken auf Siliziumwafern hergestellt durch Rotationsbeschichtung verschiedener Lösungen von Copolymer B-3a in Ethylacetat. Variation der Rotationsgeschwindigkeit und der Polymerkonzentration. Die Schichtdickenmessung erfolgte mittels Ellipsometrie.

Bei dickeren Schichten diente der Brechungsindex der Polymerschicht lediglich als Ausgangsbasis für die Berechnung der Schichtdicke und des Brechungsindexes der Schicht. Der

über die ellipsometrischen Winkel Δ und Ψ berechnete Brechungsindex lag jeweils nahe dem über Refraktometrie bestimmten Wert von 1,480. Bei dünnen Schichten kann bei der Einwellenlängenellipsometrie methodenbedingt der Brechungsindex und die Schichtdicke nicht mehr gleichzeitig aus den ellipsometrischen Winkeln Δ und Ψ aufgelöst werden. Bei Schichtdicken unter 80 nm diente daher zusätzlich zu den anderen Modellparametern auch der Brechungsindex der Polymerschicht als Berechnungsgrundlage.

Die aufgeschleuderten Polymerschichten wiesen je nach Schichtdicke unterschiedliche Interferenzfarben auf. Da der Brechungsindex für die Polymerschicht ($n_D^{20} = 1{,}48$) dem für Siliziumdioxid ($n_D^{20} = 1{,}458$) sehr ähnlich ist, sollten die Interferenzfarben für vergleichbar dicke Schichten der beiden Materialien übereinstimmen. Mit Hilfe einer Farbtabelle für Siliziumdioxidschichten ist daher eine Abschätzung der Dicke der aufgeschleuderten Polymerschichten möglich.[158, 159] Tatsächlich stimmen die ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken gut mit den korrespondierenden Schichtdicken für die Interferenzfarben aus der Farbtabelle überein.

Kinetik der UV-Vernetzungsreaktion

Die Kinetik der Photoreaktion der Benzophenongruppen wurde via UV-Spektroskopie an einer auf ein Quarzglasfenster aufgeschleuderten Polymerschicht verfolgt. Die Polymerschichtdicke wurde für diese Versuche maximiert, um eine gut detektierbare Absorption durch die Benzophenongruppen zu gewährleisten (Schichtdickenmessungen über ein Profilometer ergaben 800 nm Schichtdicke). Das beschichtete Quarzglasfenster wurde dann für mehrere

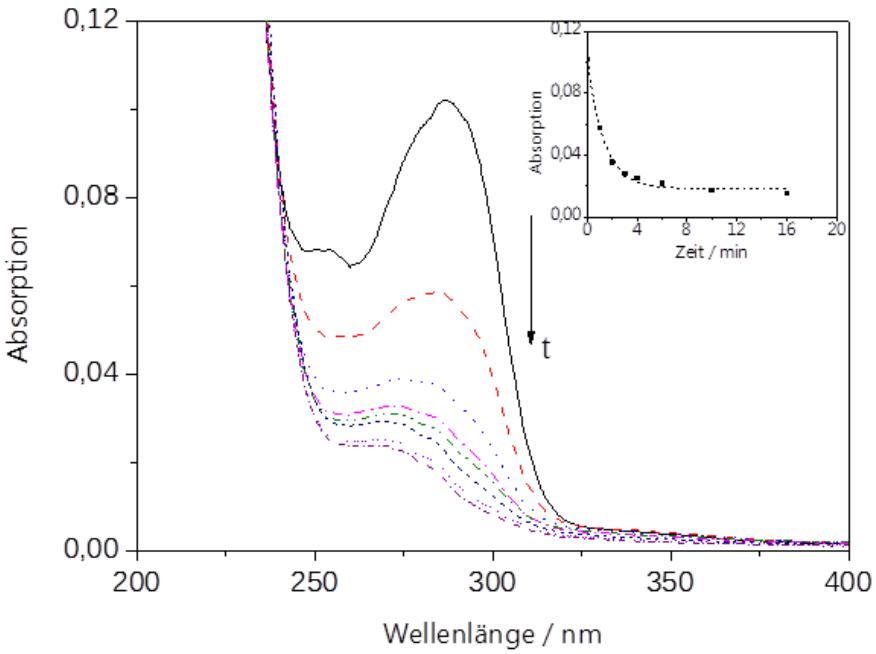


Abbildung 3-4: Absorption einer 800 nm dicken BPEM-Copolymerschicht nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer mit UV-Licht (durchgezogene, schwarze Linie 0 min, --- 1 min,···2 min, -·- 3 min, ·-· 4 min, --- 6 min, ···10 min, -·- 16 min). Inset: Abnahme des Absorptionsmaximums bei 287 nm mit fortwährender UV-Bestrahlung.

definierte Zeitintervalle mit UV-Licht bestrahlt und anschließend jeweils die Extinktion am Absorptionsmaximum bei 287 nm gemessen (**Abbildung 3-4**). Mit Fortschreiten der Photoreaktion nimmt die Intensität der Absorptionsbande exponentiell ab. Bereits nach ca. 1 min beträgt die Bandenintensität nur noch 50 %, nach 10 min ist die Photoreaktion nahezu vollständig abgeschlossen und die verbleibende Absorption nähert sich einem Plateauwert (eingefügtes Diagramm rechts oben **Abbildung 3-4**). Als Konsequenz wurden daher in den folgenden Vernetzungsreaktionen alle Schichten 15 min lang mit UV-Licht bestrahlt, um einen vollständigen Umsatz der Benzophenongruppen zu gewährleisten.

3.1.1.3 Stabilität

Für Hydrogelschichten, die Proteine im Schichtinneren binden sollen, muss die Maschenweite des Netzwerkes möglichst hoch eingestellt werden. Nach der Flory-Rehner-Theorie ist die Maschenweite in einem Hydrogel umso größer, je größer der Quellgrad ist (vgl. Kapitel 2.1.2). Sie kann damit indirekt über den Quellgrad bestimmt werden. In photovernetzbaren Systemen wird die Maschenweite größer, je kleiner der Vernetzeranteil ist. Der Vernetzeranteil kann allerdings nicht beliebig reduziert werden, da dadurch die

Schichtstabilität herabgesetzt wird. Um Hydrogelschichten mit möglichst maximierter Maschenweite herzustellen sollte daher die Stabilität von Copolymerschichten mit möglichst kleinem Vernetzeranteil untersucht werden.

Um die Stabilität der Copolymerfilme zu testen, wurden die beschichteten Wafer nach 15-minütiger Bestrahlung mit UV-A-Licht mit Reinstwasser gespült und zusätzlich über Nacht in Reinstwasser belassen, um letzte Reste ungebundenen Polymers auszuwaschen. Danach blieben die Polymerschichtdicken auch nach weiterem mehrmaligem Spülen konstant. Auch weiteres Waschen in verschiedenen Lösungsmitteln wie leicht basischem PBS-Puffer (pH 7,4) oder organischen Lösungsmitteln wie Chloroform Ethanol oder Ethylacetat hatte nach 1 Woche keinerlei Auswirkung auf die Schichtdicke. Die Menge des ausgewaschenen Copolymers ist stark vom Anteil des im Copolymer gebundenen BPEM abhängig. In **Abbildung 3-5** ist die Schichtdicke nach der Waschprozedur für die binären Copolymere B-1, B-2a, B-3a und B-4 mit unterschiedlichen Vernetzeranteilen dargestellt. Während beim Copolymer B-4 mit einem Vernetzeranteil von 1 % nach der Waschprozedur noch 83 % des aufgeschleuderten Materials auf der Oberfläche verblieben, waren es für das Copolymer B-1 mit 0,1 % Vernetzeranteil gerade noch 37 %. Mit abnehmendem Vernetzeranteil wird also ein immer größerer Teil der Copolymere bei der UV-Bestrahlung nicht quervernetzt. Eine Erklärung dafür liefert ein Blick auf den Vernetzungsprozess (vgl. Kapitel 2.3). Bei der Bestrahlung mit UV-Licht generiert jede Benzophenongruppe maximal ein reaktives Radikal am Benzophenon selber und eines an einem benachbarten organischen Rest. Beide Radikale rekombinieren anschließend unter Bildung einer C-C-Bindung.[134] Folglich kann jede Benzophenongruppe maximal eine Bindung zu einer benachbarten Kette ausbilden. In einem stabilen Netzwerk muss jede Polymerkette mit mindestens zwei weiteren verknüpft sein. Für die Anbindung einzelner loser Polymerketten an das Netzwerk, ist dagegen eine einzige Verbindung hinreichend. Als Bedingung für ein komplett verbundenes System gilt somit, dass jede Polymerkette mindestens ein Benzophenon enthalten muss. In den binären Copolymeren B-1, B-2a und B-3a ist die Anzahl der BPEM-Gruppen pro Polymerkette jeweils unterhalb dieses kritischen Wertes (**Tabelle 3-1**). Copolymer B-4 trägt dagegen im Mittel genau eine BPEM-Gruppe pro Kette. Aufgrund der statistischen Verteilung der Comonomere in den Polymerketten gibt es jedoch in Copolymer B-4 neben Polymerketten mit mehreren BPEM-Gruppen auch solche ohne Vernetzer. Da bei der Vernetzungsreaktion

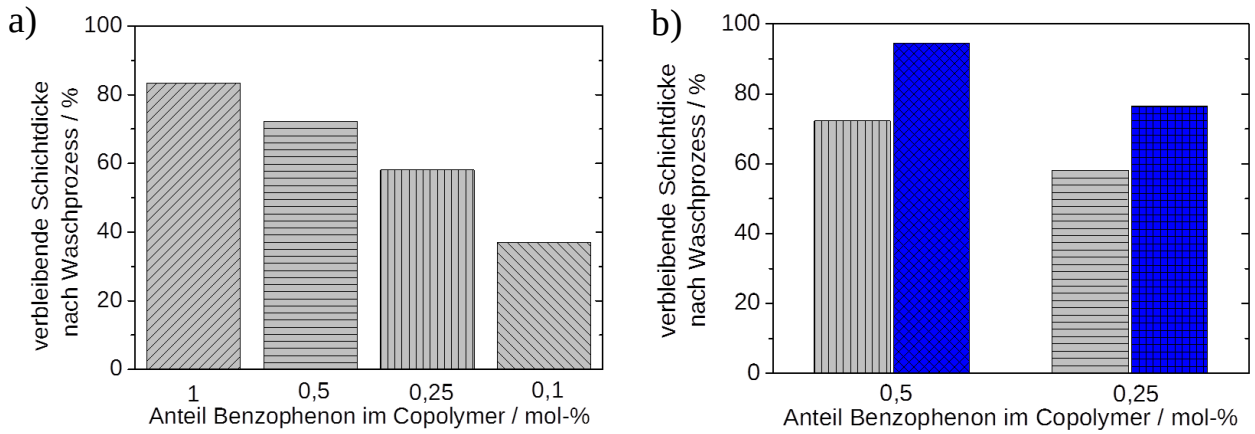


Abbildung 3-5: Stabilität der UV-vernetzten Schichten gegenüber dem Wasch- und Extraktionsprozess: Verbleibende Schichtdicke auf den Siliziumwafern nach dem Waschprozess. **a)** verbleibende Schichtdicke bei unterschiedlichem Vernetzeranteil im Copolymer. **b)** Vergleich der verbleibenden Schichtdicke von Copolymeren mit unterschiedlicher Molmasse und Vernetzeranteil. Grau, liniert: Copolymere mit niedrigerer Molmasse (M_n = 50 – 140 kg/ mol, Copolymere B-1, B-2a, B-3a, B-4), blau, kariert: Copolymere mit höherer Molmasse (M_n = 290 – 350 kg/ mol, Copolymere B-2b und B-3b).

ausserdem Schlaufenbildung nicht auszuschließen ist, wird auch bei Copolymer B-4 ein Teil der aufgeschleuderten Polymerschicht nach der UV-Bestrahlung ausgewaschen.

Die binären Copolymere mit größeren Molmassen B-2b und B-3b tragen bei gleichem molaren Anteil BPEM im Copolymer mehr BPEM-Gruppen pro Polymerkette als die Copolymere mit niedrigeren Molmassen (B-2a und B-3a). Die Vernetzung und Immobilisierung verläuft daher bei den höhermolekularen binären Copolymeren effektiver. Das ist bereits bei der praktischen Handhabung der verschiedenen Materialien deutlich zu bemerken: Während die Copolymere mit niedriger Molmasse einen kurzen Kontakt mit Umgebungslicht tolerieren, vernetzen die höhermolekularen Copolymere bereits nach kurzer Zeit. Die Stabilität der photovernetzten Schichten steht im Einklang mit dieser Beobachtung (**Abbildung 3-5**). Die Schichtdicke von Copolymer B-2a mit einer Molmasse von ca. 90 kg/ mol und nur 0,5 BPEM-Gruppen pro Polymerkette verringert sich nach dem Waschprozess um fast 50 %. Das Copolymer B-2b mit gleichem Vernetzeranteil, aber einer Molmasse von ca. 300 kg/ mol, trägt im Mittel 1,5 BPEM-Gruppen pro Polymerkette. Entsprechend bleiben nach dem Waschprozess 76 % der Polymerschichtdicke erhalten. Für Schichten aus Copolymer B-3b mit einem höheren Vernetzeranteil und einer leicht höheren Molmasse von ca. 350 kg/ mol verbleiben nach dem Waschprozess sogar 95 % der ursprünglich aufgebrachten Polymerschicht auf dem Siliziumwafer. Für den Einsatz niedriger Vernetzergehalte in photovernetzbaren Systemen müssen Copolymere mit möglichst hohen Molmassen gewählt werden, um eine ausreichende Stabilität der Schichten vor dem Waschprozess zu gewährleisten.

3.1.1.4 Quellbarkeit

Die Werte für die Schichtdicke und den Brechungsindex von gequollenen Hydrogelschichten wurden mittels Ellipsometrie in einer Flusszelle bestimmt. Der Brechungsindex für die gequollenen Schichten lag in einem Bereich zwischen 1,345 und 1,355 und damit nahe dem Brechungsindex von Wasser (1,332). Daraus lässt sich ablesen, dass Wasser in der gequollenen Schicht der Hauptbestandteil ist. Theoretisch ist es möglich den Quellgrad sowohl über die Schichtdicke nach **Formel 2-4**, als auch über den Brechungsindex nach **Formel 2-3** zu bestimmen. Die Bestimmung über den Brechungsindex verläuft mit Hilfe der sogenannten effektiven Mediumapproximation unter Einbeziehung der beiden bekannten Brechungsindizes für Wasser und Polymer.[160, 161] Allerdings führen bei hoch gequollenen Systemen bereits geringe Abweichungen in Brechungsindex zu großen Variationen im berechneten Quellgrad. Der Quellgrad wurde daher für die hoch gequollenen Systeme ausschließlich über die Schichtdicke nach **Formel 2-4** berechnet.

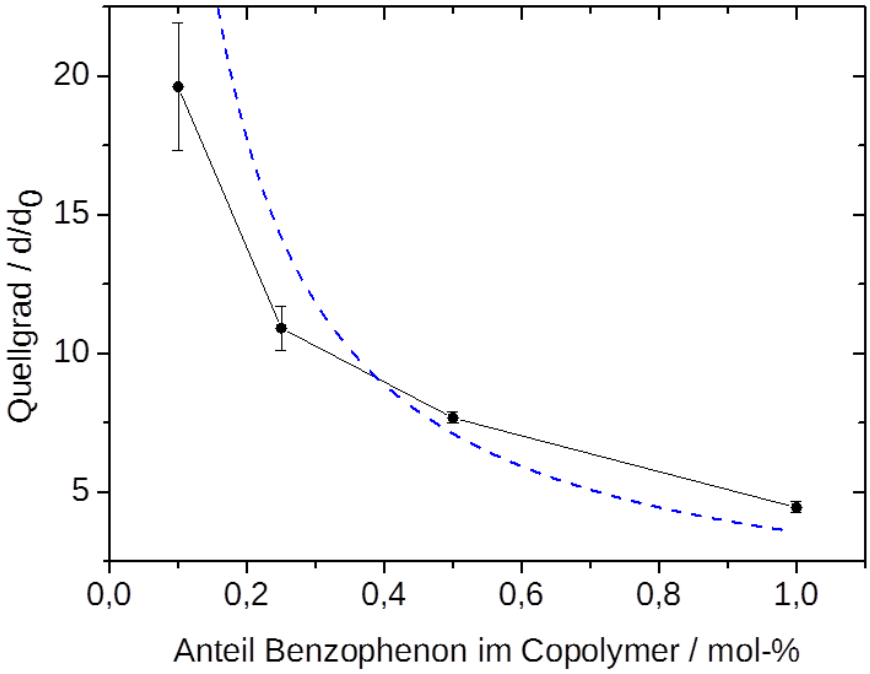


Abbildung 3-6: Quellgrad bestimmt über ellipsometrische Messungen der Schichtdicke unter Wasser. Gequollene Schichten aus binären Copolymeren mit unterschiedlichen Vernetzeranteilen x_{BPEM} (B-1, B-2a, B-3a, B-4). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus mehreren Messungen dar. Blaue, gestrichelte Linie: exponentieller Fit der Datenpunkte mit der Funktion $y = A \cdot x_{BPEM}^{-1/3}$.

Der Quellgrad wurde für binäre Copolymere aus $OEGMA_{475}$ und BPEM (B-1, B-2a, B-3a und B-4) bestimmt. Alle Copolymere sind im beobachteten Bereich zwischen 0 °C und 90 °C wasserlöslich. Um Temperatureinflüsse dennoch zu vermeiden, wurde der Quellgrad jeweils bei

Raumtemperatur aufgenommen. Die Schichtdicken der Hydrogelschichten unter Wasser sind jeweils größer als im trockenen Zustand. In den Copolymeren mit Vernetzeranteilen zwischen 0,1 % und 1,0 % variiert der Quellgrad zwischen 4 und 19 (**Abbildung 3-6**). In Übereinstimmung mit der Flory-Rehner-Theorie ist der Quellgrad SR invers proportional zum Vernetzeranteil. Nach Toomey *et al.* ist der Quellgrad für die immobilisierten Hydrogelschichten über die inverse Kubikwurzel mit dem Vernetzeranteil verknüpft (**Formel 2-6**).[102] Der exponentielle Fit der Daten unter Berücksichtigung dieser Abhängigkeit zeigt, dass für die untersuchten gequollenen Schichten dieser Zusammenhang angenähert gültig ist. Die Untersuchungen bestätigen, dass der Quellgrad eine Funktion des Vernetzeranteils ist.

3.1.1.5 Berechnung der Maschenweite

Die Kenntnis des Quellgrades ermöglicht eine grobe Abschätzung der Maschenweite des Hydrogels. Nach Peppas *et al.* ist die Maschenweite ξ in Hydrogelen abhängig vom Abstand r der Vernetzungspunkte im ungequollenen Zustand.[162, 163] Wenn die Anisotropie der Quellung in dünnen Schichten vernachlässigt wird (vgl. Kapitel 2. Theoretischer Teil), kann eine Abschätzung der Maschenweite nach folgenden Formeln erfolgen:

$$r = d_{C-C} \times (2N_c)^{\frac{1}{2}} \times C_n^{\frac{1}{2}} \qquad \textit{Formel 3-2}$$

$$\xi = SR^{\frac{1}{3}} \times r \qquad \textit{Formel 3-3}$$

Die für die Berechnung verwendeten Konstanten sind der Bindungsabstand einer C-C-Bindung (d_{C-C} = 0,154 nm) sowie das charakteristische Verhältnis C_n. Das charakteristische Verhältnis C_n ist für alle Methacrylate ähnlich. Für die Berechnung der Maschenweite der POEGMA-Hydrogele wird daher das charakteristische Verhältnis für PHEMA herangezogen (C_n = 6,9).[162] Die Anzahl der Monomereinheiten N_c zwischen zwei Vernetzungsstellen lässt sich unter der Annahme eines idealen Netzwerkes direkt aus dem Vernetzeranteil x_{BPEM} berechnen. Dabei wird ein quantitativer Umsatz der UV-Vernetzungsreaktion, eine gleichmäßige Verteilung des Vernetzermonomers im Copolymer und eine ideale Vernetzungsreaktion, d. h. eine Vernetzung ohne Schlaufenbildung, angenommen. Unter Berücksichtigung dieser Idealisierung errechnet sich die Anzahl der Monomereinheiten N_c zwischen zwei Vernetzungsstellen nach:

$$N_c = \frac{1}{2 \times x_{BPEM}} \qquad \textit{Formel 3-4}$$

Die typische Größe von Proteinen beträgt einige Nanometer. Für Antikörper liegt der Durchmesser beispielsweise im Bereich um 10 nm, Avidin besitzt einen Durchmesser von 5,6 nm.[164] Das bedeutet, dass diese Proteine in ein Hydrogel mit einer Maschenweite größer als 10 nm diffundieren würden. Für die Hydrogelschichten B-1, B-2a, B-3a und B-4 aus dem Quellversuch in **Abbildung 3-6** wurde mittels Formel 3-3 die Maschenweite berechnet (**Tabelle 3-2**). Für Vernetzeranteile kleiner oder gleich 0,5 % ist die Maschenweite größer als 10 nm. Die Proteine sollten also in diese Hydrogelschichten eindringen können. Für weitere Betrachtungen wurden daher ausschließlich Polymere mit einem Vernetzeranteil von 0,5 % oder weniger verwendet.

Tabelle 3-2: Berechnung der Maschenweite in gequollenen Hydrogelschichten nach Formel 3-2 und Formel 3-3 aus vernetzten, binären Copolymeren

Polymer	Vernetzeranteil x_{BPEM} (%)	Monomereinheiten zw.Vernetzungs-punkten N_c	Maschenweite ξ (nm)
B-1	0,1	500	35
B-2a	0,25	200	18
B-3a	0,5	100	11
B-4	1,0	50	7

3.1.1.6 Thermoresponsives Verhalten

Die ternären Copolymere T-1 – T-5 sind in wässriger Lösung thermoresponsiv. Um das thermische Verhalten der immobilisierten Hydrogelschichten zu untersuchen, wurden ellipsometrische Messungen an den mit den Hydrogelen beschichteten Siliziumwafern in einer thermostatierbaren Flusszelle vorgenommen. Da der Brechungsindex eine temperaturabhängige Größe ist, ist es denkbar, dass für jede Temperatur ein anderes Schichtsystem für die Berechnung der Schichtdicken nötig ist. Die Einbeziehung der genauen Brechungsindizes des umgebenden Mediums Wasser bei der jeweiligen Messtemperatur hatte jedoch innerhalb der Fehlergrenzen keinen Einfluss auf die berechnete Schichtdicke. Das Schichtsystem für die Berechnung der Hydrogelschichtdicke bei Raumtemperatur wurde daher für die temperaturabhängigen Messungen übernommen. Um andere temperaturbedingte systematische Fehler auszuschließen, wurde der Einfluss der Temperatur an einem nicht funktionalisierten Siliziumwafer mit definierter Siliziumoxidschichtdicke untersucht. Im betrachteten Temperaturbereich zwischen 20 °C und 60 °C änderten sich die ellipsometrischen Winkel Δ und Ψ nicht mehr als um 0,8°

bzw. 0,2°. Für die Berechnung der Schichtdicke der Hydrogele würde die Berücksichtigung dieses Temperatureinflusses eine etwas höhere Schichtdicke zur Folge haben (z. B. 4 nm bei einer 88 nm dicken Schicht). Soweit sich diese temperaturabhängige Basisliniendrift also tatsächlich auf die Messwerte für die Hydrogelschichtdicken auswirkt, wird sie den Effekt des erwarteten Kollaps des Hydrogels lediglich geringfügig abschwächen. Er wurde daher in allen Schichtdickenberechnungen vernachlässigt.

In **Abbildung 3-7** sind die Ergebnisse der temperaturabhängigen Schichtdickenmessung an Copolymer T-3 dargestellt. Bei steigender Temperatur kollabiert die Hydrogelschicht, die Schichtdicke nimmt ab und nähert sich bei ca. 65 °C einem Plateauwert. Der Plateauwert befindet sich noch deutlich oberhalb der Trockenschichtdicke (96 nm). Auch im kollabierten Hydrogel ist also noch Wasser gebunden. Ähnlich wie bei den Copolymeren ohne LCST-Verhalten ist der Brechungsindex im gequollenen Zustand bei 20 °C nahe am Brechungsindex für reines Wasser ($n_D^{20} = 1{,}332$). Mit fortschreitendem Kollaps steigt der Brechungsindex an und nähert sich dem Wert für reines Copolymer ($n_D^{20} = 1{,}480$). Die Änderung des gemischten Brechungsindexes zeigt an, dass mehr und mehr Wasser aus dem Hydrogel verdrängt wird. Für die Schichtarchitektur kann aus dem Brechungsindex aus **Formel 2-3** und **Formel 2-4** leicht eine theoretische Schichtdicke berechnet werden. Diese ist ebenfalls in **Abbildung 3-7** dargestellt. Die berechnete Schichtdicke entspricht im Bereich des kollabierten Hydrogels der gemessenen Schichtdicke. Je stärker das System quillt, desto weiter entfernt sich der berechnete Wert von dem gemessenen Schichtdickenwert. Diese Beobachtung ist für alle temperaturabhängigen Messungen gültig. Die Abweichung der beiden Schichtdickenwerte trat jeweils in einem Bereich für den Quellgrad zwischen 3 und 5 auf. Da sich im stark gequollenen Zustand eine geringe Abweichung im Brechungsindex stark auf die berechnete Schichtdicke auswirkt, wurde auch für die temperaturabhängigen Messungen nur die Schichtdicke zur Berechnung des Quellgrades herangezogen.

Ein wesentliches Merkmal OEG-basierter Copolymere ist, dass die Übergangstemperatur leicht über den Anteil verschieden langer OEG-Seitenketten eingestellt werden kann.[67, 70] Auch die ternären Copolymere T-1 – T-5 unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung und weisen in wässriger Lösung verschiedene Übergangstemperaturen auf. Um zu überprüfen, ob das Schaltverhalten der Copolymere auch in den immobilisierten Filmen eingestellt werden kann, wurden Filme aus den ternären Copolymeren mit verschiedenen Anteilen $OEGMA_{475}$ mit längeren OEG-Seitenketten hergestellt und das Schaltverhalten mittels temperaturabhängigen ellipsometrischen Messungen untersucht. **Abbildung 3-8a** zeigt die Kollapskurven der ternären

Copolymere T-1, T-3 und T-4. Je größer der $OEGMA_{475}$-Anteil, desto höher ist die Übergangstemperatur. Ebenso ist der Quellgrad für Filme mit größerem $OEGMA_{475}$-Gehalt höher. Diese Beobachtung steht im Einklang mit ähnlichen Untersuchungen an makroskopischen Hydrogelen des gleichen Copolymersystems[165] (vgl. auch Kapitel 3.1.1.7). Die Form der Übergangskurven ist weder sigmoidal, wie in typischen Trübungskurven, noch linear. Die Übergangskurven der Copolymere T-3 und T-4 mit 21 % bzw. 33 % $OEGMA_{475}$-Anteil lassen sich in zwei separate

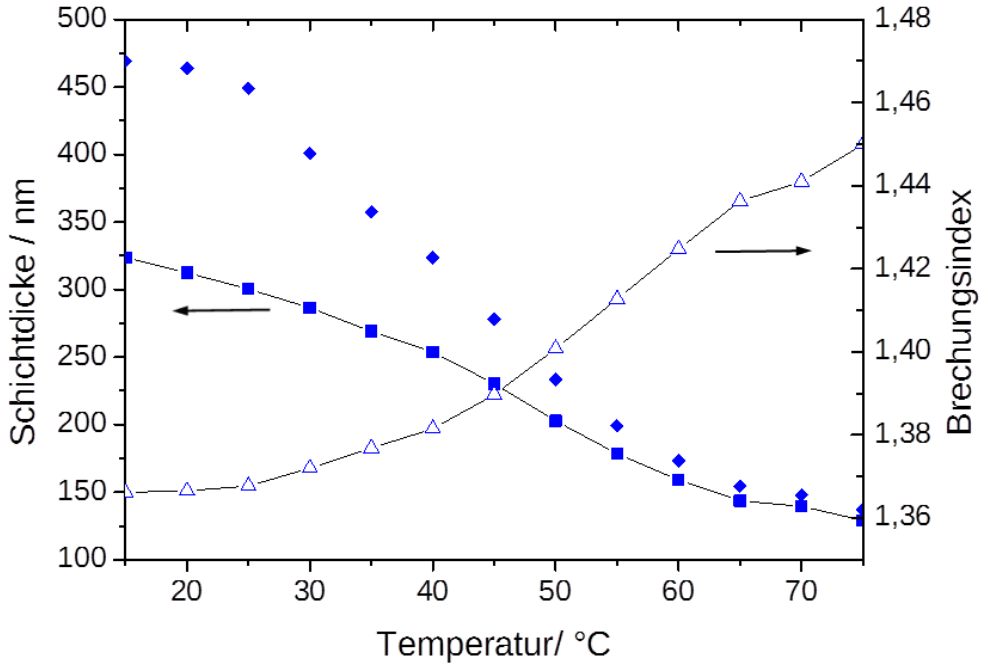


Abbildung 3-7: Thermisch induzierter Kollaps einer Hydrogelschicht aus Copolymer T-3. Ellipsometrische Messungen der Schichtdicke und des Brechungsindex. (■) Schichtdicke, (Δ) Brechungsindex und (♦) Schichtdicke, berechnet aus dem Brechungsindex nach Formel 2-3 und Formel 2-4.

Bereiche einteilen: Bei Temperaturen unterhalb der Übergangstemperatur wird stetig Wasser aus dem Hydrogel verdrängt, ab einer bestimmten Temperatur ist der Kurvenverlauf dann etwas steiler und der Wasseranteil im Hydrogel sinkt schnell bis auf ein Minimum ab. Die entsprechenden *onset*-Temperaturen der Hydrogelschichten steigen mit steigendem $OEGMA_{475}$-Anteil. Für Copolymer T-3 liegt sie im Bereich um 30 °C, für Copolymer T-4 bei ca. 40 °C. Für Copolymer T-1 liegt die *onset*-Temperatur möglicherweise außerhalb des Messbereichs. Der steilere Kurvenbereich oberhalb der *onset*-Temperatur kann dem thermoresponsiven Kollaps der Hydrogelschichten zugeordnet werden. In Übereinstimmung mit dieser Annahme zeigte auch das reine OEGMA-Copolymer B-3a beim Erhitzen eine leichte Abnahme des Quellgrades. Zwischen 20 °C und 60 °C nimmt der Quellgrad stetig von 5,9 auf 5,6 ab. Dieser leichte Wasserverlust in der Hydrogelschicht ist vermutlich auf eine Abnahme der Lösemittelqualität für OEGs in Wasser zurückzuführen.[166] Wie aktuelle Untersuchungen mittels Impedanzspektroskopie zeigen, ändert

sich auch für längerkettige PEOs im betrachteten Temperaturbereich von 10 – 70 °C sukzessive die Zahl der Wassermoleküle in der Hydrathülle der Ethergruppen.[167] Es ist allerdings festzuhalten, dass die binären nichtschaltbaren OEGMA-Copolymere auch bei höheren Temperaturen noch hochgequollen vorliegen und keinen thermoresponsiven Übergang wie die binären Copolymere zeigen.

Die Übergangstemperaturen der Filme aus den thermoresponsiven ternären Copolymeren zeigen zumindest den gleichen Trend wie die Trübungspunkte der Copolymere in wässriger Lösung. Allerdings ist die *onset*-Temperatur in den Filmen jeweils zu tieferen Temperaturen verschoben. Ursache dafür ist vermutlich die im Vergleich zu den verdünnten Polymerlösungen höhere lokale Copolymerkonzentration im Hydrogel. Schließlich ist die Übergangstemperatur thermoresponsiver Polymere eine Funktion der Copolymerkonzentration (vgl. Kapitel 2.1).[11] Die Lage der Übergangstemperaturen in den Copolymerfilmen lässt sich wie in Copolymerlösungen über die Anteile des hydrophileren $OEGMA_{475}$ einstellen. Im Gegensatz zu den Trübungskurven der Copolymerlösungen erstreckt sich der thermoresponsive Übergang in den Copolymerfilmen über einen weiten Temperaturbereich. Bei der Beurteilung der Unterschiede aus den beiden Messmethoden sollte darauf hingewiesen werden, dass die Trübung der Copolymerlösung allein keinerlei Information über den Zustand der Hydratation des Copolymers gibt. In Hydrogelen ist die Hydratation der Polymerketten aber neben sog. „freiem“ Wasser entscheidend für den Quellgrad verantwortlich.[28] In einem ähnlichen System wurde für immobilisierte Polymerbürsten aus dem gleichen Copolymersystem aus MEO_2MA und $OEGMA_{475}$ ebenfalls ein solch breiter thermoresponsiver Übergang beobachtet. Laloyaux *et al.* zeigten mittels Quarzkristall-Mikrowaage (QCM) dass der thermoresponsive Kollaps der Polymerbürsten in einem Temperaturbereich von über 20 °C stattfand.[115] Um zu untersuchen, ob der breite Übergang in den aufgeschleuderten Filmen tatsächlich mit dem Copolymersystem zusammenhängt, oder ob die spezielle Architektur des Schichtsystems den Übergang beeinflusst, wurden temperatur-abhängige ellipsometrische Messungen an PNIPAM-Schichten vorgenommen. PNIPAM wurde dafür ebenfalls mit dem Photovernetzer BPEM copolymerisiert (PNIPAM-x in **Tabelle 3-1**). Die Immobilisierung erfolgte analog der Immobilisierung der OEGMA-Copolymere über Rotationsbeschichtung und anschließende Photovernetzung. Die temperaturabhängige Änderung des Quellgrades ist in **Abbildung 3-8b** zu sehen. Vor und nach dem thermoresponsiven Übergang befindet sich der Quellgrad auf einem Plateauwert. Ebenso wie im OEGMA-Copolymer T-3 bleibt der Quellgrad im PNIPAM-Copolymer nach dem Kollaps oberhalb von 1. Auch nach dem Kollaps ist also noch Wasser in der Schicht gebunden.

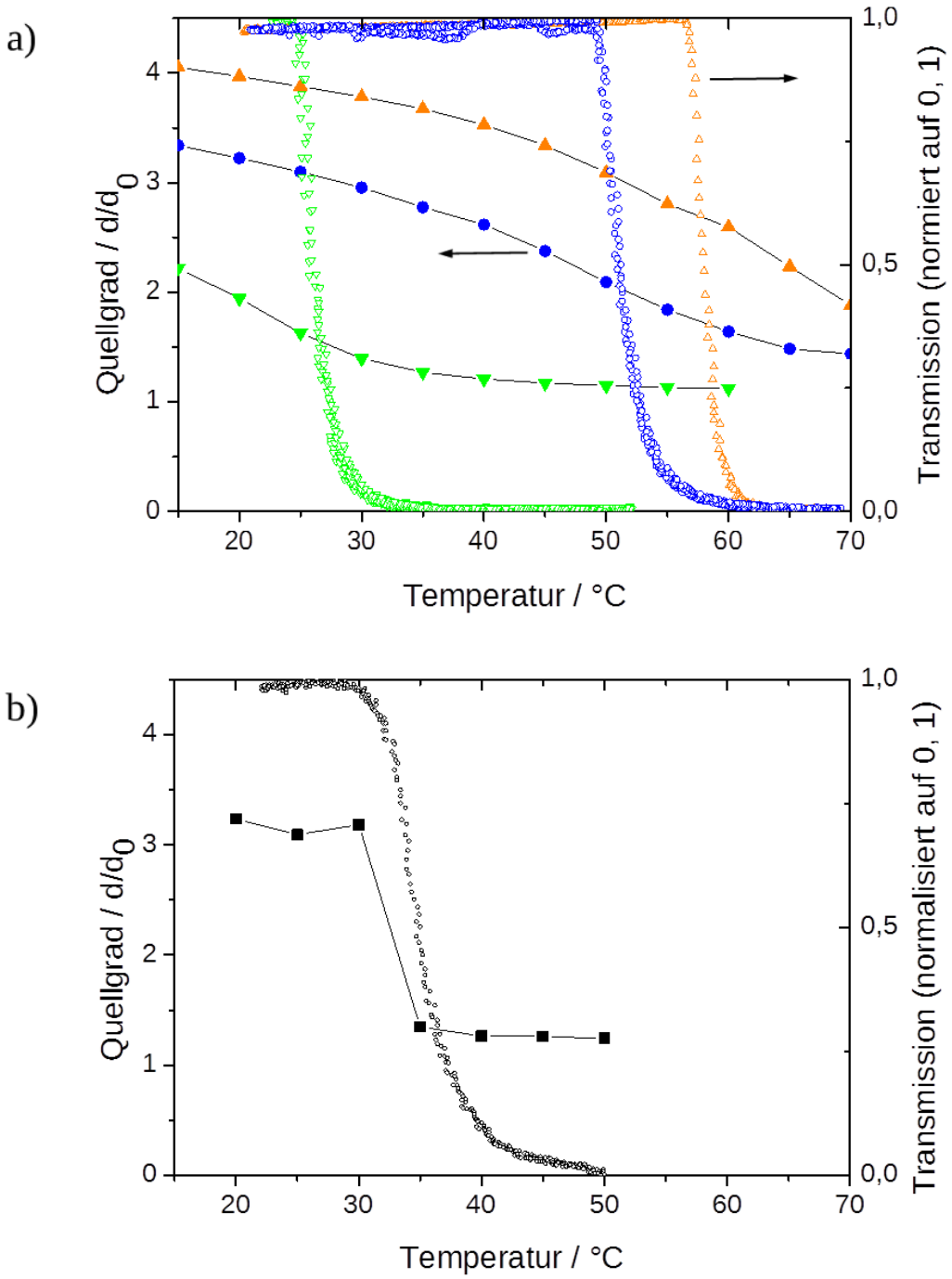


Abbildung 3-8: Thermoresponsiver Kollaps verschiedener Hydrogelschichten aus unterschiedlichen Copolymeren. Volle Symbole: Quellgrade SR der Hydrogelfilme in Wasser, bestimmt über die Schichtdicke aus ellipsometrischen Messungen. Offene Symbole: Trübungsmessungen der Copolymere in Wasser. **a)** ternäre Copolymere aus MEO_2MA, $OEGMA_{475}$ und BPEM. Dreiecke aufwärts (▲, △) für Copolymer T-4, Kreise (●, ○) für Copolymer T-3, Dreiecke abwärts (▼, ▽) für Copolymer T-1.
b) Quellgrade (■) und Trübungsmessung (○) für das binäre Copolymer PNIPAM-x (NIPAM und BPEM).

Verglichen mit Trübungsmessungen der Polymerlösung desselben Polymers PNIPAM-x, verläuft der Phasenübergang im gleichen Temperaturbereich. Gegenüber dem Übergang im OEGMA-Copolymer ist der Schichtkollaps sehr scharf und vollzieht sich innerhalb des Messintervalls von 5 °C. Vergleichbare Unterschiede im Schaltverhalten dünner Schichten aus Poly(*N*,*N*-diethylacrylamid) (PDEAAm) und PNIPAM zeigten bereits Schmaljohann *et al.*.[120] Sie erklärten das unterschiedliche Schaltverhalten mit den verschiedenen Voraussetzungen für die Wasserstoffbrückenbindung. Sowohl das sekundäre Amid in PDEAAm als auch die OEG-Einheiten der OEG-Copolymere wirken einzig als Wasserstoffbrückenakzeptoren. Dagegen können die primären Amide in PNIPAM sowohl als Wasserstoffbrückenakzeptoren als auch als –donoren wirken. Dadurch werden die Wechselwirkungen sowohl innerhalb der Polymerkette, als auch zwischen verschiedenen Polymerketten verstärkt. Als Konsequenz sollte dadurch der Phasenübergang wie beobachtet schärfer werden. Aktuelle Untersuchungen mittels Infrarotspektroskopie und NMR-Spektroskopie zeigen zudem, dass Copolymere aus MEO_2MA und $OEGMA_{475}$ nach dem Phasenübergang noch hochgradig hydratisiert vorliegen. Sun *et al.* zeigten für eine Lösung eines Copolymers aus MEO_2MA und $OEGMA_{475}$, dass die OEG-Seitenketten oberhalb der LCST Wasser weiter graduell abgeben.[64] Spektroskopische Untersuchungen an PNIPAM belegen dagegen einen relativ hohen Dehydratationsgrad und nur geringe Veränderungen oberhalb der LCST.[57, 64, 168, 169]

Die starken Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten in PNIPAM erklären wahrscheinlich auch das typische Hystereseverhalten von PNIPAM-Lösungen. Nach dem Heizen über die LCST hinaus gehen die Polymerketten beim Kühlen erst bei einer niedrigeren Temperatur wieder in Lösung. Dagegen zeigen die OEG-basierten Copolymerlösungen kein Hystereseverhalten. [69, 70, 170] Auch die OEG-basierten Hydrogelschichten können mehrmals ohne Hysterese zwischen kollabiertem und gequollenen Zustand hin- und her geschaltet werden (**Abbildung 3-9**). Selbst nach mehreren Zyklen bleibt der Quellgrad bei gleicher Temperatur konstant.

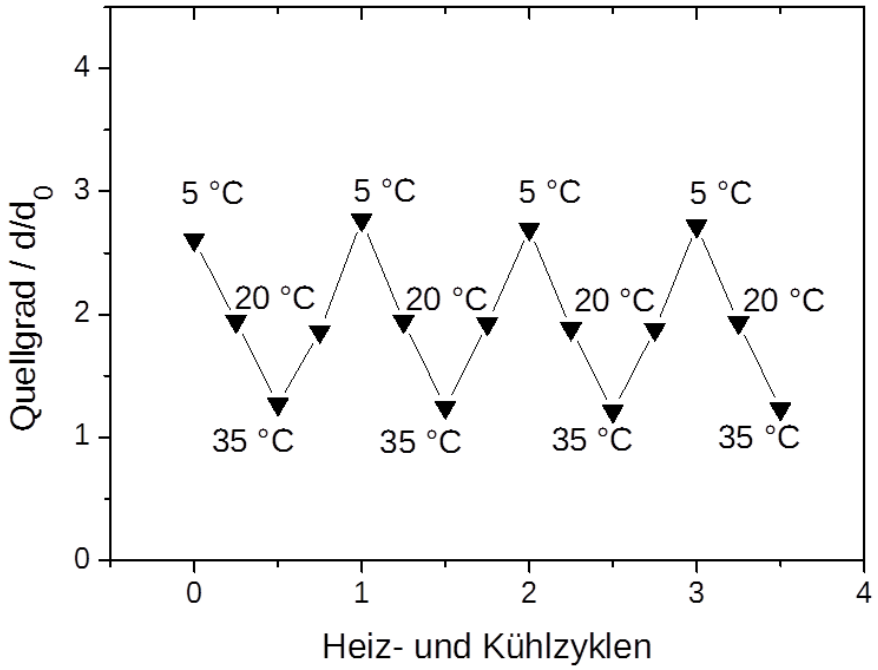


Abbildung 3-9: Quellgrad in mehreren Heiz- und Kühlzyklen für eine Hydrogelschicht aus dem thermoresponsiven Copolymer T-1.

3.1.1.7 Vergleich des thermoresponsiven Verhaltens von nanoskaligen Hydrogelschichten mit makroskopischen Hydrogelen

Der mittels Ellipsometrie bestimmte thermoresponsive Kollaps OEGMA-basierter Hydrogelschichten erstreckt sich über einen großen Temperaturbereich. Um zu verifizieren, dass diese Eigenschaft tatsächlich vom eingesetzten Polymer abhängt, wurde eine weitere Charakterisierungsmethode eingesetzt. Zusätzliche direkte Charakterisierungen des oberflächengebundenen Hydrogels sind nicht ohne weiteres möglich, da das Arbeiten unter Wasser, die Thermostatierbarkeit des Systems sowie die nanoskalige weiche Hydrogelschicht Anforderungen ergeben, die sich mit anderen Oberflächencharakterisierungsmethoden wie beispielsweise Rasterkraftmikroskopie (AFM) nur mit einem sehr hohen apparativen und experimentellen Aufwand bewältigen lassen.[140] Der thermoresponsive Kollaps wurde daher zusätzlich in makroskopischen Hydrogelen untersucht. Dazu wurden monolithische makroskopische Hydrogele aus MEO_2MA/ $OEGMA_{475}$ (OEG-Hydrogel) sowie aus NIPAM (NIPAM-Hydrogel) hergestellt (s. Experimenteller Teil). Das molare Monomerverhältnis für das OEG-Hydrogel betrug MEO_2MA/ OEGMA 85:15. Als Vernetzer wurde für das OEG-basierte Hydrogel Ethylenglykoldimethacrylat (EGDMA), für das NIPAM-Hydrogel *N*,*N*-Methylenbisacrylamid (BIS) verwendet. Um eine gute mechanische Stabilität der

Monolithen zu erreichen, wurde für das OEG-Hydrogel ein Vernetzergehalt von 2 % und für das PNIPAM-Hydrogel ein Vernetzergehalt von 4 % gewählt. Für die Messung des temperaturabhängigen Gleichgewichtsquellgrades wurden verschiedene Monolithen bei unterschiedlichen Temperaturen in einem Wasserbad gequollen. Die Quellzeit bis zum Erreichen des Quellgleichgewichts betrug für diese makroskopischen Hydrogele 24 h. Nach dieser Zeit wurden die Hydrogelmonolithen aus dem Wasserbad genommen, ungebundenes Wasser mit einem Filterpapier von der Oberfläche getupft und die Hydrogele gewogen. Der Quellgrad SR wurde aus der Masse des gequollenen Hydrogels und der Trockenmasse nach **Formel 2-2** berechnet. Trotz des höheren Gehalts an Vernetzer hat das NIPAM-Hydrogel bei Raumtemperatur einen Quellgrad von 20 und ist damit stärker gequollen als das OEG-Hydrogel mit einem Quellgrad von 8. Für einen Vergleich des OEG-Hydrogels mit dem

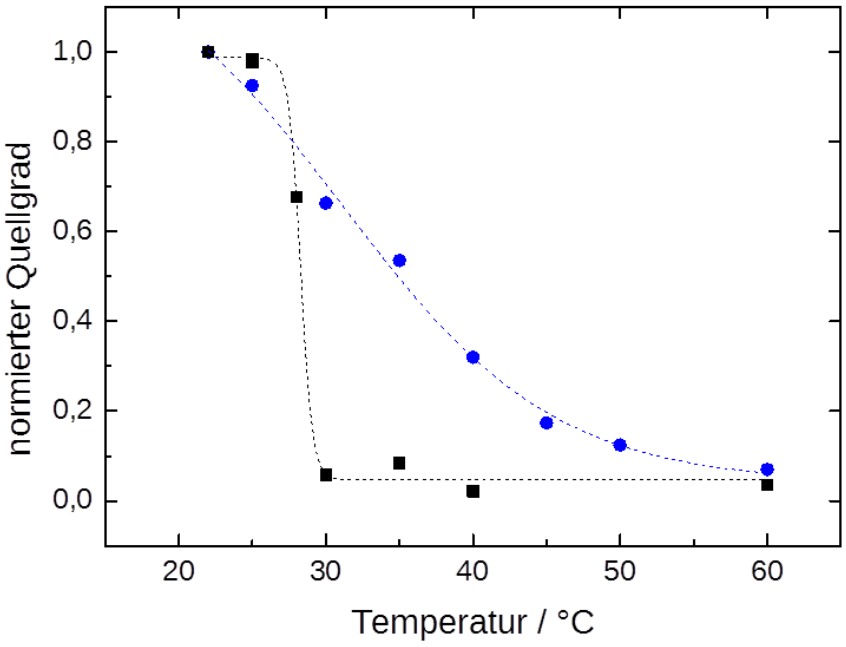


Abbildung 3-10: Gravimetrisch bestimmte Quellgrade von makroskopischen Hydrogelen aus PNIPAM (■) und P(MEO_2MA-co-$OEGMA_{475}$) (●) bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Quellgrade sind auf den größten Wert normiert. Die Linien dienen ausschließlich als Hilfslinien zur besseren Orientierung.

NIPAM-Hydrogel wurden die Quellgrade auf den größten Wert normiert (**Abbildung 3-10**). Der thermoresponsive Kollaps des PNIPAM-Hydrogels ist bereits bei 30 °C abgeschlossen und vollzieht sich in einem engen Temperaturbereich innerhalb des Messintervals von 2 °C. Verglichen mit Trübungsmessungen von unvernetztem PNIPAM in Lösung, ist der *onset* des Kollapses zu tieferen Temperaturen verschoben. Nach dem Kollaps ist das NIPAM-Hydrogel ein fester, weißer Feststoff. Der thermoresponsive Kollaps des OEG-basierten Hydrogels vollzieht sich über einen weiten Temperaturbereich vom Beginn der Messung bei 22,5 °C bis ca. 60 °C.

Eine leichte Trübung des Hydrogels setzt bereits bei 45 °C, vor dem vollständigen Kollaps, ein. Auch bei 60 °C ist das kollabierte OEG-Hydrogel noch weich und nur leicht trübe. Der Wasseranteil ist im kollabierten Zustand aber mit dem des NIPAM-Hydrogels vergleichbar. Die Ergebnisse der gravimetrischen Messungen der OEG-basierten Hydrogele decken sich gut mit Untersuchungen von Paris *et al.*, die ebenfalls das Quellverhalten von MEO_2MA/ OEGMA-Hydrogelen, allerdings vernetzt mit dem etwas längeren Vernetzer Tetra(ethylenglykol)dimethacrylat (TEGDMA), untersuchten.[165]

Der Verlauf der Quellkurven, sowohl des OEG-basierten makroskopischen Hydrogels, als auch des PNIPAM-Hydrogels, entsprechen denen der nanoskaligen Hydrogelschichten. Die Untersuchungen der temperaturabhängigen Quellgrade in Masse unterstützen also die Befunde aus den ellipsometrischen Messungen.

Da es sich bei den Phasenübergängen der Hydrogele um Übergänge erster Ordnung handelt, können sie mittels thermischer Analyse wie Differentialkalorimetrie (engl.: *differential scanning calorimetry*, DSC) verfolgt werden. Für PNIPAM-Hydrogele wurde mit dieser Methode bereits eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt.[171-173] Für OEG-basierte Copolymere mit PAA zeigten Jin *et al.* mittels DSC-Messungen, dass die Wärmetönung beim thermoresponsiven Übergang nur sehr schwach ausgeprägt ist und über einen weiten Temperaturbereich verläuft. Um einen besseren Einblick in die Unterschiede der Phasenübergänge bei den in dieser Arbeit verwendeten Polymersysteme zu bekommen, wurden DSC-Messungen sowohl für das NIPAM-Hydrogel, als auch für das OEG-Hydrogel vorgenommen. In beiden Thermogrammen ist ein endothermer Peak zu sehen (**Abbildung 3-11**). Die *onset*-Temperaturen wurden über den Schnittpunkt der Tangente an einen idealisierten symmetrischen Peak mit der Basislinie bestimmt; sie liegen für das PNIPAM-Hydrogel bei 31,8 °C und für das OEG-Hydrogel bei 40,5 °C. Der Wärmefluss setzt allerdings in beiden Fällen schon vor den *onset*-Temperaturen ein. Die *onset*-Temperaturen liegen im Bereich der Übergangstemperaturen, die für in Wasser gelöste PNIPAM und P(MEO_2MA-co-$OEGMA_{475}$) der gleichen Zusammensetzung zu erwarten wären ($LCST_{PNIPAM} \approx 32$ °C; $LCST_{P(MEO2MA\text{-}co\text{-}OEGMA475)} \approx 43$ °C).[39] Der endotherme Peak ist beim NIPAM-Hydrogel wesentlich schärfer und stärker ausgeprägt als beim OEG-Hydrogel. Die Wärmemenge ist beim PNIPAM-Hydrogel mit 4,6 kJ/ mol fast 7 mal so groß wie beim OEG-basierten Hydrogel mit 0,7 kJ/ mol. Aus dem Verhältnis aus Peakhöhe und Peakfläche kann auf die Stärke des Übergangs und auf den kooperativen Effekt geschlossen werden.[172] Dieser ist also im PNIPAM-Hydrogel deutlich größer als im OEG-Hydrogel.

Bei den gravimetrischen Messungen an OEG-basierten makroskopischen Hydrogelen und den ellipsometrischen Messungen an OEG-basierten Hydrogelschichten schrumpft das Hydrogel jeweils kontinuierlich über einen weiten Temperaturbereich. Wasser wird also aus dem Hydrogel verdrängt. Die DSC-Messungen legen nahe, dass dies eher einer kontinuierlichen Verschlechterung der Lösemittelqualität geschuldet ist als einem Phasenübergang. Der Phasenübergang setzt dann erst zu einem späteren Zeitpunkt ein.

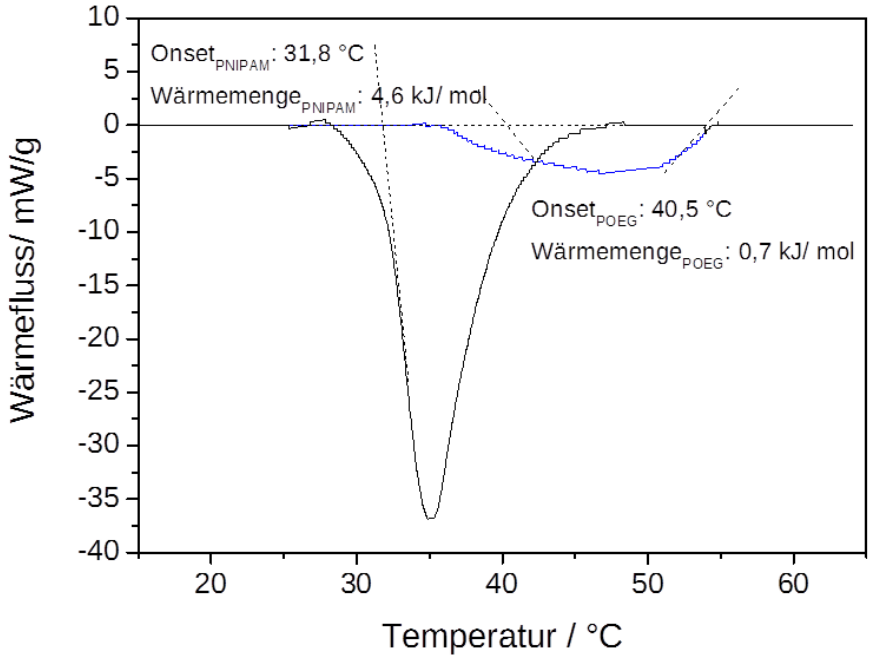


Abbildung 3-11: DSC-Thermogramme für makroskopische Hydrogele aus P(MEO_2MA-co-$OEGMA_{475}$) (- -) und PNIPAM (—). Dargestellt sind die Heizkurven mit einer Heizrate von 2K/ min. Die onset-Temperaturen ergeben sich aus dem Schnittpunkt der Tangenten an einen idealisierten symmetrischen Peak mit der Basislinie, die Wärmemenge aus der Peakfläche unter der Basislinie.

3.1.2 Immobilisierung über kürzerwellige UV-Strahlung

Weiterhin wurde untersucht, ob die Stabilität photovernetzter Polymerschichten nur von der Dauer der Bestrahlung, d. h. vom Fortschritt der Vernetzungsreaktion und damit letztlich von der Anregung des Photovernetzers abhängt, oder ob die mit der Bestrahlung eingetragene Energie als unerwünschten Nebeneffekt auch einen photochemischen Abbau bewirkt.

Dazu wurden analog zur im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Prozedur Polymerfilme mit einer Schichtdicke von ca. 100 nm auf Siliziumwafer aufgetragen und mit UV-Licht bestrahlt, das gegenüber dem Absorptionsmaximum des Photovernetzers zu kürzeren Wellenlängen verschoben war. Für die Vernetzung der Polymerschichten wurde als kürzerwellige Strahlungsquelle eine UV-Handlampe (oft eingesetzt für die Dünnschicht-chromatographie) mit einer Leistung von 4 W und einem Emissionsmaximum bei 254 nm verwendet. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde für die Bestrahlung der Polymerschichten mit längerwelligem UV-Licht ebenfalls eine UV-Handlampe mit 4 W Leistung verwendet. Das Strahlungsmaximum dieser UV-Lampe liegt bei 366 nm und damit wie bei der standardmäßig verwendeten UV-Lampe mit höherer Leistung (vgl. Kapitel 3.1.1) im Bereich des n-π*-Übergangs des Photovernetzers. Die Lampenspektren der beiden UV-Lampen sind in **Abbildung 3-12** dargestellt. Bei der UV-Lampe mit dem Strahlungsmaximum bei 366 nm

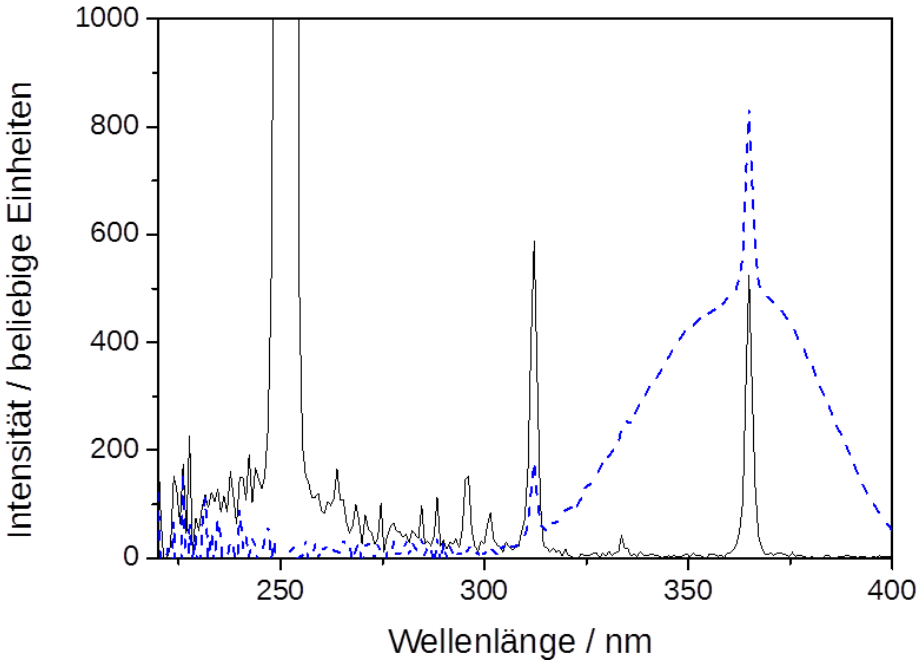


Abbildung 3-12: Lampenemissionsspektren der verwendeten UV-Lampen mit einem Strahlungsmaximum bei 366 nm (- -) und 254 nm (—). Aufgenommen mit einem photonischen Mehrkanalanalysator.

wird der kürzerwellige Bereich unter 300 nm mit einem Filters abgetrennt. Die Strahlungsintensität ist bei diesen Wellenlängen im Rahmen der Messungenauigkeit null. Die kürzerwellige UV-Lampe hat neben dem Strahlungsmaximum bei 254 nm noch weitere Intensitätsmaxima bei längeren Wellenlängen im Bereich des Absorptionsmaximums des Photovernetzers.

Beide UV-Lampen wurden für die Bestrahlung photovernetzerhaltiger Polymerschichten aus Copolymer B-3a (**Tabelle 3-1** auf S. 31, 0,5 % Photovernetzer) eingesetzt. Da die Leistung der Lampen geringer ist als die der standardmäßig verwendeten UV-Lampe, wurde die Bestrahlungsdauer auf 120 min erhöht. Nach dieser Zeit wurde unvernetztes Polymer mit dem in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Waschprozess entfernt. Bei der Bestrahlung mit der längerwelligen UV-Lampe betrug die verbleibende Schichtdicke für Schichten aus Copolymer B-3a 67 % und entspricht damit bei einer Abweichung von 5 % in etwa der Schichtstabilität nach Vernetzung mit der UV-Lampe höherer Leistung (**Tabelle 3-3**). Eine längere Bestrahlungsdauer erhöht die Schichtstabilität nicht weiter. Wird die Polymerschicht aus B-3a mit der kürzerwelligen UV-Lampe bestrahlt, verbleiben nach dem Waschprozess 89 % der Schichtdicke auf dem Siliziumwafer. Die Stabilität der Schicht nimmt also deutlich zu.

Tabelle 3-3: Nach dem Waschprozess verbleibende Schichtdicken der mit UV-Licht unterschiedlicher Wellenlänge vernetzten Polymerschichten

Polymer	Verbleibende Schichtdicke 366 nm (%)	Verbleibende Schichtdicke 254 nm (%)
B-3a	67	89
POEGMA	0	43

Eine Polymerschicht aus POEGMA (**Tabelle 3-1** auf S. 31, ohne Photovernetzer) wird nach der Bestrahlung mit dem längerwelligen UV-Licht durch den Waschprozess komplett entfernt. Auch bei der Verwendung der Standard-UV-Lampe mit hoher Intensität und einem emittierten Wellenlängenbereich > 315 nm wird die POEGMA-Schicht komplett abgewaschen. Nach der Bestrahlung der Polymerschicht mit dem kürzerwelligen UV-Licht verbleiben dagegen 43 % der Schicht auf dem Siliziumwafer. Das kürzerwellige UV-Licht ruft scheinbar einen Vernetzungsprozess hervor, obwohl kein Vernetzer im Polymer vorhanden ist. Die emittierte Lichtintensität der ungefilterten kürzerwelligen UV-Lampe scheidet als Erklärung für dieses Phänomen aus, da auch die hohe Lichtintensität der Standard-UV-Lampe nicht für die

Vernetzung des POEGMA ausreicht. Voraussetzung für die Vernetzung des POEGMA ist also die kürzere Wellenlänge, d. h. die höhere Energie der Bestrahlung.

Die Stabilität der POEGMA-Schicht ist abhängig von der Dauer der Bestrahlung. Werden nach 60 min Bestrahlung noch 70 % der Schichtdicke mit dem Waschprozess entfernt, sind es nach 240 min nur noch weniger als 10 % (**Abbildung 3-13a**). Scheinbar werden mit fortdauernder Bestrahlung mehr Vernetzungsstellen gebildet. Die über verschiedene Zeiten vernetzten Polymerschichten zeigen zudem ein unterschiedliches Quellverhalten (**Abbildung 3-13b**). Die Entwicklung des Quellgrades mit der Bestrahlungsdauer zeigt eine exponentielle Abhängigkeit, die mit der Verknüpfung des Quellgrades mit der Vernetzerdichte laut Flory-Rehner-Theorie korreliert. Unter Berücksichtigung des Quellgrades wird der Vernetzungsgrad des POEGMA-Polymers also über die Bestrahlungsdauer gesteuert.

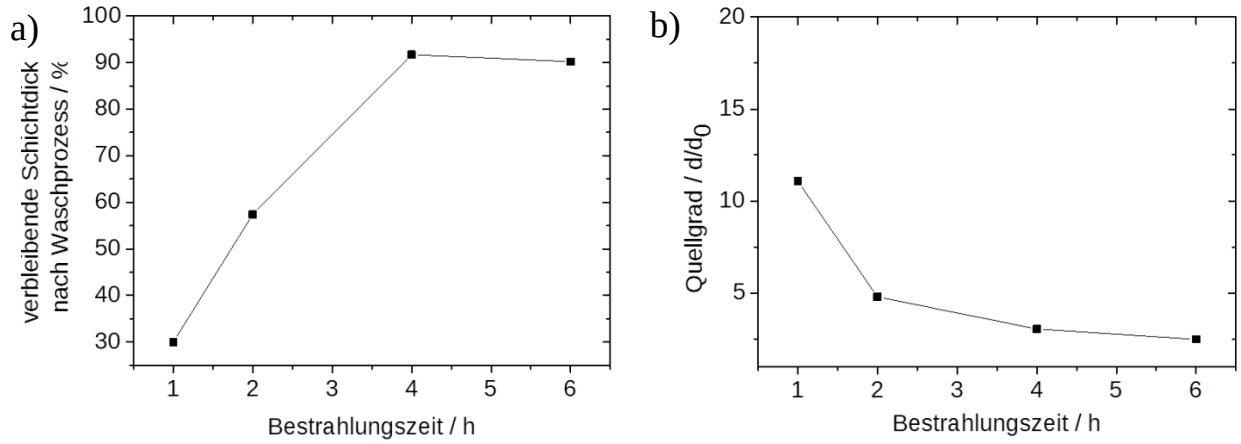


Abbildung 3-13: **a)** Nach dem Waschprozess verbleibende Schichtdicke nach verschiedenen Bestrahlungsdauern. **b)** Quellgrad der mit verschiedenen Bestrahlungsdauern hergestellten Hydrogelschichten.

Eine mögliche Erklärung für die zusätzliche Quervernetzung ist, dass die OEG-Seitenketten bei der Bestrahlung mit kürzerwelligem UV-Licht einer Photooxidation unterzogen werden. Die Photooxidation von OEGs und PEGs ist seit langem bekannt.[149, 174, 175] Bei der Photooxidation werden die OEG-Seitenketten durch das UV-Licht angeregt und reagieren aus diesem angeregten Zustand mit Luftsauerstoff unter der Bildung von Peroxiden. In einer Zerfallsreaktion bilden diese dann wiederum Radikale. Wenn sich zwei dieser Polymerradikale in räumlicher Nähe zueinander befinden, führt die Rekombination beider Radikale zu einer Vernetzungsreaktion. In trockenen POEGMA-Filmen ist eine solche räumliche Nähe gegeben und damit ist auch die Vernetzungsreaktion sehr wahrscheinlich.

Eine ähnliche UV-vermittelte Vernetzung von Hydrogelen wurde bereits von Catalani *et al.* für Poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidon) berichtet.[176] Für PEG-basierte Hydrogele sind dagegen noch

keine Untersuchungen über eine solche Vernetzung bekannt. Gezielt eingesetzt könnte die kontrollierte Photooxidation der POEGMA-Filme für die Immobilisation von OEG-basierten Polymeren einige Vorteile bieten und wäre eine einfache Alternative zu anderen Vernetzungsmethoden. Mit Hilfe einfach zugänglicher UV-Strahlung könnten so kontrolliert quellbare Hydrogelfilme ohne den Einsatz zusätzlicher Vernetzer hergestellt werden. Im Vergleich zu hochenergetischer Strahlung, wie z. B. Plasmastrahlung, wäre die eingesetzte UV-Strahlung zudem relativ mild.

3.1.3 Immobilisierung durch Amidbildung

Für die Immobilisierung und Vernetzung dünner Schichten aus Präpolymeren müssen zwischen den Polymerketten und dem Substrat sowie zwischen den Polymerketten selbst neue chemische Bindungen geknüpft werden. Bei der photochemischen Vernetzung geschieht dies über einen radikalischen weitestgehend unspezifischen Mechanismus. In der synthetischen Chemie allgemein werden dagegen die meisten Bindungen über funktionelle Gruppen geknüpft. Ein Vorteil der Bindungsknüpfung über funktionelle Gruppen ist, dass die Reaktion meist sehr spezifisch verläuft. Werden funktionelle Gruppen für Vernetzungsreaktionen genutzt, müsste der Vernetzungsgrad ebenfalls sehr präzise einzustellen sein. Die Vernetzung über funktionelle Gruppen und bifunktionale Vernetzermoleküle wurde daher als weitere Strategie zur Synthese dünner Hydrogelfilme erprobt. Als funktionelle Gruppen für die Immobilisierung und Quervernetzung der Schichten wurden Amin- und Carboxylgruppen genutzt. Besonders in der Biochemie wird die Kopplung durch die Reaktion der beiden Gruppen zu Amidbindungen häufig verwendet.[177] Bei der hier vorgestellten Syntheseroute wurden die Carboxylgruppen in das Polymer eingebaut und mit dem Vernetzer, einem längerkettigen α, ω-Diamin, zur Reaktion gebracht.

3.1.3.1 Synthese und Charakterisierung des Copolymers

Die Einführung der Carboxylgruppen in das Copolymer erfolgte über das kommerziell erhältliche Monomer Methacryloylethoxysuccinat (MES) (**Abbildung 3-14**). Copolymere aus dem carboxylgruppenhaltigen MES sind schwache Polyelektrolyte. Das heißt, dass sie nur bei pH-Werten oberhalb und um den pK_S-Wert der Säure geladen vorliegen. Da Ladungen die Übergangstemperaturen thermoresponsiver Copolymere zu höheren Temperaturen verschieben, wurde als thermoresponsives Verhalten vermittelndes Comonomer ausschließlich das kurzkettige Diethylenglykolmethylethermethacrylat (MEO_2MA) verwendet, dessen Homopolymer eine relativ niedrige Übergangstemperatur von ca. 27 °C besitzt. Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass die Übergangstemperatur aus dem beobachtbaren Temperaturbereich bis 70° C herauswandert, als wenn auch das hydrophilere Comonomer mit längeren OEG-Seitenketten eingebaut würde.

Da eine gute Quellbarkeit der Schichten ein Ziel war, wurden nur Polymere mit niedrigen Vernetzergehalten hergestellt. Allerdings verlaufen polymeranaloge Reaktionen im Allgemeinen

mit geringer Ausbeute.[178] Um dennoch eine möglichst quantitative Reaktion bezogen auf die Vernetzermoleküle zu erzielen, müssen die MES-Comonomereinheiten im Copolymer im Überschuss vorliegen. In der Reaktionsmischung betrug der molare Anteil an MES daher 10 %, der an MEO_2MA 90 %. Die Synthese des Copolymers erfolgte über eine frei radikalische Copolymerisation (**Abbildung 3-14**).

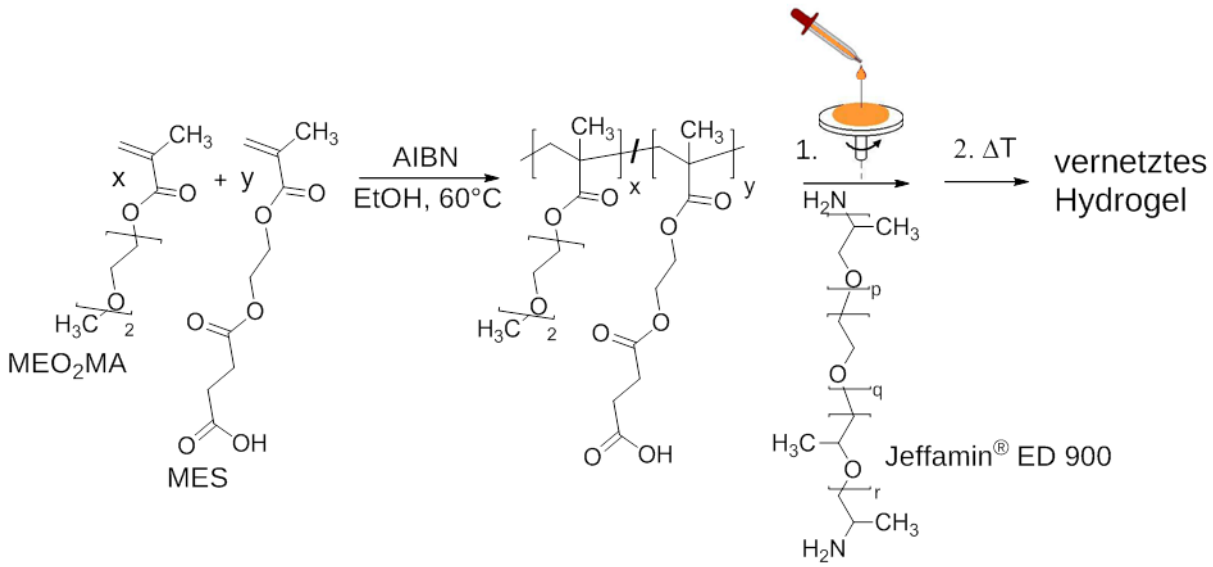


Abbildung 3-14: Schema zur Vernetzung über Amidbildung: Synthese des Copolymers über frei radikalische Copolymerisation, Rotationsbeschichtung des Copolymers mit Jeffamin® ED 900 und Erhitzen der beschichteten Substrate. Im Copolymer sind x = 9 und y = 1. In Jeffamin® ED 900 sind (p+r) ≈ 6; q ≈ 12,5.

Die Zusammensetzung des Copolymers wurde mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie ermittelt und entsprach der Zusammensetzung der Reaktionsmischung (vgl. 5. Experimenteller Teil). Die Molmassenanalyse mittels GPC ergab eine scheinbare Molmasse M_n von 91 kg/ mol. Der aus der Molmasse und der Zusammensetzung errechnete Wert für den Polymerisationsgrad DP_n beträgt 473. Wie für die photochemisch vernetzbaren Copolymere aus 3.1.1 sollte der DP_n auch bei der Vernetzung über funktionelle Gruppen wichtig für die Stabilität der Hydrogelschichten sein. Wie bereits bei den molmassenabhängigen Stabilitätstests der photovernetzbaren Copolymere aus 3.1.1.3 beschrieben, beträgt die kritische Anzahl an Vernetzermolekülen pro Kette 1. Ab diesem Wert ist eine gute Schichtstabilität zu erwarten. Mit dem gemessenen DP_n des MES-Copolymers ergibt sich rechnerisch ein kritischer Vernetzeranteil (statistisch 1 Vernetzereinheit pro Kette) von ca. 0,25 mol-%.

Die Trübungspunkte des Copolymers wurden in Reinstwasser und in drei Pufferlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert mit einer Konzentration von 3 g/ L aufgenommen. Um den Einfluss der Carboxylgruppen genauer zu eruieren wurden auch die Trübungspunkte eines eigens synthetisierten MEO_2MA-Referenzpolymers ohne Carboxylgruppen in den gleichen Lösungen

mit gleicher Konzentration bestimmt. Beim Referenzpolymer verschiebt sich der Trübungspunkt gegenüber Reinstwasser (pH ca. 6,2, der Wert schwankt je nach CO_2-Sättigung) in PBS-Puffer (pH 7,4) um 7,7 °C zu tieferen Temperaturen. Am deutlichsten um 11,9 °C verschiebt sich der Trübungspunkt gegenüber Reinstwasser in Zitronensäurepuffer mit pH 5,0. In saurerem Zitronensäurepuffer mit pH 3,0 ist der Trübungspunkt dagegen nur 8,3 °C niedriger als in Reinstwasser. Sowohl bei höherem pH-Wert in PBS-Puffer, als auch bei tieferem pH-Wert in den Zitronensäurepuffern verschiebt sich der Trübungspunkt also zu tieferen Temperaturen. Der unterschiedliche pH-Wert der Lösungen kann daher zumindest nicht alleinig für die Verschiebung des Trübungspunktes des MEO_2MA-Referenzpolymers verantwortlich sein. Eine Erklärung für das unterschiedliche Trübungsverhalten ergibt sich vielmehr aus mehreren Einflussfaktoren. Die Trübungstemperatur thermoresponsiver Polymere wird stark durch den Zusatz von Salzen beeinflusst. [179, 55, 180-183] In allen verwendeten Pufferlösungen sind verschiedene Salze zugesetzt. Die Variation des Trübungspunktes hängt von der Art und Konzentration des Salzes ab, der Effekt ist daher in den verschiedenen Pufferlösungen unterschiedlich stark ausgeprägt. In den Zitronensäurepuffern könnten zusätzlich Wechselwirkungen zwischen der Carboxylgruppe der Zitronensäure als Lewissäure und den Ethergruppen der OEG-Seitenketten als Lewisbase für die Absenkung der Trübungstemperatur verantwortlich sein. Die etwas höhere Trübungstemperatur bei pH 3 gegenüber pH 5 lässt sich mit einem Einsalzeffekt des Oxonium-Ions erklären: Für kleine pH-Werte ist dieser Effekt für ethylenglykolhaltige Verbindungen bekannt.[184, 185] Er ist verbunden mit einer Erhöhung der Trübungstemperatur und wirkt damit bei niedrigem pH der Absenkung der Trübungstemperatur welche durch die Salze und die Zitronensäure bewirkt wird entgegen.

Lösungen des carboxylgruppenhaltigen MES-Copolymers zeigten in PBS-Puffer und in Reinstwasser im beobachteten Temperaturbereich bis 70 °C keine Trübung. Copolymerlösungen gleicher Konzentration in den zwei verschiedenen Zitronensäurepuffern mit pH 5 und pH 3 trübten sich dagegen bereits bei Temperaturen unterhalb der Raumtemperatur ein: Für die Copolymerlösung in Zitronensäurepuffer mit pH 5 liegt der Trübungspunkt bei 15,9 °C, in Zitronensäurepuffer mit pH 3 bei 13,3 °C. Anders als beim MEO_2MA-Referenzpolymer korreliert der pH-Wert also mit der Trübungstemperatur. Der Grund dafür liegt in den spezifischen Effekten durch die Carboxylgrupen des MES-Copolymers: Der pK_S-Wert eines MES-Homopolymers liegt bei 5,4.[186] Demnach liegt die Carboxylgruppe in Reinstwasser und in PBS-Puffer nahezu vollständig deprotoniert vor. Durch die Ladungen der Carboxylatgruppen wird das Copolymer deutlich hydrophiler und die Thermoresponsivität geht verloren. In den

Zitronensäurepuffern liegen die Carboxylgruppen dagegen größtenteils protoniert vor. Dadurch wird das Copolymer hydrophober und der Trübungspunkt verschiebt sich gegenüber dem Homopolymer von MEO_2MA zu tieferen Temperaturen. Zusätzlich bilden sich wahrscheinlich zwischen den protonierten Carboxylgruppen und den OEG-Seitenketten H-Brücken aus.[187, 188] Diese zusätzliche Wechselwirkung zwischen den Polymerketten begünstigt deren Kollaps und bewirkt so eine Verschiebung der Trübungstemperatur zu tieferen Temperaturen. Der Einfluss der H-Brücken ist bereits für verschiedene Copolymere mit OEG-ketten und Carboxylgruppen beschrieben: Durch die Ausbildung von H-Brücken zwischen Oligoethylenglykolen und Polyacrylsäure (PAA) weist beispielsweise eine Mischung beider ansonsten vollständig wasserlöslicher Komponenten eine UCST auf.[189] Bei Temperaturen unterhalb der UCST sind die Polymerketten über H-Brücken verbunden, beim Erhöhen der Temperatur dissoziieren die H-Brücken, und die Polymere gehen in Lösung. Umgekehrt berichteten beispielsweise Klier *et al.* von einer Beeinflussung der LCST von Hydrogelen aus Methacrylsäure und OEGMAs.[190] Ähnlich wie beim in diesem Kapitel betrachteten MES-Copolymer verschiebt sich deren LCST bei kleineren pH zu tieferen Temperaturen. Beide Effekte, die Ausbildung von H-Brücken und die höhere Hydrophobizität bewirken eine Absenkung der LCST. Die Änderung der Trübungstemperatur durch die Protonierung der Carboxylgruppen des MES-Copolymers ist deutlich ausgeprägter als die Änderung beim Wechsel der Pufferlösungen für das Referenzpolymer.

3.1.3.2 Herstellung der Copolymerschichten

Die Immobilisierung des Copolymers erfolgte, wie bei den photovernetzbaren Schichten, auf mit APDMSi silanisierten amingruppenhaltigen Siliziumwafern. Anders als bei den photovernetzbaren Schichten sollten die Amingruppen des Silans direkt für die Immobilisierung des MES-Copolymers genutzt werden. Dazu müssen die Amingruppen der Oberfläche mit den Carboxylgruppen des Copolymers zur Reaktion gebracht werden. Die Auftragung des Polymers auf die Substrate erfolgte analog den photovernetzbaren Polymeren mittels Rotationsbeschichtung. Für eine Schichtdicke von ca. 100 nm wurde dazu eine Lösung von 2 Gew.-% des Copolymers in Ethylacetat bei 50 rps auf die funktionalisierten Siliziumsubstrate aufgeschleudert.

Als Vernetzer wurde das oligomere α, ω-Diamin Jeffamin® ED-900 verwendet. Jeffamin® ED-900 ist ein OEG, das an beiden Enden mit ca. 3 PPO-Monomereinheiten endverkappt ist.

Der jeweils 2. Kohlenstoff des Kettenendes trägt eine Amingruppe (**Abbildung 3-14**). Die mittlere Molmasse des Vernetzers beträgt 900 g/ mol. Durch die längere Kettenlänge im Vergleich mit einem niedermolekularen Vernetzer soll die Maschenweite der Hydrogelschicht noch erhöht werden. Jeffamin® ED-900 ist gut wasserlöslich und weist im Gegensatz zu vielen PEO-PPO-PEO-Blockcopolymeren (z. B. Pluronics®) keine LCST auf. Die Quellbarkeit der Schicht sollte also durch den Vernetzer nicht beeinflusst werden.

Eine nasschemische Reaktion des Vernetzers mit den Carboxylgruppen des aufgeschleuderten Copolymers ist nicht möglich. Versuche, das Copolymer auf diese Weise zu immobilisieren, führten jeweils nur zu Polymerschichten mit einer Dicke bis zu ca. 6 nm. Das entspricht in etwa einer Monolage des Copolymers auf dem Siliziumwafer. Der Rest der aufgeschleuderten Schicht wird vermutlich schon vor der Reaktion abgewaschen, da die Amidbildung selbst unter Einsatz von Aktivestern langsamer verläuft als die Schichten von der Oberfläche diffundieren. Alternativ zur Reaktion in Lösung kann der Vernetzer im trockenen Zustand mit den funktionellen Gruppen im Polymer reagieren. Eine solche Reaktionsroute ist z. B. für die Vernetzung von LbL-Schichten bekannt:[191] Bruening *et al*. vernetzten Polyelektrolytmultischichten aus Poly(acrylsäure) (PAA) und Poly(allylamin-Hydrochlorid) (PAH), indem sie die Polyelektrolytschichten auf 180 °C erhitzten. Die vernetzten Schichten waren anschließend gegen Änderungen des pH-Wertes stabil.[192, 193] Bruening *et al*. zeigten, dass die Vernetzung auf einer thermisch induzierten Amidbildung beruht. Bei den Polyelektrolyt-multischichten trägt allerdings jede Wiederholungseinheit eine funktionelle Gruppe. Die Reaktion zwischen den Gruppen verläuft bis zu hohen Umsätzen. Die Quellbarkeit der vernetzten Polyelektrolytmultischichten geht daher zum einen wegen der Reaktion der gut wasserlöslichen Carboxyl- und Amingruppen und zum anderen wegen des hohen Vernetzergrades verloren. Im verwendeten Copolymer befinden sich wesentlich weniger funktionelle Gruppen, außerdem wird der Diaminvernetzer Jeffamin® ED-900 nur im Unterschuss zugegeben. Eine über die thermisch induzierte Amidbildung vernetzte Schicht aus dem Copolymer und Jeffamin® ED-900 sollte daher, wenn sie stabil ist, im Vergleich zu den vernetzten Polyelektrolytmultischichten deutlich weniger Vernetzungspunkte besitzen. Der geringe Vernetzergrad sollte für einen hohen Quellgrad und für die angestrebte hohe Maschenweite des Hydrogels sorgen. Das wasserlösliche Grundgerüst des Polymers bleibt bei der Vernetzung erhalten.

Um eine Vernetzung zu erreichen, müssen Copolymer und Vernetzer zusammen auf das Substrat aufgetragen werden. Dazu wurden je nach einzustellendem Vernetzergrad verschiedene

Aliquote einer Stammlösung des Jeffamin® ED-900 in Ethylacetat zum Copolymer gegeben. Anschließend wurde die Mischung mit Ethylacetat auf die für die Rotationsbeschichtung benötigte Konzentration von 2 Gew.-% verdünnt. Auf diese Weise wurden Lösungen mit 0,5 mol-%, 1 mol-% und 5 mol-% Vernetzer hergestellt und per Rotationsbeschichtung auf die funktionalisierten Siliziumwafer aufgetragen. Die erhaltenen Schichtdicken sind für alle Proben ähnlich (**Tabelle 3-4**). Die höheren Schichtdicken für die Proben mit 5 mol-% Vernetzer sind vermutlich auf abweichende Konzentrationen der Polymerlösung bei der Rotationsbeschichtung zurückzuführen.

Die Vernetzungsreaktion wurde in einem Vakuumofen sowohl unter Luft als auch unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Für die Reaktion unter Stickstoffatmosphäre wurde der Ofen in 4 Zyklen jeweils evakuiert und mit N_2 neu befüllt. Für die Reaktion unter Luftatmosphäre wurden die beschichteten Siliziumwafer direkt erhitzt. In beiden Fällen wurden die Siliziumwafer für 2 h bei 140 °C im Ofen belassen.

Die unter Luftatmosphäre erhitzten Wafer hatten nach dem Vernetzungsprozess eine deutlich geringere Schichtdicke als direkt nach der Rotationsbeschichtung (**Tabelle 3-4**). Die Schichtdicke der unter Stickstoffatmosphäre erhitzten Wafer schrumpfte dagegen nur um wenige Nanometer. Da das Polymer hygroskopisch ist, ist vor dem Heizprozess möglicherweise Wasser in der Polymerschicht gebunden. Der geringe Rückgang der Schichtdicke kann auf beim Heizprozess entferntes Wasser zurückgeführt werden. Der starke Schichtdickenverlust beim Erhitzen unter Luftatmosphäre muss dagegen andere Ursachen haben. Möglich ist, dass beim Erhitzen mit Sauerstoff die Polymerschicht teilweise zerstört wird. Die kleineren Kontaktwinkel der Schichten sprechen dafür, dass in der oxidativen Atmosphäre zusätzliche geladene Gruppen gebildet werden, welche den Polymerfilm hydrophiler machen.

Beim an den Heizprozess anschließenden Waschprozess wird bei den unter Luftatmosphäre vernetzten Schichten kein weiteres Polymer entfernt. Auch wenn eine teilweise Zerstörung der Polymerschicht stattgefunden hat, sind Vernetzungspunkte entstanden. Die ellipsometrisch in einer Adsorptionszelle unter Reinstwasser gemessene Schichtdicke ist für die unter Luft vernetzten Schichten nahezu mit der Trockenschichtdicke identisch: Der Quellgrad dieser Schichten beträgt maximal 1,1, das vernetzte Polymer quillt also nicht. Möglich ist, dass sich beim Erhitzen neben den Amidbindungen zusätzliche Vernetzungsstellen bilden, die das Quellen des Polymers verhindern. Eine abschließende Erklärung für den Verlust der Schichtdicke konnte nicht gefunden werden. Da eine hohe Maschenweite und damit nach der

Flory-Rehner-Theorie ein hoher Quellgrad ein wichtiges Kriterium für die Hydrogelschichten in dieser Arbeit darstellt, wurde der Ansatz die Polymere unter Luft zu vernetzen nicht weiter verfolgt.

Bei den unter Stickstoffatmosphäre erhitzten Polymerschichten wird wie bei den photovernetzerhaltigen Polymeren beim Waschprozess umso mehr Copolymer entfernt, je weniger Vernetzer eingesetzt wurde. Der Verlust beträgt allerdings selbst bei einem geringen Vernetzeranteil von 0,5 % nur 16 % der Schichtdicke. Die Quellgrade bei Raumtemperatur stimmen nicht mit der nach der Flory-Rehner-Theorie erwarteten Entwicklung überein: Der Quellgrad beträgt für den Copolymerfilm mit 0,5 mol-% Jeffamin nur 1,8, für den Copolymerfilm mit 1 mol-% Vernetzer und für den mit 5 mol-% Vernetzeranteil am stärksten vernetzten Film sind sie mit 3,3 und 2,0 etwas höher. Offenkundig spielt für den Quellgrad der Hydrogelfilme auch die stärkere Hydrophilie des Vernetzermoleküls eine Rolle: Jeffamin® ED 900 ist bei Temperaturen bis 90 °C in Reinstwasser löslich und zeigt keinen Trübungspunkt. Auch in einer Lösung des Jeffamins in verdünnter NaOH mit pH 12 bleibt der Vernetzer bis 90 ° C gelöst. Unter diesen basischen Bedingungen oberhalb des pK_S des Jeffamins liegen alle Amine deprotoniert vor. Die Löslichkeit in diesem Zustand entspricht eher der Löslichkeit des zu Amiden umgesetzten Vernetzers im Hydrogel. Die Amingruppen die sich bei der Reaktion mit den Carboxylgruppen des Polymers zu Amidgruppen umsetzen sind offensichtlich für die gute Löslichkeit nicht entscheidend. In den vernetzten Polymerschichten bindet der Vernetzer durch den größeren Anteil an hydrophilen Gruppen mehr Wasser als die Comonomereinheiten, dadurch können Schichten mit mehr Vernetzereinheiten mehr Wasser binden und stärker quellen. Die Comonomereinheiten selbst sind dagegen bei Raumtemperatur (ca. 22 °C) noch nicht sonderlich hydrophil. Ein Hinweis darauf geben auch die Kontaktwinkelmessungen: Die Kontaktwinkel der Hydrogelschichten bei Raumtemperatur sind mit Werten um 80° relativ groß. Ähnliche Werte wurden für Kontaktwinkel auf Polymerbürsten aus $PMEO_2MA$ bereits von Caycara *et al.* bei Temperaturen um 25 °C berichtet.[194] Sie zeigten, dass die Kontaktwinkel mit den $PMEO_2MA$-Bürsten erst bei Temperaturen unterhalb 25 °C Werte unter 60° einnehmen. Dieser Befund für die Polymerbürsten stimmt gut mit dem ellipsometrisch untersuchten thermoresponsiven Verhalten der Copolymerschichten überein (s. nächster Abschnitt).

Tabelle 3-4: Herstellung und Charakterisierung der verschiedenen mittels thermischer Amidbildung vernetzten Hydrogelschichten

Vernetzeranteil[a] $x_{Jeffamin}$ (mol-%)[a]	Vernetzungs-atmosphäre	Schichtdicke[b] nach Rotations-beschichtung (nm)	Schichtdicke[b] nach Erhitzen (nm)	Schichtdicke[b] nach Waschen (nm)	Verlust Schichtdicke nach Waschen (%)	Kontakt-winkel[c] (°)	Quellgrad[b, c] in Reinstwasser (d/d_0)
0,5	Luft	112	76	76	0	59	1,0
1,0	Luft	108	79	78	1	58	1,1
5,0	Luft	122	77	79	(-2)	57	1,1
0,5	N_2	110	103	89	16	84	1,8
1,0	N_2	106	99	85	13	80	3,3
5,0	N_2	125	125	111	11	79	2,0

[a] Bezogen auf Monomereinheiten. [b] Bestimmt mittels Ellipsometrie. [c] Bei Raumtemperatur.

3.1.3.3 Thermoresponsives Verhalten der Schichten

Die mittels Rotationsbeschichtung hergestellten und unter Stickstoffatmosphäre thermisch vernetzten Copolymerschichten wurden in einer beheizbaren Flusszelle mittels Ellipsometrie vermessen. Die Schichtdicken der gequollenen Hydrogele wurden bei verschiedenen Temperaturen bestimmt und der Quellgrad aus der Trockenschichtdicke d_0 berechnet.

In **Abbildung 3-15** ist die Entwicklung des Quellgrades einer mit 0,5 mol-% Jeffamin ED 900 vernetzten Schicht mit steigender Temperatur in verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt. In Reinstwasser beträgt der Quellgrad selbst bei 15 °C nur 2,4. Der Temperaturbereich in dem sich der Schichtkollaps vollzieht verläuft bis ca. 30 °C. Diese geringe Übergangstemperatur spricht wie die hohen Werte bei der Kontaktwinkelmessung für eine geringe Hydrophilie der Copolymerschicht. Im Gegensatz dazu ist eine Lösung des Copolymers in Reinstwasser in einem weiten Temperaturbereich bis 70 °C gut löslich und zeigt keine Trübung. Das Phasenverhalten der immobilisierten Copolymerschicht unterscheidet sich also deutlich von dem der Copolymerlösung. Vergleichbar ist das Kollapsverhalten der Copolymerschicht aus dem MES-Copolymer dagegen mit dem Kollapsverhalten einer Schicht aus dem photovernetzten MEO_2MA-Copolymer T-1 mit gleichem Vernetzergehalt. Sowohl der Quellgrad, als auch der Temperaturbereich in dem sich der Kollaps vollzieht stimmt bei beiden Copolymerschichten nahezu überein (**Abbildung 3-8**).

Werden die Quellkurven der MES-Copolymerschicht in PBS-Puffer mit pH 7,4 oder in Zitronensäurepuffer mit pH 5 aufgenommen, ändern sich die Quellgrade merklich: In PBS-Puffer steigt der Quellgrad an und die Kollapskurve verläuft insgesamt flacher. Selbst bei 70 °C ist die Schicht mit einem Quellgrad von 2,4 noch stark gequollen. Dagegen ist der Quellgrad im sauren Zitronensäurepuffer insgesamt geringer. Der Kollaps verläuft wie in Reinstwasser in einem Temperaturbereich bis ca. 30 °C. Die pH-Abhängigkeit des Quellgrades ist durch die aus dem MES stammenden Carboxylgruppen erklärbar. Bei hohem pH sind diese deprotoniert und erhöhen damit insgesamt die Hydrophilie der Hydrogelschicht. Bei niedrigem pH liegen die Carboxylgruppen dagegen protoniert vor und machen die Hydrogelschicht insgesamt hydrophober.

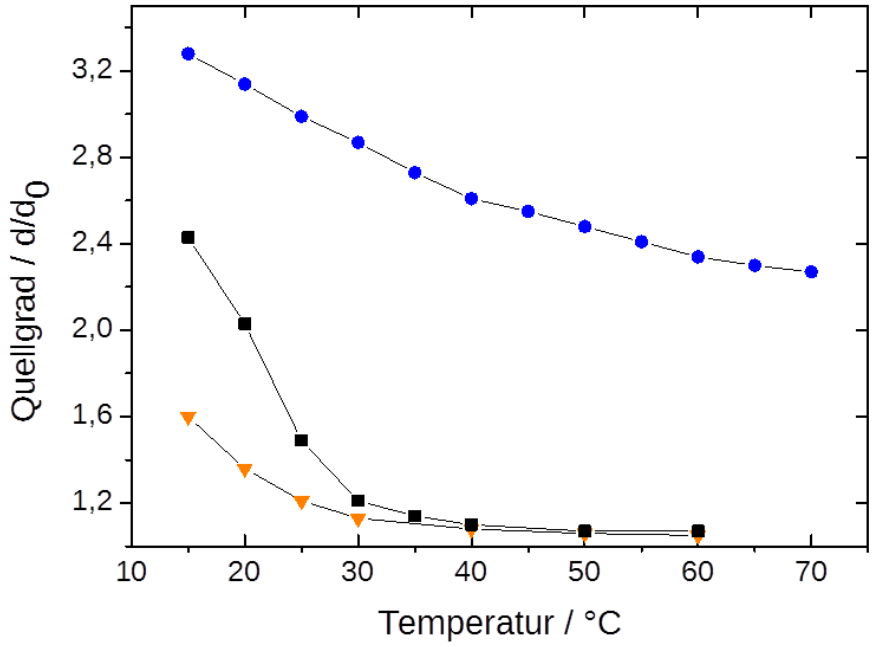


Abbildung 3-15: Quellgrad bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Lösungsmitteln für eine Polymerschicht aus dem Copolymer P(MEO_2MA-co-MES), vernetzt mit 0,5 mol-% Jeffamin® ED 900. (,) Quellgrad in PBS-Puffer, (!) Quellgrad in Reinstwasser, (B) Quellgrad in Zitronensäurepuffer pH 5.

Die pH-Abhängigkeit der Quellkurven zeigt, dass nach der Vernetzungsreaktion noch freie Carboxylgruppen in der Hydrogelschicht vorliegen. Dies ist aus der der Stöchiometrie der eingesetzten Gruppen zu erwarten: Bei einem MES-Anteil von 10 mol-% im Copolymer würden bei quantitativen Umsatz der Amingruppen bei einem Vernetzeranteil von 5 mol-% noch 5 mol-% Carboxylgruppen bezogen auf die Monomerzusammensetzung des Polymers verbleiben, bei einem Vernetzeranteil von 1 % noch 9 mol-% Carboxylgruppen und bei einem Vernetzeranteil von 0,5 % noch 9,5 mol-% Carboxylgruppen. Die verbliebenen Carboxyl-

gruppen können als funktionelle Gruppen eingesetzt werden. Diese der Vernetzungsreaktion inhärente Funktionalisierung der Hydrogelschicht könnte für eine mögliche nachgelagerte Umsetzung mit anderen Gruppen von Vorteil sein.

Wird für die Vernetzung ein größerer Vernetzeranteil eingesetzt, verläuft der Schichtkollaps über einen insgesamt weiteren Temperaturbereich (**Abbildung 3-16**). Bei Temperaturen oberhalb 30 °C ist der Quellgrad sowohl in Reinstwasser als auch in PBS-Puffer für Schichten mit einem höheren Vernetzeranteil größer als für Schichten mit einem geringeren Vernetzeranteil. Dieses Verhalten ist mit der höheren Hydrophilie des Vernetzers Jeffamin erklärbar: Jeffamin ist bei Temperaturen bis 90 °C sowohl in Reinstwasser als auch in NaOH-Lösung mit einem pH-Wert von 12 sehr gut löslich. Wie bereits für die Messungen bei Raumtemperatur beschrieben bindet der Vernetzer dadurch in den vernetzten Polymerschichten mehr Wasser als die Comonomereinheiten. Schichten mit mehr Vernetzereinheiten können daher mehr Wasser binden und stärker quellen.

In PBS-Puffer sind alle Schichten mit unterschiedlichem Vernetzeranteil stärker gequollen als in Reinstwasser. Unter diesen basischen Bedingungen sollten alle Carboxylgruppen deprotoniert vorliegen. Das Löslichkeitsverhalten des Hydrogels wird unter diesen Bedingungen von den geladenen Carboxylgruppen dominiert. Der Quellgrad ist für die Polymerschicht mit 0,5 mol-% Vernetzergehalt am größten und sinkt in der Reihenfolge von 1 mol-% Vernetzergehalt zu 5 mol-% Vernetzergehalt ab. Bei den durch die deprotonierten Carboxylgruppen stärker gequollenen Schichten bestimmt also in Übereinstimmung mit der Flory-Rehner-Theorie der Vernetzergehalt maßgeblich den Quellgrad.

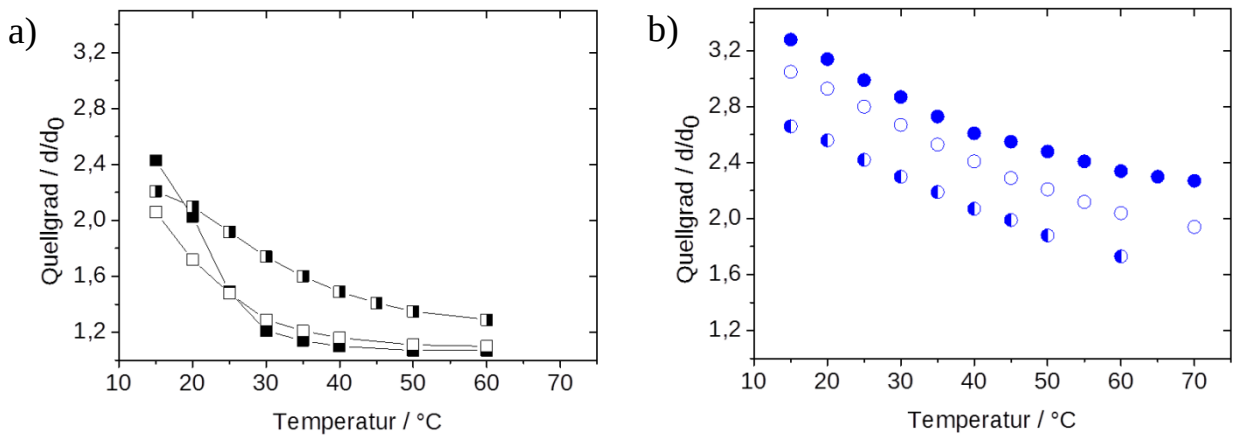


Abbildung 3-16: Polymerschichten mit verschiedenem Vernetzergehalt: Quellgrade bei verschiedenen Temperaturen. **a)** In Reinstwasser (schwarze, quadratische Symbole): (!) 0,5 % Vernetzer, ()) 1 % Vernetzer, (∀) 5 % Vernetzer. **b)** in PBS-Puffer (blaue, runde Symbole): (,) 0,5 % Vernetzer, (.) 1 % Vernetzer, (6) 5 % Vernetzer.

3.2 Thermoresponsive Polymere zur Proteinerkennung

Einige Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass thermoresponsive Polymere für die Analytdetektion generell einsetzbar sind (Kapitel 2.1.1). Das Schalten thermoresponsiver Polymere durch native Proteine wurde allerdings bislang noch nicht berichtet. Im Folgenden wird der Einfluss einer selektiven Proteinbindung auf ein thermoresponsives Polymer dargestellt. Als Affinitätsbindungsmodell wurde das weitverbreitete System aus dem Protein Avidin und dem Bindungspartner Biotin gewählt.[195] Das Glykoprotein Avidin bindet mit sehr hoher Affinität und Spezifität an Biotin. Zur Herstellung des Modellsystems wurde Biotin kovalent mit dem Polymer verknüpft. Erste Versuche zur Anbindung des Biotins über eine polymeranaloge Reaktion waren erfolgreich. Jedoch ist ein quantitativer Umsatz bei polymeranalogen Reaktionen schwer zu erzielen. Da verbleibende funktionelle Gruppen im Copolymer den Phasenübergang des Copolymers beeinträchtigen würden, wurden die Biotingruppen in einem weiteren Versuch über eine Copolymerisation mit biotinhaltigen Monomeren eingeführt.

3.2.1 Synthese und Charakterisierung biotinylierter thermoresponsiver Copolymere

Die biotinhaltigen Monomere Biotinylamidopropylmethacrylamid (BAPMA) bzw. Biotinylamidoethylmethacrylat (BAEMA) wurden in Anlehnung an eine Vorschrift von Narain *et al.* synthetisiert.[196] Dabei wird zunächst aus Biotin mit Dicylclohexylcarbodiimid (DCC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) ein Aktivester gebildet und isoliert. In einer zweiten Stufe wird dann der Aktivester mit 3-Aminopropylmethacrylamid bzw. 2-Aminoethylmethacrylat unter Zuhilfenahme einer Base umgesetzt (**Abbildung 3-17** für Synthese des BAPMA, Synthesevorschrift BAPMA und BAEMA: s. Experimenteller Teil). Die direkte Synthese aus Biotin über die Aktivierung der Carbonsäuregruppe mit DCC / NHS in einer Eintopfreaktion war nicht möglich, die Reaktion zeigte jeweils auch nach mehreren Aktivierungsschritten keinen Umsatz.

Der Einbau der biotinhaltigen Monomere in ein thermoresponsives Copolymer erfolgte über eine ternäre Copolymerisation mit den beiden Monomeren MEO_2MA und $OEGMA_{475}$. Für die Copolymerisation wurde der sehr robuste Weg der freien radikalischen Polymerisation mit thermischer Initiierung über AIBN gewählt. Für den Fall einer ideal azeotropen Copolymerisation lässt sich der Funktionalisierungsgrad des Copolymers leicht über den

molaren Anteil des biotinhaltigen Monomers in der Reaktionsmischung einstellen. In diesem Fall entspricht die Copolymerzusammensetzung über den gesamten Verlauf der Copolymerisation der Zusammensetzung der Reaktionsmischung.

Der Einbau von BAPMA in das ternäre Copolymer wurde mittels ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Dazu wurden die Integrale charakteristischer Signale miteinander verglichen (**Abbildung 3-18**). Charakteristisch für BAPMA sind die Signale der Protonen an den stereogenen Zentren in Nachbarschaft zur Harnstoffgruppe (a und b). Für $OEGMA_{475}$ und MEO_2MA wurden die Signale der α-Ester Protonen (c‘), die α-Ether Protonen aus den Seitenketten (c), sowie die Protonen der Methylgruppen aus den Seitenendgruppen (d) berücksichtigt. Der Anteil von BAPMA im Copolymer wurde über ein Gleichungssystem mit den auflösbaren Integralen aus a, (b+c‘) und (c+d) berechnet. Wie in **Tabelle 3-5** zu sehen entspricht der Anteil jeweils nahezu dem Monomerverhältnis in der Reaktionsmischung.

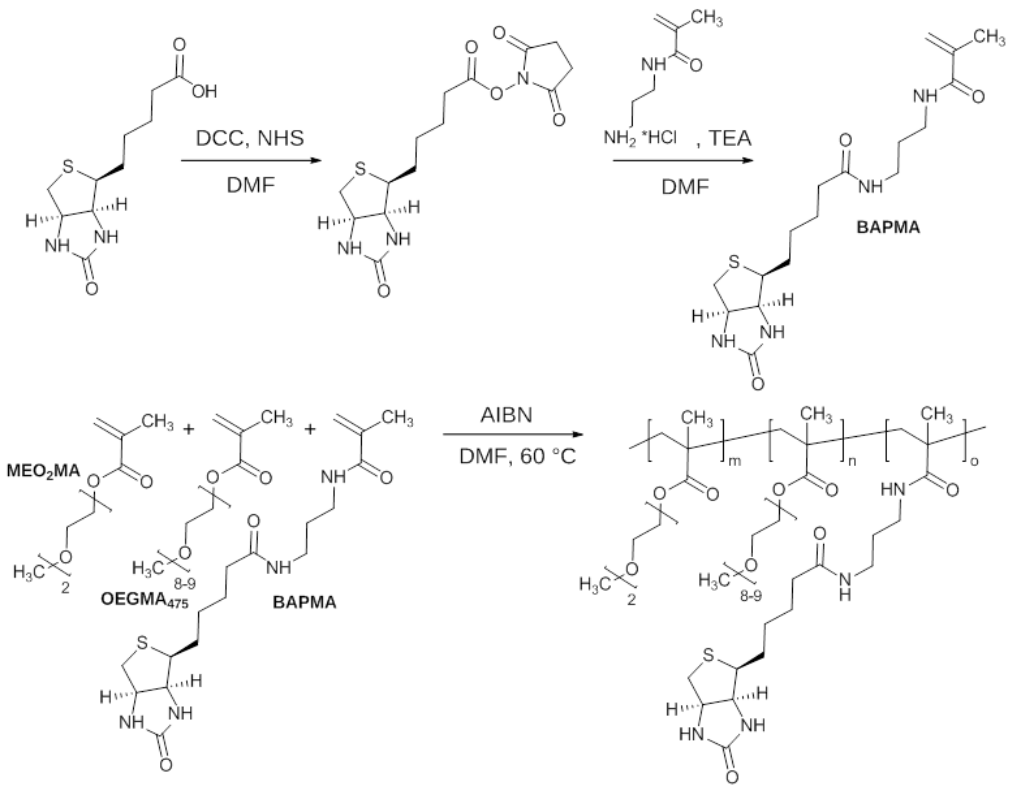


Abbildung 3-17: Schema für die Synthese des Biotinderivats BAPMA (oben) und die ternäre Copolymerisation mit MEO_2MA und $OEGMA_{475}$.

Die Tatsache, dass der Anteil des BAPMA im Copolymer nahezu dem Anteil des Monomers im Monomerfeed entspricht, ist allerdings noch kein Beleg für einen gleichmäßigen Einbau des Monomers in das ternäre Copolymer, da die Umsätze der Polymerisation mit 90 % hoch sind. Die Wiederfindung der Monomeranteile der Reaktionsmischung in der Gesamtheit

der Copolymerketten ist bei diesen Umsätzen zwangsläufig. Die Zusammensetzung der einzelnen Polymerketten kann dennoch inhomogen sein. Voraussetzung für einen homogenen Einbau des Monomers ist vielmehr, dass die Copolymerisationsparameter der Comonomere im Bereich $r_i = 1$ sind, d.h. Bedingungen für eine ideal azeotrope Copolymerisation vorliegen. In diesem Fall entspricht die Copolymerzusammensetzung über den gesamten Verlauf der Copolymerisation der Zusammensetzung der Reaktionsmischung.

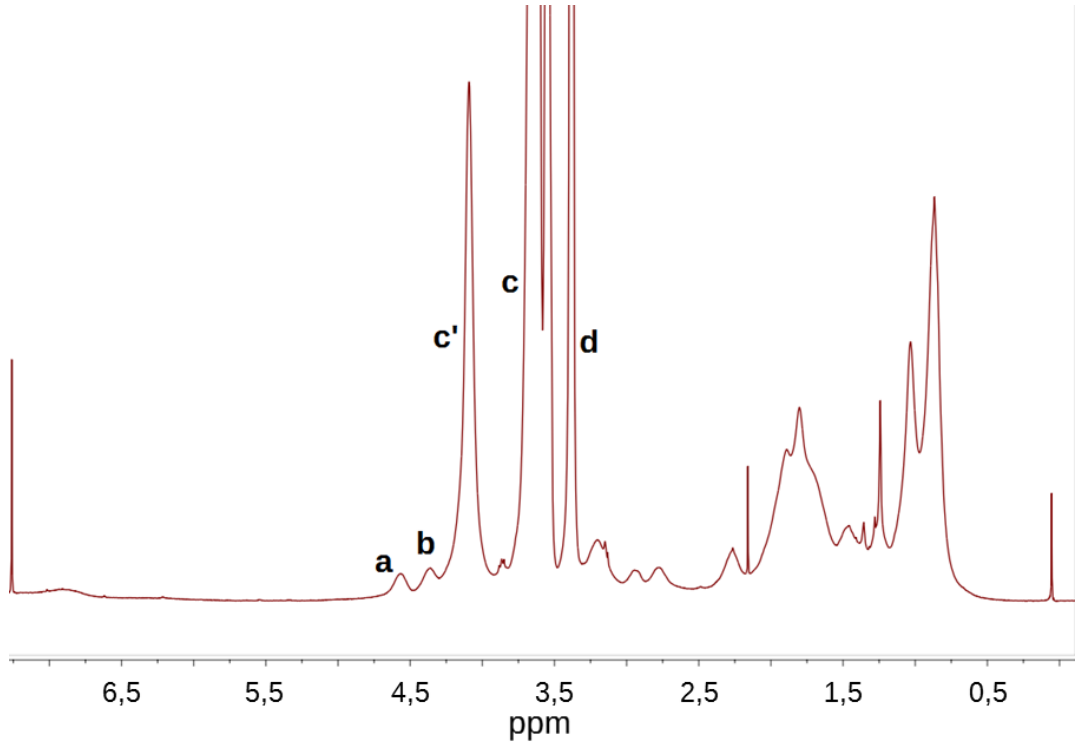


Abbildung 3-18: ^{1}H-NMR-Spektrum eines ternären Copolymers aus BAPMA, MEO_2MA und $OEGMA_{475}$, aufgenommen in $CDCl_3$.

Aufgrund ihrer großen chemischen Ähnlichkeit sollten die Reaktivitäten der beiden Methacrylate MEO_2MA und $OEGMA_{475}$ nahezu gleich sein. Da Methacrylamide im Allgemeinen eine geringere Reaktivität aufweisen als Methacrylate,[197] ist dagegen für das Methacrylamid BAPMA eine etwas geringere Reaktivität zu erwarten. Die Copolymerisations-parameter für die beiden einzelnen binären Systeme aus je einem Methacrylat und dem Methacrylamid geben Aufschluss über den Einbau der verschiedenen Monomere in das Copolymer. Wegen der geringen Löslichkeit von BAPMA können diese allerdings nicht direkt bestimmt werden, da zur korrekten Bestimmung der Copolymerisationsparameter in Copolymerisationsexperimenten auch Copolymere mit einem höheren Anteil an BAPMA hergestellt werden müssten. Die dazu benötigten Monomermischungen sind aber jeweils in allen

getesteten Lösungsmitteln partiell unlöslich (EtOH, H_2O, DMF, Ethylacetat, Toluol, Trifluorethanol, Hexafluoro-2-propanol). Copolymerisationsparameter bestimmt in einem Modelsystem mit dem hydrophilen 2-Hydroxypropylmethacrylamid (HPMA) lassen allerdings Rückschlüsse auf das System mit dem Methacrylamid BAPMA zu. Für MEO_2MA und HPMA werden Copolymerisationsparameter von r_1 und r_2 gleich 1,1 und 0,9 gefunden, für $OEGMA_{475}$ und HPMA sind r_1 und r_2 gleich 1,1 und 0,7. Das Methacrylamid ist also jeweils etwas weniger reaktiv, die Copolymere damit in ihrer Zusammensetzung leicht heterogen. In Analogie dazu sind auch für Copolymere aus dem Methacrylamid BAPMA und den Methacrylaten MEO_2MA oder $OEGMA_{475}$ inhomogene Copolymerketten zu erwarten. Ein verbessertes Copolymerisationsverhalten ist für das Methaycrylat BAEMA zu erwarten. Die Elektronendichte der Doppelbindung sollte hier ähnlich zu denen der anderen Methacrylate MEO_2MA und $OEGMA_{475}$ sein. Neben elektronischen Effekten sind allerdings für dieses Copolymerisationssystem sterische und Mischbarkeitseffekte, die die Reaktivität des BAEMA gegenüber MEO_2MA und $OEGMA_{475}$ beeinflussen, nicht auszuschließen. Von vollkommen homogenen Copolymeren kann also auch bei diesem System nicht zwingend ausgegangen werden. Dies trägt unter Umständen dazu bei, dass die Phasenübergänge, wie in der Trübungskurve sichtbar, sowohl für Copolymere mit dem Methacrylamid BAPMA als auch für solche mit dem Methacrylat BAEMA etwas verbreitert sind (vgl. BAPMA (Bt-4) in **Abbildung 3-20** und BAPMA und BAEMA (Bt-4 und Bt-1-3) in **Tabelle 3-5**).

In Copolymeren aus MEO_2MA und $OEGMA_{475}$ lässt sich die Phasenübergangstemperatur in einem weiten Bereich über das Verhältnis der beiden unterschiedlich hydrophilen Monomere einstellen.[39] Die Trübungstemperaturen der synthetisierten Copolymere OEG-1 und OEG-2 in Reinstwasser stimmen jeweils mit vergleichbaren Copolymeren von Lutz *et al.* überein.[39] Da für die Untersuchung der Wechselwirkung der Polymere mit Proteinen in physiologischen salzhaltigen Puffern gearbeitet werden muss, ist eine einfache Abschätzung der Übergangstemperaturen nach Lutz *et al.* allerdings nicht möglich, da die Übergangstemperatur thermoresponsiver (Co)polymere durch die Art und die Konzentration verschiedener Salze stark beeinflusst wird:[182, 198] demgegenüber sind die Trübungspunkte in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (**Tabelle 3-5**) für OEG-1 mit 8 mol-% $OEGMA_{475}$ um 2,8 °C und für OEG-2 mit 12 mol-% $OEGMA_{475}$ bereits um 4,9 °C niedriger. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit und ohne Proteinzugabe wurden die Trübungspunkte daher ausschließlich in PBS-Puffer aufgenommen.

Werden in das Copolymer Biotineinheiten eingebaut, verschiebt sich der Trübungspunkt mit steigendem Biotinanteil zu tieferen Temperaturen (s. **Tabelle 3-5**). Verglichen mit dem biotinfreien Polymer OEG-1 verschiebt sich der Trübungspunkt bei 3 mol-% BAEMA und gleichem Verhältnis von MEO_2MA zu $OEGMA_{475}$ in Bt-2 beispielsweise schon um 4,8 °C, bei 28,1 mol-% Biotineinheiten in Bt-3 bereits um 8,8 °C. Durch den Einbau des Biotins wird ein MEO_2MA/ $OEGMA_{475}$-Copolymer also insgesamt hydrophober. Die Verschiebung des Trübungspunktes kann allerdings durch den Einbau größerer Mengen des hydrophileren $OEGMA_{475}$ kompensiert werden. Durch geeignete Wahl der Copolymerzusammensetzung lässt sich der Trübungspunkt in einem weiten Bereich einstellen, zum Beispiel auf einen Wert nahe der menschlichen Körpertemperatur bei Polymer Bt-4 (Einsetzen der Trübung bei 37,7 °C).

Tabelle 3-5: Charakterisierung der synthetisierten biotinhaltigen Copolymere

Polymer	BAEMA/ BAPMA in der Reaktions-mischung (mol-%)	BAEMA/ BAPMA im Copolymer (mol-%) [a]	M_n [d] (kg/ mol)	DP_n [e]	MEO_2MA/ $OEGMA_{475}$ in der Reaktions-mischung	TP, bei Einsetzen der Trübung [f] (°C)	TP, bei 50 % Transmission [f] (°C)
OEG-1		-	59	124	92 / 8	32,9	33,5
OEG-2		-	27	119	88/ 12	35,5	36,5
Bt-1	1,0	0,9[b]	29	134	92/:8	31,0	32,3
Bt-2	5,0	3,1[b]	37	172	92/ 8	28,1	29,3
Bt-3	30,0	28,1[b]	36	149	92/ 8	24,1	26,8
Bt-4	18,7 [c]	18,9[c]	27	104	82 /18	37,7	39,1

[a] Berechnet aus ^{1}H-NMR-Spektroskopie. [b] Copolymer mit BAEMA. [c] Copolymer mit BAPMA. [d] Apparentes Zahlenmittel der Molmasse M_n bestimmt über GPC in DMF kalibriert mit Polystyrolstandards. [e] Durchschnitt berechnet aus GPC und Monomerfeed. [f] Alle Trübungsmessungen in PBS.

Die Zugänglichkeit der Biotingruppe für Avidin im Copolymer wurde mithilfe eines Verdrängungsassays basierend auf 4-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure (HABA) getestet. HABA kann ähnlich wie Biotin über nicht-kovalente Wechselwirkungen an Avidin binden, allerdings mit einer deutlich geringeren Affinität.[199] Die Bindung an Avidin stabilisiert dabei die Chinonform des HABA (s. **Abbildung 3-19** Inlay). Dadurch ändert sich die Farbigkeit und eine zusätzliche Absorptionsbande bei 500 nm wird sichtbar. Wird zu dieser Lösung mit HABA-Avidin-Komplex eine biotinylierte Spezies gegeben, so wird das HABA aus der Bindungstasche des Avidin verdrängt und die für den HABA-Avidin-Komplex spezifische Absorptionsbande sinkt proportional zur Menge des zugegebenen biotinylierten Analyten. Über die Differenz der Intensität der Absorptionsbande vor und nach Zugabe des biotinylierten Analyten kann dann bei

bekanntem Extinktionskoeffizienten für den HABA-Avidinkomplex die Menge an verfügbarem Biotin berechnet werden (s. Experimenteller Teil). In einer 0,05 g/ L Lösung eines Copolymers mit 18 mol-% Biotingruppen (bestimmt durch ^{1}H-NMR-Spektroskopie) wurde so die Konzentration an für die Bindung an Avidin verfügbarem Biotin auf 8 µmol/ L berechnet. Das heißt, dass ca. 20 % der vorhandenen Biotingruppen tatsächlich für Avidin zugänglich sind. Weitere Biotingruppen sind vermutlich wegen des im Vergleich zur Größe des Avidins geringen Abstandes zwischen den einzelnen Wiederholungseinheiten sterisch blockiert, sobald Avidin an eine benachbarte Biotineinheit bindet.

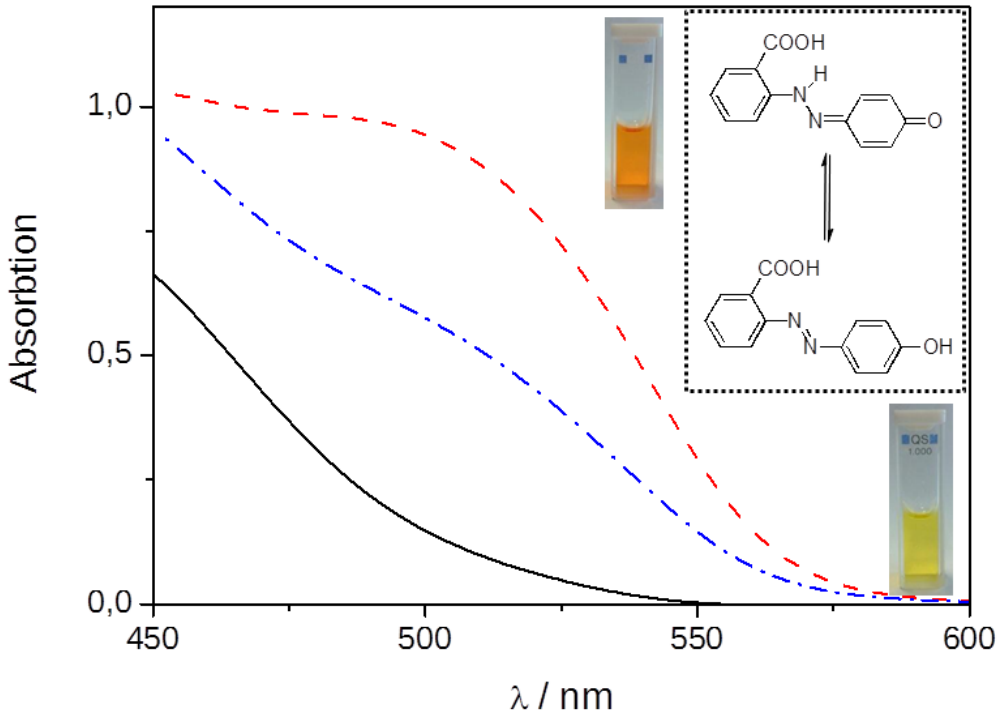


Abbildung 3-19: UV-vis-Spektrum einer HABA-Avidin Lösung vor (- - -) und nach der Zugabe einer 0,05 g/ L Lösung des biotinhaltigen Polymers Bt-4. Die schwarze Linie (—) zeigt das Absorptionsspektrum von reinem HABA.

3.2.2 Einfluss der Avidinbindung auf das Phasenverhalten

Um den Einfluss gebundenen Avidins auf das Lösungsverhalten des biotinhaltigen Copolymers zu untersuchen, wurden gleiche Volumina von Lösungen aus Polymer und Avidin in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gemischt und Trübungskurven aufgenommen (**Abbildung 3-20**). Die Konzentration an Copolymer im Gemisch wurde konstant bei 2 g/ L belassen, die Avidinkonzentration wurde variiert. Deutlich zu sehen ist, dass nach der

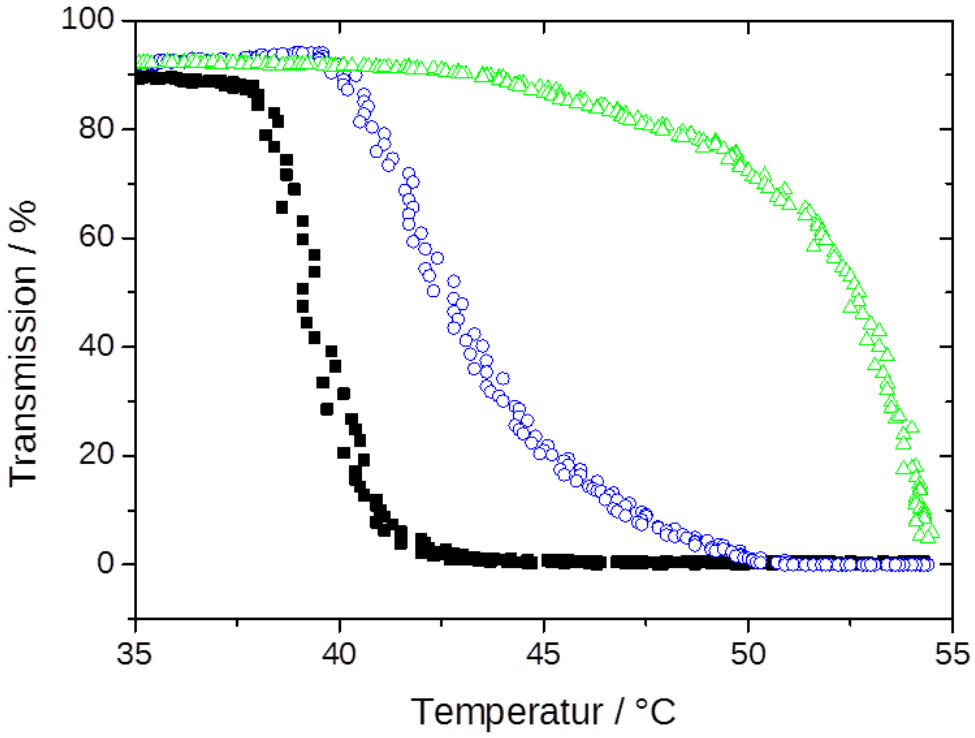


Abbildung 3-20: Trübungskurven des biotinylierten Copolymers Bt-4 ohne Avidin (■), mit 30 µmol/ L Avidin (□) und mit 45 µmol/ L Avidin (Δ). Die Messungen erfolgten in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS).

Avidinzugabe der Phasenübergang etwas breiter wird. Mit steigender Avidinkonzentration verschiebt sich der Trübungspunkt außerdem zu höheren Temperaturen. Die größte Verschiebung des Trübungspunktes wurde für eine Avidinkonzentration von 45 µmol/ L gemessen. Der Trübungspunkt bei 50 % Intensität liegt hier unter dem Einfluss von Avidin um 13,7 °C höher als bei dem reinen Copolymer. Die Verschiebung des Trübungspunktes zu höheren Temperaturen impliziert, dass der Avidin-Polymer-Komplex hydrophiler ist als das reine Copolymer. Dies steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass Avidin ein sehr gut wasserlösliches Protein ist.

Die Abhängigkeit dieses Ansprechverhaltens auf Avidin von der eingesetzten Polymerkonzentration ist in **Abbildung 3-21a** dargestellt. Die Avidinkonzentration liegt für alle Lösungen konstant bei 15 µmol/ L. In der Reihe von 2,0 g/ L über 1,0 g/ L zu 0,5 g/ L Copolymerlösung steigt die Differenz der Trübungspunkte für die Lösungen mit und ohne Avidin an. Anscheinend ist das Verhältnis Polymer zu Avidin ausschlaggebend für die „Hydrophilisierung“ des Copolymers.

Inwieweit das Ansprechverhalten vom Funktionalisierungsgrad der Polymere abhängig ist, wurde mit den Copolymeren Bt-1, Bt-2 und Bt-4 untersucht. In **Abbildung 3-21b** ist die Verschiebung der Trübungspunkte für die verschiedenen Copolymere nach Zugabe von

15 µmol/ L Avidin dargestellt. Je größer der Biotinanteil im Copolymer ist, desto größer ist der Einfluss des Avidin auf die Lage der Trübungspunkte. Die Verschiebung der Phasenübergangstemperatur ist also auch von der Funktionalisierungsdichte des Copolymers abhängig.

Dieser „hydrophile Effekt“ steht scheinbar im direkten Widerspruch zu Untersuchungen von Colonne *et al.*.[200] Sie beobachteten für biotinylierte Mikrogele bestehend aus *N*,*N*-Diethylacrylamid und 2-Hydroxyethylmethacrylat bei der Wechselwirkung mit Avidin eine Schrumpfung der Hydrogelpartikel. Die Ergebnisse der Trübungsmessungen der vorliegenden Arbeit legen jedoch nahe, dass die beobachtete Schrumpfung auf eine zusätzliche Vernetzung durch das tetravalente Avidins zurückzuführen ist, anstatt auf eine Veränderung der Löslichkeit des Gesamtsystems wie von Colonne *et al.* postuliert. Tatsächlich vernetzen auch Polymerlösungen aus dem linearen biotinylierten Copolymer Bt-4, wenn die Avidinkonzentration im System 45 µmol/ L überschreitet. Das gleiche Phänomen lässt sich auch

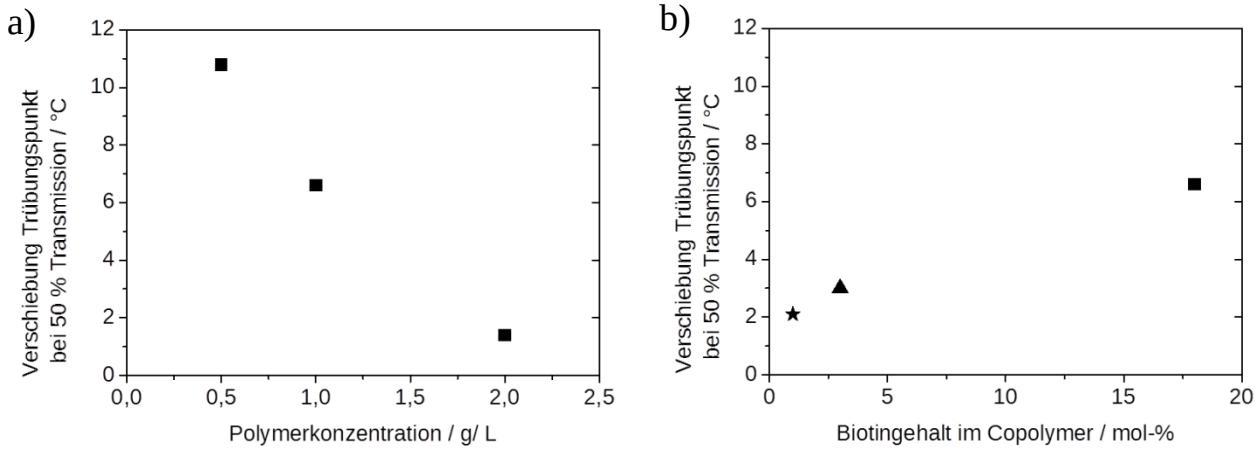


Abbildung 3-21: Verschiebung des Trübungspunktes bei 50 % Transmission für biotinhaltige Copolymere unter dem Einfluss von Avidin. Die Avidinkonzentration beträgt jeweils 1 g/ L. **a)** Variation der Polymerkonzentration des Copolymers Bt-4 **b)** Variation des Biotingehalts im Copolymer (ξ Bt-1, 7 Bt-2, ! Bt-4).

bei geringeren Avidinkonzentrationen beobachten, wenn die eingesetzte Polymerkonzentration entsprechend verringert wird. Andersherum fällt Polymer auch aus, wenn hohe Polymerkonzentrationen über 3 g/ L eingesetzt werden. Das gebildete Präzipitat lässt sich anschließend bei Verdünnen auch nicht mehr durch Heizen oder Kühlen auflösen. Bei geringeren Avidinkonzentrationen entsteht der flockige weisse Niederschlag gleichfalls nach dem Erwärmen über den Phasenübergang hinaus. Anscheinend ist die Vernetzung im kollabierten Zustand effektiver, da sich die verschiedenen Polymerketten in deutlich geringerem Abstand zueinander befinden.

Das tetravalente Avidin wirkt nicht als Vernetzer, wenn es vor der Zugabe zum biotinylierten Polymer mit dem Dreifachen der molar äquivalenten Menge Biotin weitgehend abgesättigt wird. Im Mittel ist dann nur noch eine Bindungstasche des Avidins unbesetzt, das Avidin ist 0,75-fach gesättigt. Die Auswirkungen der Zugabe dieses vorbehandelten Avidins sind in **Abbildung 3-22** zu sehen. Wie im Falle des unvorbehandelten Avidins verschiebt sich der Trübungspunkt zu höheren Temperaturen. Im Vergleich zum unvorbehandelten Avidin kann deutlich mehr Avidin zu der Copolymerlösung gegeben werden, ohne dass diese vernetzt. Oberhalb 130 µmol/ L fällt bereits bei Raumtemperatur weißes Präzipitat aus der Lösung aus. Vergleicht man die eingesetzten Konzentrationen, fällt auf, dass die Verschiebung deutlich weniger stark ausfällt als bei unbehandeltem Avidin. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das Avidin-Biotin-Addukt eine geringere Hydrophilie als das reine Avidin besitzt. Möglich ist auch, dass nicht alles Avidin für die Bindung an das Copolymer zur Verfügung steht. Da die Bindung des Biotins an Avidin eine Gleichgewichtsreaktion ist, befindet sich neben dem statistisch im Mittel erwarteten dreifach gesättigten Avidin auch vollständig abgesättigtes Avidin in der Lösung.

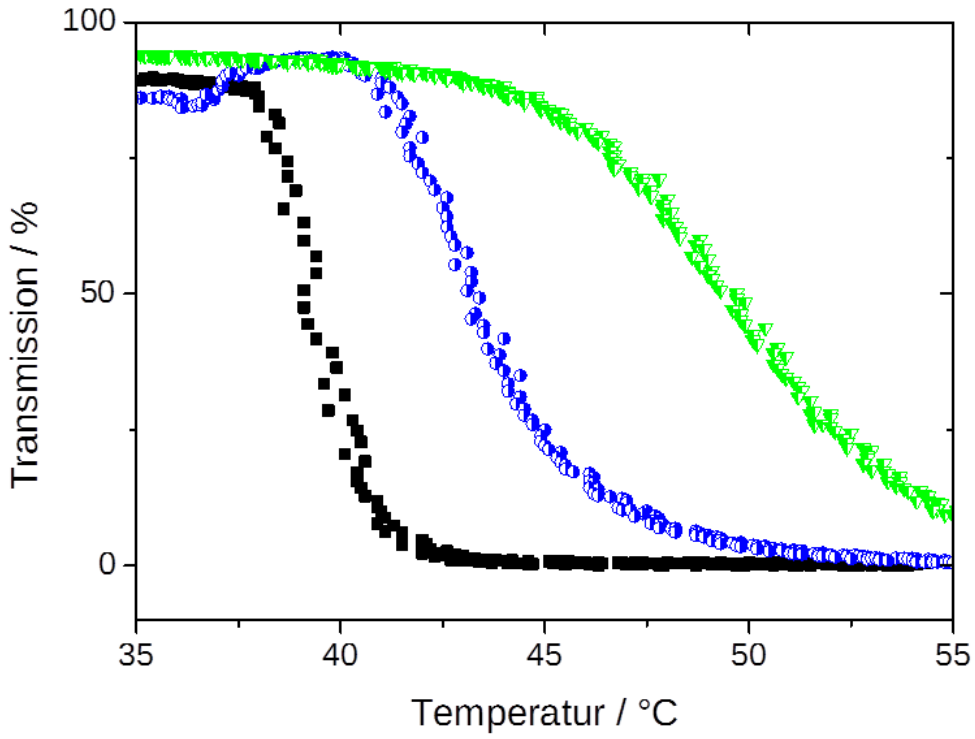


Abbildung 3-22: Trübungskurven des biotinhaltigen Copolymers Bt-4 mit verschiedenen Mengen potentiell vorgesättigtem Avidin. Vor der Zugabe des Avidins zu der Polymerlösung wurde die dreifach molare Menge Biotin zugegeben: (!) 0 µmol/ L Avidin, (4) 65 µmol/ L Avidin vorbehandelt mit 195 µmol/ L Biotin, (K) 130 µmol/ L Avidin vorbehandelt mit 390 µmol/ L Biotin.

Kompetitive Verdrängung

Der Trübungspunkt des Polymer-Avidin-Addukts verschiebt sich nach der Zugabe eines Überschusses freien Biotins zu tieferen Temperaturen. Bei Copolymer Bt-4 (TP_{50} = 39,1 °C) steigt der Trübungspunkt in Anwesenheit von 45 µmol/ L Avidin auf 52,8 °C. Bei der Zugabe von Biotin im 10-fachen molaren Überschuss zu der Lösung, geht der Trübungspunkt zurück zu 40,7 °C, liegt also dennoch etwas oberhalb des Trübungspunktes des reinen Copolymers. Ebenso lässt sich bereits ausgefallenes Präzipitat aus einer Polymer-Avidin-Mischung durch eine Zugabe eines Überschusses Biotin wieder auflösen. Das polymergebundene Biotin scheint also kompetitiv durch das freie Biotin verdrängt zu werden. Die Verschiebung des Trübungspunktes ist nicht vollständig reversibel. da das Avidin mit der Zugabe des Biotins nicht aus dem System entfernt wird und die Bindung an das Avidin stets nur eine Gleichgewichtsreaktion ist.

Die Avidin-Biotin-Bindung ist die stärkste bekannte natürlich vorkommende nicht-kovalente Bindung und wird in der Literatur häufig als nahezu irreversibel beschrieben.[201, 202] Das polymergebundene Biotin ist allerdings über die Carboxylgruppe an das Polymer verknüpft. Da die Carboxylgruppe zur Bindung an Avidin beiträgt,[203] sollte die Bindungskonstante für das polymergebundene Biotin etwas schwächer sein, als die des freien Biotins. Zusätzlich bilden die Oligoethylenglykolseitenketten eine sterisch anspruchsvolle Umgebung, die dazu beitragen kann, dass die Bindungsstärke im Polymer-Avidin-Addukt herabgesetzt wird.

3.2.3 Kontrollversuche – Spezifität

Um die Spezifität der Löslichkeitsveränderung durch Avidin zu verifizieren, wurden einige Kontrollexperimente durchgeführt. Zunächst wurden Trübungskurven für das biotinfreie Copolymer OEG-2 in Anwesenheit von Avidin aufgenommen. Die experimentellen Bedingungen entsprachen dabei genau denen für die Messungen mit biotinylierten Copolymeren. Der Trübungspunkt blieb selbst bei hohen Avidinkonzentrationen von bis zu 90 µmol/ L unverändert (**Abbildung 3-23a**). Das zeigt, dass die Verschiebung des Trübungspunktes auf eine Wechselwirkung des Avidin mit den Biotingruppen im Copolymer zurückzuführen ist. Um unspezifische Wechselwirkungen mit den Biotingruppen auszuschließen, wurde in einem weiteren Kontrollexperiment das Löslichkeitsverhalten des biotinylierten Copolymers Bt-4 unter Einfluss des Proteins Rinderalbumin (englisch: *bovine serum albumine*, BSA) untersucht. BSA ist wie Avidin ein sehr gut wasserlösliches Protein, besitzt eine ähnliche Molmasse

(M_n = 66.000 g/ mol) und ist für sein hohes Potential für unspezifische Wechselwirkungen bekannt.[71, 204, 205] Selbst nach der Zugabe hoher Konzentrationen BSA verschob sich der Trübungspunkt für das biotinylierte Copolymer Bt-4 nicht (**Abbildung 3-23b**). Die Eigenschaftsänderung im biotinhaltigen Copolymer wird also allein durch die spezifische Analytbindung verursacht.

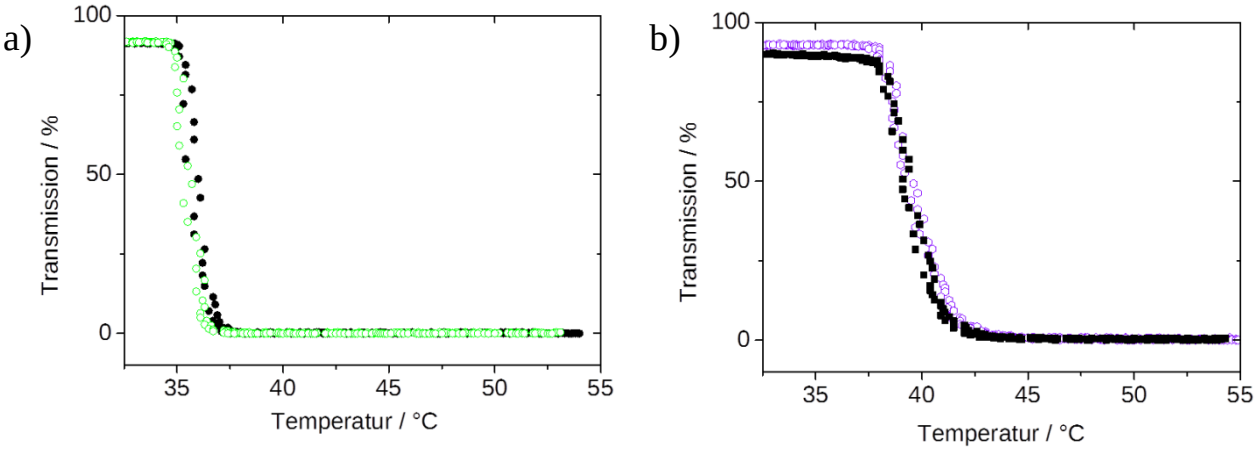


Abbildung 3-23: Kontrollversuche zur Spezifität des Einflusses von Avidin auf thermoreponsive biotinylierte Copolymere. **a)** Trübungskurve eines binären Copolymers aus MEO_2MA und $OEGMA_{475}$ (OEG-2) ohne Avidin (●) und mit 90 µmol/ L Avidin (○). **b)** Trübungskurve des biotinhaltigen Copolymers Bt-4 allein (■) und des Copolymers in Gegenwart von 120 µmol/ L BSA (○).

Ganz ausgeschlossen werden können unspezifische Wechselwirkungen allerdings nicht: In einer Trübungsmessung für das biotinylierte Copolymere Bt-4 mit dem Protein Fibrinogen ändert sich der Trübungspunkt bei einer Proteinkonzentration von 6 g/ L um 3 °C (hier nicht gezeigt). Fibrinogen ist als Gerinnungsfaktor eines der am stärksten unspezifisch bindenden Proteine. Vor diesem Hintergrund ist es interessant zu bemerken, dass sich das Löslichkeitsverhalten bei der Zugabe zum unfunktionalisierten Copolymer OEG-2 nicht ändert. Dies zeigt auf der einen Seite die hervorragenden *antifouling*-Eigenschaften des Basispolymers, auf der anderen Seite aber auch die Notwendigkeit, je nach Variation des Basissystems beim Einbau verschiedener funktioneller Gruppen die unspezifischen Wechselwirkungen genau zu untersuchen. Im vorliegenden Fall treten offenbar unspezifische Wechselwirkungen zwischen Fibrinogen und den Biotineinheiten auf.

3.3 Dünne Hydrogelschichten für die Proteinerkennung

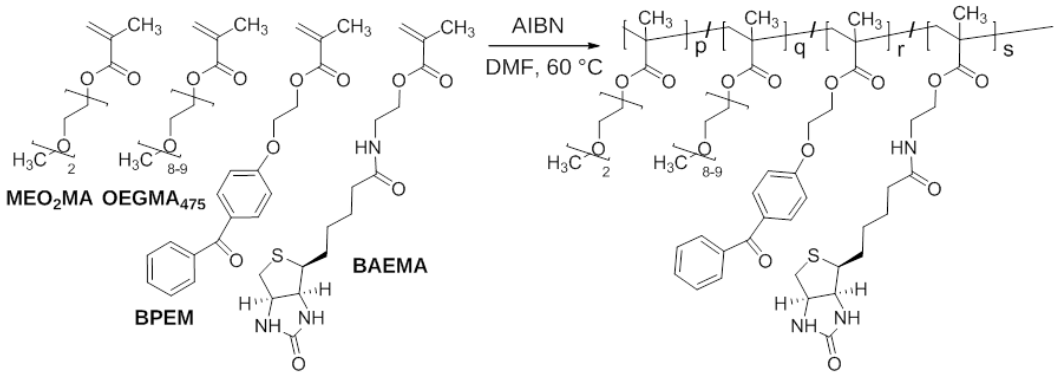


Abbildung 3-24: Schema der Synthese von quarternären thermoresponsiven, photovernetzbaren Copolymeren mit Biotingruppen.

Nach den grundsätzlichen Experimenten zur Wechselwirkung des Proteins Avidin mit biotinhaltigen thermoresponsiven Copolymeren in Lösung (Kapitel 3.2) wurde in einem nächsten Schritt der Effekt einer selektiven Bindung des Testproteins an eine dünne Hydrogelschicht untersucht. Dazu wurden biotinhaltige Copolymere auf Oberflächen immobilisiert. Für die Anbindung und Vernetzung der Copolymere wurde auf die Ergebnisse aus Kapitel 3.1 zurückgegriffen. Neben dem biotinhaltigen Monomer BAEMA und den thermoresponsiven Basismonomeren MEO_2MA und $OEGMA_{475}$ wurde daher das Photovernetzermonomer BPEM in ein quarternäres Copolymer eingebaut (**Abbildung 3-24**). Um eine hohe Maschenweite nach der Quervernetzung zu erreichen, wurden Copolymere mit Vernetzeranteilen von 0,5 mol-% und 0,1 mol-% synthetisiert (quarternäre Copolymere Q-5 und Q-1, **Tabelle 3-6**). Der Anteil des Biotinmonomers BAEMA betrug jeweils 5 mol-% im Monomerfeed. Das Verhältnis von MEO_2MA zu $OEGMA_{475}$ wurde mit 9:1 so gewählt, dass Übergangstemperaturen in einem gut messbaren Temperaturbereich zu erwarten waren. Die Synthese erfolgte wie in den vorangegangenen Kapiteln mittels freier radikalischer Copolymerisation. Der Polymerisationsgrad wurde möglichst hoch eingestellt um die Copolymere möglichst effektiv zu vernetzen. Um bei einer frei radikalischen Copolymerisation hohe Polymerisationsgrade zu erreichen muss die Monomerkonzentration in der Reaktionsmischung möglichst groß sein. Bei hohen Konzentrationen ist das Biotinmonomer BAEMA allerdings nicht mehr vollständig löslich. Um dennoch sowohl den Polymerisationsgrad als auch den Anteil des BAEMAs zu maximieren, wurde die Reaktionsmischung zu Beginn der Polymerisation inhomogen belassen. Auf diese Weise kann zunächst ungelöstes BAEMA mit fortschreitender Polymerisation in der Reaktionsmischung gelöst werden. Die Copolymerzusammensetzung wird bei dieser

Reaktionsführung vermutlich etwas inhomogener, dafür wird mit diesem Kompromiss der Polymerisationsgrad und der Anteil BAEMA im Copolymer maximiert. Die Analyse der Copolymerzusammensetzung erfolgte mittels NMR, die Molmassenanalyse mittels GPC (**Tabelle 3-6**). Aus dem Anteil des BPEM im Copolymer und dem Polymerisationsgrad wird die Zahl der Photovernetzergruppen pro Kette berechnet. Trotz des geringen Photovernetzergehaltes in Copolymer Q-1 beträgt sie wegen des erhöhten Polymerisationsgrades noch 0,6 pro Kette. Für das Copolymer Q-5 3 pro Kette. Da der Wert bei Q-1 unterhalb 1 liegt, ist davon auszugehen, dass nach der Photovernetzung von dünnen Filmen aus Q-1 unvernetzte Polymerketten zurückbleiben. Der Materialverlust beim Auslaugen der Hydrogelschicht kann allerdings berücksichtigt und kompensiert werden. Der geringe Anteil des BAEMA im Copolymer im Vergleich zur Reaktionsmischung ist auf die ungelösten Anteile des Monomers in der Reaktionslösung zurückzuführen.

Tabelle 3-6: Charakterisierung der quarternären, photovernetzbaren Copolymere

Polymer	MEO_2MA/ $OEGMA_{475}$ eingebaut im Copolymer[a] (mol-%)	BAEMA im Monomer-feed (mol-%)	BAEMA eingebaut im Copolymer[a] (mol-%)	BPEM eingebaut im Copolymer[a] (mol-%)	M_n [b] (kg/mol)	DP_n [c]	Trübungs-punkt[d] (°C)
Q-1	90:10	5	2	0,1	134	580	31,3
Q-5	90:10	5	2	0,5	130	580	33,3

[a] Berechnet aus ^{1}H-NMR Spektroskopie. [b] Apparentes Zahlenmittel der Momasse M_n bestimmt über GPC in DMF kalibriert mit Polystyrolstandards. [c] Durchschnitt berechnet aus NMR und GPC. [d] Trübungspunkt in PBS-Puffer bei 50 % Transmission.

3.3.1 Untersuchungen zur Permeabilität der Hydrogelschichten mittels Oberflächenplasmonenresonanz

Oberflächenplasmonenresonanzmessungen werden meist auf speziellen, mit einer dünnen Goldschicht beschichteten Chips durchgeführt. Auf diesen muss das Hydrogel für die Messung immobilisiert werden. Das Standardverfahren für die Immobilisierung des Copolymers auf Siliziumwafern wurde daher an die Goldoberfläche angepasst. Als organische Haftvermittlerschicht wurde das Thiol Cysteamin auf der Goldoberfläche immobilisiert. Da Cysteamin wie das analog für die Silziumwafer verwendete 3-Aminopropyldimethylsilan (APDMSi) eine primäre Aminogruppe trägt, sollte es ähnlich wie das Silan eine H-Abstraktion

bei der Photovernetzung mit dem Copolymer begünstigen. Auf die organische Schicht aus dem Cysteamin wurde anschließend das Copolymer mittels Rotationsbeschichtung aufgetragen. Da die absolute Schichtdicke der Copolymerschicht nicht über Oberflächenplasmonenresonanz zu bestimmen ist, sondern nur die Schichtdickenänderung, wurden Siliziumwafer als Referenzproben wie die Goldchips präpariert und die Schichtdicke auf den Siliziumwafern mittels ellipsometrischen Messungen bestimmt. Die Trockenschichtdicke der Referenzschicht nach Rotationsbeschichtung, Photovernetzung und Waschprozess wurde so auf ca. 100 nm eingestellt.

Die Messung der Oberflächenplasmonenresonanz erfolgte in einer Flusszelle unter konstantem Volumenstrom von 50 µL/ min einer PBS-Pufferlösung bei 25 °C. Vor Beginn der Messung wurde sichergestellt, dass ein stabiles Oberflächenplasmonenresonanzsignal erhalten wurde. Bei Injektion einer BSA-Lösung (60 µmol/ L in PBS-Puffer) in die Flusszelle verschiebt sich das SPR-Signal bei beiden mit den unterschiedlichen Copolymeren beschichteten Chips um jeweils ca. 4000 µRIU (RIU, Brechungsindexeinheiten, engl.: *refractive index unit*). Das Signal der beiden Sensorgramme geht allerdings nach dem Spülen mit PBS-Puffer wieder auf die Basislinie zurück, was dafür spricht, dass keine unspezifische Adsorption des Proteins BSA

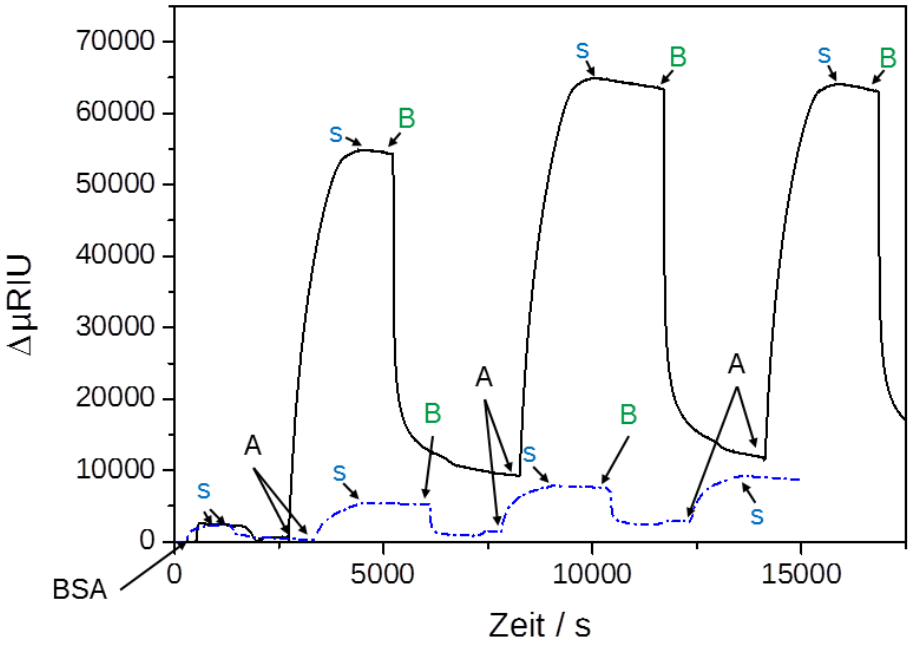


Abbildung 3-25: Sensorgramme von Hydrogelschichten aus Q-1 (─) und aus Q-5 (┄). Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der unterschiedlichen Immobilisierungsschritte. BSA: Injektion einer Lösung aus BSA in PBS-Puffer (60 µmol/ L). s: Spülen mit PBS-Puffer. A: Injektion von 1 mL einer Lösung von Avidin in PBS (1,5 µmol/ L). B: Injektion von 1 mL einer Biotinlösung in PBS-Puffer (0,8 mmol/ L).

stattfindet (**Abbildung 3-25**). Nach dem Spülvorgang wurde eine Lösung von 1,5 µmol/ L Avidin in PBS injiziert. Bei der Copolymerschicht aus Q-1, mit geringem Vernetzeranteil verschiebt sich das Minimum der Oberflächenplasmonenresonanz um 55000 µRIU. Bei der Copolymerschicht aus Q-5 mit höherem Vernetzeranteil verschiebt sich das Minimum der Oberflächenplasmonenresonanz bei der Zugabe der Avidinlösung dagegen nur um 5500 µRIU. Beim Sensorgramm der Hydrogelschicht aus dem niedriger vernetzten Q-1 ist nach der Avidinzugabe beim Spülen der Messzelle eine leichte Drift zu erkennen. Im Vergleich zur Signalstärke ist diese Drift allerdings gering. Das Avidin scheint also in beiden Fällen an die Biotingruppen des Copolymers gebunden zu sein und an der Hydrogelschicht zu verbleiben. Nach der Zugabe einer 0,8 mmol/ L Biotinlösung in PBS-Puffer sinken die SPR-Signale für beide Hydrogelschichten deutlich. Jedoch bleibt das Signal sowohl bei der Copolymerschicht aus Q-1 als auch bei der aus Q-5 nach der Biotinzugabe oberhalb der Basislinie. Das freie Biotin verdrängt offensichtlich die an das Hydrogel gebundenen Biotingruppen kompetitiv vom Avidin, dabei wird allerdings nicht das gesamte gebundene Avidin von der Hydrogelschicht entfernt. Der verbleibende Rest Avidin ist für das erhöhte Signal nach dem Spülvorgang verantwortlich. Der Immobilisierungsschritt kann nach der Zugabe der Biotinlösung wiederholt werden. Das SPR-Signal steigt bei einer erneuten Injektion der Avidinlösung bei beiden Hydrogelschichten auf einen höheren Wert als beim ersten Immobilisierungsschritt. Erst bei einem dritten Immobilisierungsschritt ändert sich das Signal nicht weiter. Bei diesem Schritt wird vermutlich eine Absättigung der vorhandenen Biotingruppen mit Avidin erreicht.

Die Änderung des SPR-Signals ist grundsätzlich direkt proportional zur Masse des angebundenen Proteins.[206] Voraussetzung dafür ist, dass die Anbindung des Proteins innerhalb der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes erfolgt (typischerweise einige hundert Nanometer). Ein absoluter Wert für die Massenbelegung mit Proteinen kann nicht direkt aus den Brechungsindexeinheiten berechnet werden ohne die genauen optischen Eigenschaften der Schichten zu kennen.[207] Da sowohl die Schichtdicke als auch der genaue Brechungsindex der auf dem Goldchip immobilisierten biotinylierten Hydrogelschicht nicht bekannt sind, ist die Berechnung eines absoluten Wertes für die Massebelegung mit Avidin nicht möglich, allerdings kann das Verhältnis der verschiedenen Massenbelegungen berechnet werden. Demnach bindet die Hydrogelschicht aus Q-1 sechsmal so viel Avidin wie die Hydrogelschicht aus Q-0,5. Bei der Bewertung dieses verhältnisses muss berücksichtigt werden, dass die Schichtdicken der gequollenen Hydrogelschichten auf dem Goldchip nicht bestimmt werden können. Daher ist nicht sicher ob die Anbindung des Avidins vollständig innerhalb der Eindringtiefe des

evaneszenten Feldes erfolgt. Allerdings würde eine Anbindung ausschließlich am Rand der Eindringtiefe die Bindekapazität der vermutlich höher gequollenen Hydrogelschicht aus Q-1 eher unterschätzen als die der vermutlich weniger stark gequollenen Hydrogelschicht aus Q-5. Der Unterschied in der Bindekapazität zwischen den beiden Hydrogelschichten bleibt also auch unter Berücksichtigung einer eventuellen Ausdehnung der Hydrogelfilme über das evaneszente Feld hinaus bestehen. Da der Anteil an Biotin in den Hydrogelschichten bei beiden Copolymeren gleich ist, ist die höhere Bindekapazität der Hydrogelschicht aus Q-1 nur damit zu erklären, dass dem Avidin ein größeres Volumen zur Bindung zur Verfügung steht. Bei der Hydrogelschicht aus Q-1 dringt Avidin weit in das Polymernetzwerk ein. Damit dies möglich ist, muss die Maschenweite des Netzwerkes größer sein als der Durchmesser des Avidin. Bei der höher vernetzten Hydrogelschicht aus Q-5 bindet das Avidin dagegen wahrscheinlich hauptsächlich an der Oberfläche der Hydrogelschicht und kann nicht sehr weit in die Schicht eindringen. Die Maschenweite reicht scheinbar für die Diffusion des Avidins in das Innere der Schicht nicht aus. Die Permeabilität des Hydrogels kann also indirekt über die Bindekapazität abgeschätzt werden. Dabei wirkt das Avidin als Größensonde für die Maschenweite des Hydrogels.

3.3.2 Untersuchungen zum Einfluss der Proteinbindung auf die Quellbarkeit der Hydrogelschichten mittels Ellipsometrie

Für eine Untersuchung der Wechselwirkung biotinhaltiger Hydrogelschichten mit Avidin wurden Siliziumwafer wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben mit APDMSi silanisiert und Copolymerschichten aus Q-1 bzw. Q-5 mittels Rotationsbeschichtung auf die Wafer aufgetragen. Die Beschichtungsparameter wurden so gewählt, dass sich Schichtdicken von 100 nm (ellipsometrisch vermessen) ergaben. Nach Vernetzung der Hydrogelschichten mit UV-Licht wurden die Schichtdicken der gequollenen Hydrogele in PBS-Puffer bei verschiedenen Temperaturen in einer Flusszelle mittels Ellipsometrie bestimmt. Der Quellgrad wurde aus der Schichtdicke im gequollenen Zustand und der Trockenschichtdicke berechnet (**Formel 2-4**).

Die Quellfähigkeiten der Hydrogelschichten unterscheiden sich bei verschiedenen Vernetzeranteilen (**Abbildung 3-26**): Die Hydrogelschicht aus Copolymer Q-1, mit niedrigerem Vernetzeranteil, weist einen deutlich höheren maximalen Quellgrad auf als die Hydrogelschicht aus Copolymer Q-5 mit höherem Vernetzeranteil. Die Kollapskurve der Hydrogelschicht aus Q-1 verläuft wegen der stärkeren Quellung steiler als die Kollapskurve der Hydrogelschicht aus Q-5. Die Lage der beiden Kollapskurven ist jedoch ähnlich. Dies ist auf die ähnlichen Trübungstemperaturen der unvernetzten Copolymere zurückzuführen. Ab Beginn der Messung bei 15 °C nimmt bei beiden Hydrogelschichten der Quellgrad beim Heizen ab und nähert sich bei hohen Temperaturen ab 45 °C einem Quellgrad von 1. Bei der Hydrogelschicht aus Q-1 beträgt der Quellgrad bei 60 °C beispielsweise noch 1,1, bei der Hydrogelschicht aus Q-5 beträgt der Quellgrad bei 60 °C noch 1,4. Die stärker vernetzte Hydrogelschicht scheint also bei höheren Temperaturen mehr Wasser zu binden als die weniger vernetzte Hydrogelschicht. Wie bei den photovernetzten Copolymerfilmen ohne Biotin (Kapitel 3.1.1) beginnt der Kollaps der biotinylierten Hydrogelfilme bereits bei Temperaturen unterhalb- und endet bei Temperaturen oberhalb der Trübungspunkte der Copolymerlösungen. Wie bei anderen photovernetzten Copolymerfilmen aus OEG-Copolymeren korreliert die Lage der Kollapskurve der immobilisierten Copolymere mit den Trübungstemperaturen der gelösten Copolymere. Ein Vergleich mit anderen OEG-Copolymeren zeigt: Die Kollapskurve des immobilisierten T-1 (niedrigerer Trübungspunkt) verläuft bei niedrigeren Temperaturen, die Kollapskurve des immobilisierten T-3 (höherer Trübungspunkt) verläuft bei höheren Temperaturen (vgl. Copolymer T-1 und Copolymer T-3, **Abbildung 3-8**, S.44). Die Kollapstemperatur der biotinylierten Copolymerfilme lässt sich also über die Copolymerzusammensetzung einstellen.

Das Konzept den Einbau des eher hydrophoben Biotins durch den Einbau von hydrophilerem $OEGMA_{475}$ zu kompensieren, ist in den Hydrogelschichten gültig.

Wechselwirkung mit Avidin

Die Wechselwirkung der gequollenen biotinylierten Hydrogelschicht mit Avidin wurde in der bereits zuvor für die Quellversuche verwendeten Flusszelle untersucht. Dazu wurde nach dem Durchlaufen eines Heizzyklus in PBS-Puffer vor dem Start eines weiteren Heizzyklus bei 15 °C eine Avidinlösung (1,5 µmol/ L in PBS) in die Flusszelle injiziert. Bei der leichter vernetzten Hydrogelschicht aus Q-1 nimmt der Quellgrad daraufhin deutlich von 11,7 auf 6,5 ab. Bei der engmaschiger vernetzten Hydrogelschicht aus Q-5 steigt dagegen der Quellgrad bei 15 °C nach der Avidinzugabe leicht von 3,0 auf 3,1 an. Die Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten ergibt sich aus der unterschiedlichen Maschenweite und der damit verbundenen unterschiedlichen Permeabilität der Hydrogelschichten. Die Maschenweite beträgt im weniger vernetzten Hydrogel bei 15 °C nach **Formel 3-3** 29 nm, im stärker vernetzten Hydrogel dagegen bei 15 °C nur 8 nm. Die Diffusion des 5,6 nm großen Avidins[164] ist im stärker vernetzten Hydrogel stark eingeschränkt, da vermutlich die OEG-Seitenketten eine Penetration des Netzwerkes zusätzlich erschweren. Bei der leichter vernetzten Hydrogelschicht kann das Avidin dagegen in die Schicht eindringen und innerhalb der Hydrogelschicht an weitere Biotingruppen binden. Grundsätzlich kann das tetravalente Avidin 4 Biotineinheiten binden; innerhalb des photovernetzten Hydrogels führt jede zusätzliche Bindung zu einer zusätzlichen Vernetzung des Hydrogels. Wie bei der leichter vernetzten Hydrogelschicht aus Q-1 zu sehen, schrumpft dadurch die Hydrogelschicht.

Wird nach der Avidinzugabe die Temperatur der Messzelle erhöht, sinkt bei beiden Schichten der Quellgrad. Für die stärker vernetzte Schicht bleibt der Quellgrad unter dem Einfluss von Avidin auch bei höheren Temperaturen größer als ohne Avidin. Die leichter vernetzte Hydrogelschicht aus dem Copolymer Q-1 ist unter dem Einfluss von Avidin erst oberhalb von 25 °C stärker gequollen als ohne Avidin. Die Anbindung von Avdin an das Hydrogelnetzwerk erhöht scheinbar dessen Hydrophilie, wodurch mehr Wasser in der Schicht gebunden wird und der Quellgrad steigt. Diese Beobachtung stimmt gut mit den Ergebnissen der Trübungsexperimente in Lösung überein (Kapitel 3.2).

Bei der weiteren Zugabe einer höher konzentrierten Avidinlösung (15 µmol/ L in PBS-Puffer) zu der bei 15 °C gequollenen Hydrogelschicht aus Q-1 erhöht sich der Quellgrad

nochmals. Dennoch bleibt der Quellgrad bei dieser Temperatur unterhalb des Wertes der in reinem PBS-Puffer gequollenen Schicht. Oberhalb 25 °C ist die Hydrogelschicht dann wieder stärker gequollen als vor der Avidinzugabe. Im Vergleich zur niedrigeren Avidinkonzentration quillt die Hydrogelschicht unter Einfluss der hohen Avidinkonzentration stärker. Bei der Hydrogelschicht aus Q-5 steigt der Quellgrad im Vergleich zur Zugabe der niedriger konzentrierten Avidinlösung unter dem Einfluss der höher konzentrierten 15 µmol/ L-Avidin-lösung im gesamten Temperaturbereich nochmals an. Bei beiden Hydrogelschichten sind die Biotineinheiten also nach der ersten Avidinzugabe noch nicht mit Avidin abgesättigt. Die zusätzliche Bindung von Avidin an die Biotingruppen im Hydrogel erhöht die Hydrophilie des Netzwerkes und lässt es nochmals stärker quellen.

Die Änderung des Quellgrades bei beiden Hydrogelschichten indiziert, dass eine Immobilisierung des Avidins an das polymergebundene Biotin stattfindet. Die Zugabe von BSA (60 µmol/ L in PBS-Puffer) verändert den Quellgrad dagegen nicht (hier nicht gezeigt). Die Bindung ist also spezifisch. Zusätzlich ist sie wie bei den gelösten Polymeren reversibel: Beim Spülen mit einem Überschuss freien Biotins (0,8 mmol in PBS-Puffer), sinkt der Quellgrad für das leichter vernetzte Hydrogel wieder auf Werte knapp oberhalb der Quellgrade der Hydrogelschicht vor der Avidinzugabe ab. Bei der stärker vernetzten Hydrogelschicht aus Q-5 ist dieser Rückgang dagegen nicht zu beobachten. Möglicherweise ist die Bindung der geringen gebundenen Menge Avidin im Hydrogel stärker.

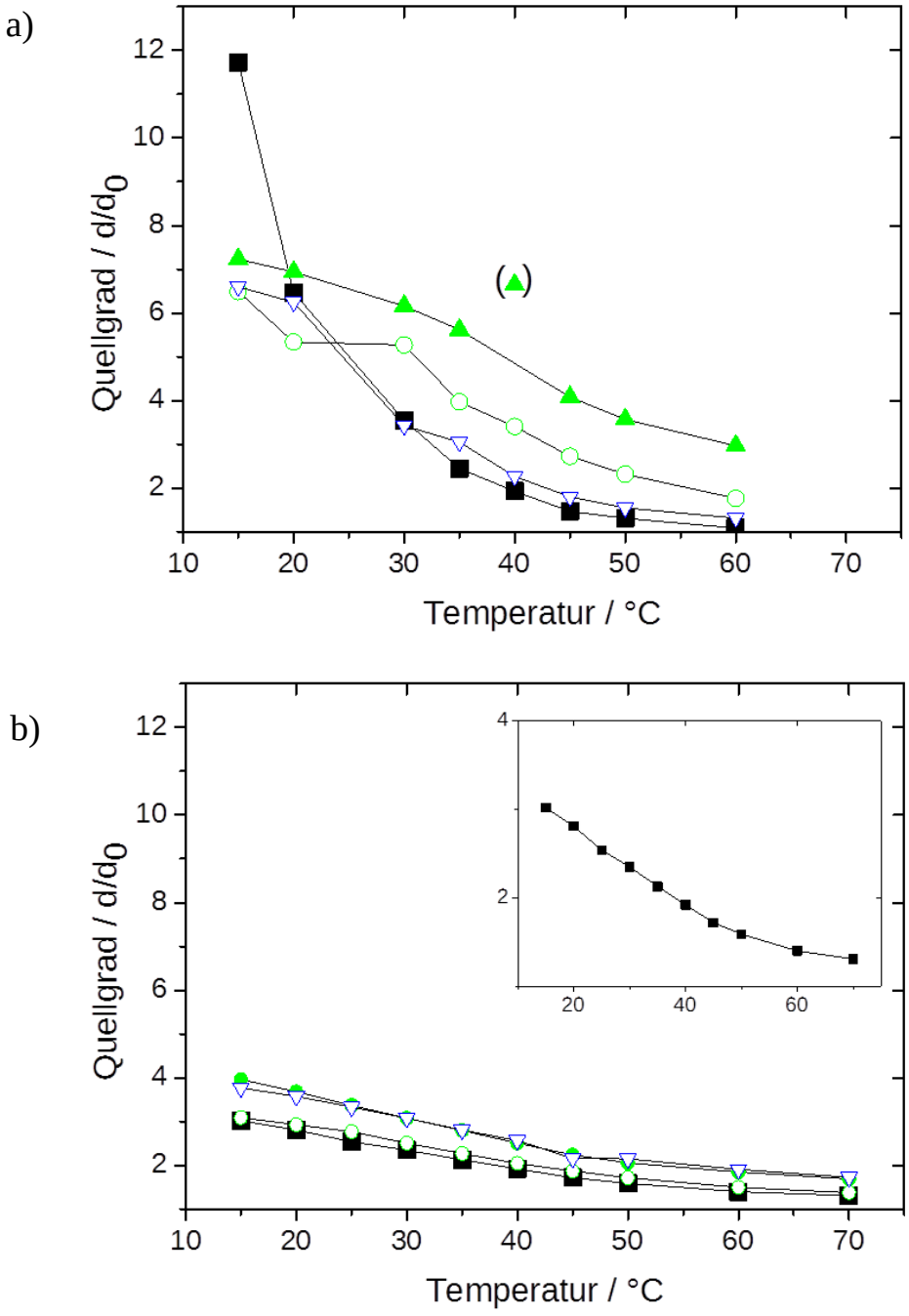


Abbildung 3-26: Quellgrade von Hydrogelschichten aus biotinhaltigen Copolymeren in PBS-Puffer bei unterschiedlichen Temperaturen. Vor- (!) und nach der Zugabe von 1,5 µmol/ L Avidinlösung (.), 15 µmol/ L Avidinlösung (7) und 0,8 mmol/ L Biotinlösung (X). **a)** Quellgrade einer Hydrogelschicht aus Q-1 mit 0,1 mol-% Photovernetzer. Der Wert in Klammern wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt. **b)** Quellgrade einer Hydrogelschicht aus Q-5 mit 0,5 mol-% Photovernetzer. Eingefügt: Vergrößerung für die Quellgrade der Hydrogelschicht Q-1.

Als weitere Charakterisierungsmethode für die Wechselwirkung von Avidin mit einem quervernetzten Hydrogel wurde ein biotinyliertes Hydrogel mit makroskopischen Abmessungen gravimetrisch untersucht (Vgl. Untersuchung makroskopischer Hydrogele in Kapitel 3.1.1.7). Dazu wurden makroskopische Hydrogele mit einer ähnlichen Zusammensetzung wie die biotinhaltigen photovernetzbaren Copolymere synthetisiert.

Für eine weitmaschige Vernetzung und eine gleichzeitige ausreichende mechanische Stabilität des makroskopischen Hydrogels wurden die Comonomere MEO_2MA, $OEGMA_{475}$ und das biotinhaltige BAPMA mit einem für diesen Zweck synthetisierten langkettigen Vernetzer Poly(ethylenglykol)dimethacrylat ($PEGDMA_{20000}$, M_n = 20000 g/ mol) copolymerisiert. Der molare Anteil des Vernetzers $PEGDMA_{20000}$ wurde mit 0,5 mol-% so gewählt, dass die hergestellten Hydrogelmonolithen mechanisch stabil waren und sich gut handhaben ließen. Die große Kettenlänge des Vernetzers sollte eine weitmaschige Vernetzung des Hydrogels gewährleisten. Der eingebaute Anteil des Biotinmonomers BAPMA ist laut Elementaranalyse mit 10 % höher als bei den photovernetzbaren Copolymeren Q-1 und Q-5. Das Verhältnis von MEO_2MA zu $OEGMA_{475}$ betrug im Monomerfeed 95:5 und ist damit etwas größer als Q-1 und Q-5, allerdings ist der langkettige Vernetzer $PEGDMA_{20000}$ relativ hydrophil. Dadurch liegt die Übergangstemperatur ähnlich der der dünnen Hydrogelschichten in einem Bereich bis ca. 45 °C.

Der Quellgrad des Hydrogels wurde gravimetrisch aus dem Quotienten der Masse des gequollenen Hydrogels und der Masse des getrockneten Hydrogels berechnet. Mehrere verschiedene Proben des Hydrogels wurden bei unterschiedlichen Temperaturen gewogen (**Abbildung 3-27**), zwischen den einzelnen Temperaturschritten wurde das Hydrogel jeweils 24 h äquilibriert. Werden die makroskopischen Hydrogele in eine Avidinlösung (60 µmol/ L in PBS-Puffer) gegeben, schrumpfen sie bei 4 °C deutlich um 40 %. Erst bei höheren Temperaturen gleicht sich die Quellkurve unter Avidineinfluss der Quellkurve in reinem PBS-Puffer an. Bei Temperaturen ab 40 °C ist der Quellgrad der Hydrogele mit Avidin etwas höher als ohne Avidin. Der Verlauf der Quellkurve unter Avidineinfluss ist also ähnlich der der stärker gequollenen Hydrogelschicht aus Copolymer Q-1. Auch beim makroskopischen Hydrogel dringt das Avidin in das Hydrogelnetzwerk ein und kann an mehrere Biotineinheiten binden. Erst bei höheren Temperaturen tritt der „hydrophile Effekt“ des Avidins hervor und das makroskopische Hydrogel ist gegenüber dem Zustand ohne Avidin stärker gequollen.

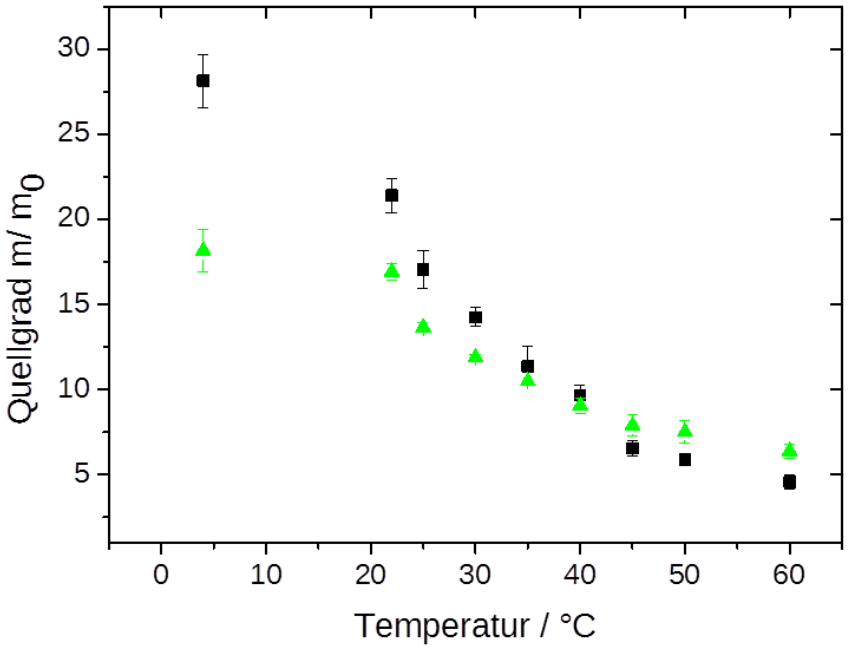


Abbildung 3-27: Gravimetrisch bestimmte Quellgrade eines biotinhaltigen Hydrogels bei verschiedenen Temperaturen. Die Zusammensetzung des Hydrogels beträgt MEO_2MA/BAPMA/PEG_{20000}-Dimethacrylat 95/5/0,5. Quellgrade in PBS-Puffer (!) und in einer Avidinlösung (60 µmol/ L in PBS) (7). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus der gravimetrischen Bestimmung 6 verschiedener Hydrogelproben in PBS-Puffer und 3 verschiedener Hydrogelproben in Avidinlösung. Die Synthese der verschiedenen Hydrogelproben erfolgte in einem Reaktionsansatz.

Der Einfluss von Avidin auf den Quellgrad biotinhaltiger Hydrogele wurde also sowohl für Hydrogelschichten mit nanoskaliger Schichtdicke als auch für makroskopische Hydrogele nachgewiesen. Bei Hydrogelen mit großen Maschenweiten ist der durch das Avidin verursachte Effekt deutlich größer als bei Hydrogelen mit kleinen Maschenweiten. Bei hochgequollenen Systemen verursacht das tetravalente Avidin durch einen Vernetzungseffekt im Temperaturbereich um Raumtemperatur eine Schrumpfung des Hydrogels verglichen mit dem Avidin-freien Zustand. Bei höheren Temperaturen lässt die größere Hydrophilie des Biotin-Avidin-Aduktes die Hydrogele dagegen stärker quellen.

4 Zusammenfassung, Fazit und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung von dünnen oberflächengebundenen biokompatiblen und thermoresponsiven Hydrogelschichten. Die Hydrogelschichten sollten für einen möglichen Einsatz in Biosensoren optimiert werden. Als Basismaterial für die Hydrogelschichten wurden daher die bekanntermaßen biokompatiblen Copolymere mit Oligo(ethylenglykol)-seitenketten (OEG-Copolymere) ausgewählt. Weiterhin sollte untersucht werden ob die Thermoresponsivität dieser Copolymere direkt für einen Detektionsmechanismus ausgenutzt werden kann, d. h. ob entsprechend modifizierte Copolymere eine Eigenschaftsänderung als Reaktion auf die spezifische Erkennung von Biomakromolekülen zeigen.

In dieser Arbeit wurde in einem ersten Schritt eine einfache alternative Immobilisierungsmethode angewandt und das thermoresponsive Verhalten der so hergestellten Hydrogelschichten untersucht. Die Photovernetzung ca. 100 nm dünner mittels Rotationsbeschichtung aufgeschleuderter Schichten aus Benzophenon-funktionalisierten OEG-Copolymeren erwies sich als geeignet, um nanoskalige Hydrogele aufzubauen. Der Quellgrad der Copolymerschichten in wässrigen Medien läßt sich über den Vernetzergehalt im Copolymer steuern. Für hohe Quellgrade, d. h. minimierte Vernetzergehalte, müssen möglichst Copolymere mit hohen Molmassen eingesetzt werden, um Materialverluste durch Auslaugen unvernetzter Copolymerketten zu vermeiden. Die Analyse der Hydrogelschichtdicken erfolgte im trockenen sowie im gequollenen Zustand mittels Ellipsometrie. Mit dieser Methode waren über die Verwendung einer Flusszelle auch temperaturabhängige Messungen in wässrigem Milieu möglich. Bisher liegen nur wenige Untersuchungen zum thermoresponsiven Verhalten von immobilisierten OEG-Copolymeren auf Oberflächen vor und diese befassen sich mit Bürstenarchitekturen. Bei den photovernetzten Hydrogelschichten aus thermoresponsiven OEG-Copolymeren nahm der Quellgrad der Hydrogelschichten mit steigender Temperatur kontinuierlich ab. Verglichen mit dem Kollapsverhalten eigens hergestellter photovernetzter Hydrogelschichten aus dem häufig untersuchten thermoresponsivem Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM) ist der thermoresponsive Kollaps der OEG-Hydrogelschichten deutlich breiter.

Zusätzlich zur Vernetzung über photoreaktive Gruppen wurden zwei alternative Methoden zum Aufbau von Hydrogelschichten aus OEG-Copolymeren erprobt: Die UV-Vernetzung mit

kurzwelligem UV-Licht ohne zusätzliche photosensitive Gruppen führte ebenso zu stabilen Copolymerfilmen wie die Vernetzung von carboxylgruppenhaltigen Copolymeren mit einem oligomeren α, ω-Diamin. Die Hydrogelschichten aus den carboxylgruppenhaltigen Copolymeren zeigen zusätzlich zur Thermoresponsivität ein pH-responsives Verhalten.

Nach der erfolgreichen definierten Anbindung von OEG-Hydrogelen auf Oberflächen wurde in einem zweiten Schritt der Einfluss einer selektiven Proteinbindung auf die Phasenübergangstemperatur von OEG-Copolymeren untersucht. Dazu wurden thermoresponsive Copolymere mittels neuer polymerisierbarer biotinhaltiger Derivate funktionalisiert. Das Phasenverhalten der funktionellen Copolymere wurde vor und nach der Zugabe des spezifischen Bindungspartners Avidin untersucht. Die Bindung des Proteins Avidin an das biotinhaltige Copolymer führt zu einer deutlichen Verschiebung der Phasenübergangstemperatur. Die Stärke des Effekts hängt von der Avidinkonzentration, der Polymerkonzentration und dem Anteil der Biotingruppen im Copolymer ab. Er ist durch die Zugabe von freiem Biotin teilweise reversibel. Die Experimente demonstrieren, dass grundsätzlich über eine Modulation der Phasenübergangstemperatur proteinresponsive Polymere hergestellt werden können. Kontrollexperimente zeigten, dass die Verschiebung der Phasenübergangstemperatur durch spezifische Wechselwirkungen des funktionellen Copolymers mit Avidin hervorgerufen wird. Sie belegen die guten *antifouling*-Eigenschaften und damit die Eignung von OEG-Copolymeren für den Einsatz in Biosensoren.

In einem dritten Schritt wurde die Proteinwechselwirkung mit dem Hydrogel auf Oberflächen getestet. Die spezifische Bindung von Avidin auf biotinylierte Hydrogelschichten wurde mittels Oberflächenplasmonenresonanz und Ellipsometrie untersucht. Messergebnisse beider Methoden legen nahe, dass Avidin in nicht zu dicht vernetzten Hydrogelschichten eindringen und dort mit Biotineinheiten spezifisch interagieren kann. Für die avisierte Verwendung der Hydrogelschichten als Trägermaterial in Biosensoren ist das von Vorteil, da durch die Bindung im gesamten Volumen der Schicht die Zahl der Bindungsereignisse pro Flächeneinheit erhöht wird. Dies führt zu einer verbesserten Empfindlichkeit für den Nachweis des gelösten Bindungspartners. In nachfolgenden Arbeiten sollte zusätzlich die Permeabilität der Hydrogelschicht mit weiteren größeren Bindungspartnern mit realistischerer Bindungsstärke, wie beispielsweise verschiedenen Antikörpern, getestet werden. Die Maschenweite des OEG-Hydrogels kann dafür leicht über hochmolekulare Copolymere mit geringeren Vernetzeranteilen maximiert werden. Ebenfalls denkbar ist der Einsatz von längeren Spacern bei

den photovernetzbaren Copolymeren oder von höhermolekularen Diaminen bei der Vernetzung carboxylgruppenhaltiger Copolymere.

Temperaturabhängige ellipsometrische Untersuchungen biotinylierter Hydrogelschichten zeigten, dass die spezifische Anbindung von Avidin an das Hydrogel, ähnlich wie in Copolymerlösungen, die Hydrophilie des thermoresponsiven Hydrogels erhöht und damit das Phasenverhalten ändert. In hochgequollenen Systemen verursacht das tetravalente Avidin einen zusätzlichen Vernetzungseffekt. Die Verschiebung der unteren kritischen Lösungstemperatur durch spezifische Proteinbindung ist also auch in oberflächengebundenen Systemen möglich.

5 Experimenteller Teil

5.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Formel	CAS	Reinheit	Lieferant
2-Aminoethylmethacrylat Hydrochlorid	$C_6H_{11}NO_2$*HCl	2420-94-2	90 %	Aldrich
3-Aminopropylmethacrylamid Hydrochlorid	$C_7H_{14}N_2O$*HCl	72607-53-5	>98 %	PolyScience
Avidin	-	-		BNLfood
Azo-bis-(isobutyronitril) (AIBN)	$C_8H_{12}N_4$	78-67-1	98 %	Aldrich
D-Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	58-85-5	99 %	Iris Biotech
2-Bromethanol	C_2H_5BrO	540-51-2	98 %	Merck
Dichlormethan	CH_2Cl_2	75-09-2	-	J.T. Baker
Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)	$C_{13}H_{22}N_2$	538-75-0	99 %	Alfa Aesar
Diethylether	$C_4H_{10}O$	60-29-7	99,5 %	Th. Geyer
Di(ethylenglykol)methylethermethacrylat	$C_9H_{16}O_4$	7328-17-8	95 %, + MEHQ	Aldrich
4-Dimethylaminopyridin	$C_7H_{10}N_2$	1122-58-3	>98 %	Fluka
N,*N*-Dimethylformamid (DMF)	C_3H_7NO	68-12-2	99,9 %	Merck
Ethanol	C_2H_6O	64-17-5	99,5	Chemsolute
Fibrinogen	-	-	76,5 %, + Natriumcitrat, + NaCl	Sigma
4-Hydroxyazobenzol-2carboxylsäure (HABA)	$C_{13}H_{10}N_2O_3$	1634-82-8	98 %	ABCR
Hydrochinon	$C_6H_6O_2$	123-31-9	>99%	Fluka
4-Hydroxybenzophenon	$C_{13}H_{10}O_2$	1137-42-4	98 %	Aldrich
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	$C_4H_5NO_3$	6066-82-6	98 %	Aldrich
Isopropanol	C_3H_8O	67-63-0	99 %	Chemsolute
N-Isopropylacrylamid	$C_6H_{11}NO$	2210-25-5	>98 %	TCI
Jeffamine ED-900	-	65605-36-9		Aldrich
Kaliumcarbonat	K_2CO_3	584-08-7		Riedel-de-Haen
Kaliumiodid	KI	7681-11-0	99 %	Acros
Methacrylsäurechlorid	C_4H_5ClO	213-058-9	97 %	Aldrich
Oligo(ethylenglykol)methylether-methacrylat	-	26915-72-0	+ MEHQ, + BHT	Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	-	-		Sigma
2-Succinyloxyethylmethacrylat	$C_{10}H_{14}O_6$	20882-04-6	+MEHQ	Aldrich
Triethylamin	$C_6H_{15}N$	121-44-8	99,5 %	Aldrich

Di(ethylenglykol)methylethermethacrylat (MEO_2MA), Oligo(ethylenglykol)methylether-methacrylat ($OEGMA_{475}$), und 2-Succinyloxyethylmethacrylat (MES) wurden vor der Benutzung über eine kurze Säule gefüllt mit basischem Aluminiumoxid gegeben um Inhibitoren zu entfernen. AIBN wurde aus Methanol umkristallisiert. Kaliumcarbonat wurde bei 250 °C für 2 h getrocknet, Dichlormethan wurde über Calciumchlorid getrocknet. Alle anderen Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Der langkettige Vernetzer Poly(ethylenglykol)-dimethacrylat ($PEGDMA_{20000}$, M_n = 20000 g/ mol) wurde durch Herrn M.Sc. Martin Sütterlin synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

5.2 Verwendete (Mess)instrumente

Die *Dynamische Differenzkalorimetrie* wurde in einem Mikro-DSC III Gerät (Setararm, Frankreich) bei einer Heizrate von 2 K/ min durchgeführt. Vor der Messung der Hydrogele wurde das getrocknete Hydrogel in Wasser für 24 h gequollen. Als Referenzsubstanz wurde Dodekan verwendet.

Für *ellipsometrische Messungen* wurde ein Multiskop (Optrel GbR, Deutschland) in einer Ellipsometerkonfiguration mit rotierendem Analysator verwendet. Der Einfallswinkel betrug 60°. Die Schichtdicken der trockenen Filme wurden mit der Software Elli (Optrel) unter Annahme eines Vierschichtsystems berechnet. Die Siliziumwafer waren von Si-Mat und trugen eine definierte SiO_2-Schicht von 1 nm Dicke. Die optischen Parameter für die Berechnung der Schichtdicken waren: Schicht 1: Luft (n = 1,000, k = 0), Schicht 2: organische Polymerschicht (n = 1,4800, k = 0), Schicht 3: SiO_2 (d = 1,0 nm, n = 1,4580, k = 0), Schicht 4: Silizium (n = 3,8858, k = - 0,0200). Für die Messung der Schichtdicke unter Wasser bzw. PBS-Puffer wurde eine Flusszelle (Optrel) verwendet. Die optischen Parameter für die Berechnung der Schichtdicken waren: 1: Wasser (n = 1,3323, k = 0), Schicht 2: gequollene Polymerschicht (n = 1,3700, k = 0), Schicht 3: SiO_2 (d = 1,0 nm, n = 1,4580, k = 0), Schicht 4: Silizium (n = 3,8858, k = - 0,0200). Für temperaturabhängige Messungen wurde ein externer Kryostat F32-MH (Julabo, Deutschland) an die Flusszelle angeschlossen. Nach jedem Temperaturschritt wurde die Flusszelle für 20 min äquilibriert.

Das Setup für die *Gelpermeationschromatographie (GPC)* in DMF bestand aus einem Einkanal-Entgaser (WEG Dr. Bures, Deutschland), einer isokratischen Pumpe P 1000 (Spectra Physics, USA), einem Satz PolarGel Säulen (Guard 7,5 x 75 mm, PolarGel L 7,5 x 300 mm; beides Polymer Laboratory, USA) einem UV/vis-Detektor SEC-3010 und einem Refraktometer

SEC 3010 (beide WEG Dr. Bures). Die Messungen wurden bei 50 °C mit einer Flussrate von 1 mL/ min durchgeführt. Zur Kalibrierung wurden lineare Polystyrol-Standards der Firma Polymer Standards Service (PSS, Deutschland) verwendet.

Die *Kontaktwinkelmessungen* erfolgten mit dem videogestützten, optischen Kontaktwinkelmessgerät OCA 15EC/B mit SCA 20-Software (Dataphysics, Deutschland) bei Raumtemperatur.

^{1}H (300 MHz) und ^{13}C (75 MHz) NMR Spektren wurden mit einem Avance 300 Spektrometer (Bruker, USA) mit automatischem Probenwechsler aufgenommen. Sofern dem Lösungsmittel kein TMS zugesetzt war, wurde das jeweilige Lösungsmittelsignal als Referenz herangezogen.

Die Messung der *Oberflächenplasmonenresonanz* erfolgte mit dem Zweikanal SPR-Gerät SR7000DC in einer Flusszelle (Reichert, USA). Alle Messungen erfolgten in PBS-Puffer, der Volumenstrom wurde auf 50 µL/ min eingestellt, die Injektion der Probenlösungen erfolgte über ein Injektionssystem mit Probenschleife mit einem Volumen von 1 mL. Als Träger wurden SPR-Chips mit einer 50 nm dicken Goldschicht und einer Größe von 12 x 12 mm verwendet (Ssens by, Niederlande).

Die *Rotationsbeschichtungen* wurden mit einem Standard *Spin-coater* (KL-SCV, Schaefer Technologie GmbH, Deutschland) bei einer Drehzahl von 10-70 rps durchgeführt.

Die *Trübungspunkte* der Polymerlösungen wurden bei 2 g/ L in Reinstwasser oder in PBS Puffer mit einem TP1 Photometer (Tepper, Deutschland) durchgeführt. Die Transmission der Lösungen wurde als Funktion der Temperatur bei 670 nm mit einer Heiz- und Kühlrate von 1 °C/ min aufgezeichnet. Die optische Weglänge betrug 1,2 cm.

Die *UV-Vernetzung* wurde entweder in einer Bestrahlungskammer (UVA-Cube 100, Hönle, Deutschland) mit einer 100 W eisendotierten Quecksilberdampflampe unter einem Fensterglasfilter (*cut-off* ca. 315 nm) durchgeführt, oder mit einer UV-Handlampe NU-4 Watt (Benda, Deutschland) mit umschaltbaren kurz- und langwelligem UV-Bereich (Strahlungsmaximum bei 254 nm bzw. 366 nm). Die Lampenspektren wurden mit dem photonischen Multikanalanalysator C10027 (Hamamatsu, Japan) aufgenommen.

5.3 HABA – Avidin – Bindungsassay

Der Assay wurde nach einem von Interchim Inc. (Frankreich) bereitgestellten Verfahren basierend auf der Originalliteratur von Green et al. durchgeführt. Für die Analytlösung wurde das biotinylierte Polymer mit einer Konzentration von 0,5 g/ L in PBS gelöst. Für die HABA-Lösung wurden 24,2 mg HABA in 9,9 mL Reinstwasser und 100 µL 1 N NaOH gelöst. Die Lösung wurde anschließend filtriert und 600 µL davon mit 5,0 mg Avidin vermischt und mit PBS auf 10 mL aufgefüllt. Anschließend wurden 1,8 mL dieser Stammlösung abgenommen und die Absorption bei 500 nm gemessen. Danach wurden 0,2 mL der biotinylierten Polymerlösung zugegeben, beides vermischt und die Absorption abermals gemessen. Die Konzentration an zugänglichem Biotin wurde nach (**Formel 5-2**) aus der Differenz der Absorption vor und nach Zugabe der Polymerlösung berechnet:

$$\Delta A_{500} = 0{,}9 \times A_{1,500} - A_{2,500} \qquad \textit{Formel 5-1}$$

$$c_{Biotin} = \Delta A_{500} \times 10/\varepsilon_{500} \qquad \textit{Formel 5-2}$$

$A_{1,500}$ = Absorption der reinen HABA/ Avidin-Lösung bei 500 nm.
$A_{2,500}$ = Absorption nach der Zugabe der biotinhaltigen Probe.
0,9 = Verdünnungsfaktor von HABA/ Avidin mit der Probe.
10 = Verdünnungsfaktor der biotinhaltigen Copolymerlösung.
ε_{500} = Molarer Extinktionskoeffizient des HABA-Avidin-Komplexes bei 500 nm = 34000 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

5.4 Schichtpräparation und –charakterisierung

Für die Charakterisierung der Hydrogelschichten mittels Ellipsometrie wurden Siliziumwafer als Substrate genutzt. Die einseitig polierten Siliziumwafer mit einer definierten Oxidschichtdicke von 1,0 nm wurden in quadratische Stücke von 2 cm Kantenlänge geschnitten. Die Wafer wurden für mindestens 4 h in konzentrierter Schwefelsäure (40 mL) mit $KMnO_4$ (100 mg) gereinigt und hydrophilisiert. Nach dreimaligem Waschen in Reinstwasser und Konditionieren über Ethanol und Toluol wurden die Wafer anschließend in eine 1 Vol.-%ige Lösung von (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilan (APDMSi) in Toluol gegeben. Nach 16 h wurden die Wafer aus der Lösung genommen und mit Toluol, Ethanol und Reinstwasser

gewaschen. Der Erfolg der Silanisierung der Wafer wurde mit ellipsometrischen Messungen überprüft. Die so präparierten Wafer wurden anschließend mit Polymerlösungen von 0,5 – 4 Gew.-% in Ethylacetat mit dem Spincoater bei 20-70 rps rotationsbeschichtet. Die durch einen Spritzenfilter filtrierten Polymerlösungen wurden dazu zunächst auf die Wafer aufgetragen und der Rotationsteller anschließend auf die gewünschte Rotationsgeschwindigkeit beschleunigt.

5.4.1 Photovernetzung der Copolymerschichten

Im Standardverfahren wurden die photovernetzerhaltigen Copolymerschichten 15 min im UVA-Cube mit UV-Licht bestrahlt. Nicht gebundenes Copolymer wurde anschließend mit Reinstwasser abgespült. Danach wurden die Wafer weitere 24 h in Reinstwasser gewaschen. Die Schichtdicke wurde nach jedem Schritt mittels Ellipsometrie bestimmt.

5.4.2 Thermische Vernetzung der Copolymerschichten

Die Herstellung der Hydrogelschichten mit verschiedenen Vernetzeranteilen erfolgte nach einem Standardprotokoll. Exemplarisch wird die Herstellung einer Hydrogelschicht mit 0,5 % Vernetzer beschrieben:

Zu 50,5 mg (0,2624 mmol Monomereinheiten) des carboxylgruppenhaltigen Copolymers P(MEO_2MA-co-MES) (10 mol-% Carboxylgruppen) wurden 12 µL einer Stammlösung von Jeffamin® ED-900 (100 g/ L in $CHCl_3$) gegeben. Die Mischung wurde mit weiterem $CHCl_3$ auf 5050 mg aufgefüllt (Gewichtskonzentration bezogen auf das Copolymer = 1 Gew.-%). Die Komponenten wurden über Nacht gelöst und anschließend nach dem Standardverfahren für die Rotationsbeschichtung auf einem mit APDMSi silanisierten Siliziumwafer eingesetzt.

Die thermische Immobilisierung und Vernetzung fand in einem Vakuumofen statt. Vor dem Erhitzen wurde dieser dreimal evakuiert und jeweils über einen Dreiwegehahn neu mit Stickstoff befüllt. Anschließend wurde der Vakuumofen auf 140 °C erhitzt und die Wafer für 2 h im Ofen belassen.

5.4.3 Quellmessungen an den Hydrogelmonolithen

Für die Bestimmung des Quellgrades der makroskopischen Hydrogele wurde zunächst die Trockenmasse der Hydrogelmonolithen bestimmt. Dazu wurde der Hydrogelmonolith für 48 h in einem Vakuumtrockenschrank bei 40 °C über P_2O_5 getrocknet. Die Trockenmasse wurde bestimmt und das Hydrogel für 48 h in Wasser bzw. in PBS-Puffer gequollen. Um das gequollene Hydrogel zu wiegen, wurden an der Oberfläche haftende Wassertropfen mit einem fusselfreien Filterpapier abgestreift und das Hydrogel sofort gewogen. Die Masse des gequollenen Hydrogels nach erneutem Trocknen unterschied sich nicht von der Masse des gequollenen Hydrogels vor dem Trockenvorgang. Für die Bestimmung des Quellgrades bei verschiedenen Temperaturen wurde das vorgequollene Hydrogel in ein temperiertes Wasserbad gegeben und darin für 24 h belassen, bis sich ein Quellgleichgewicht eingestellt hatte. Danach wurde der Hydrogelmonolith nach Abstreifen des Oberflächenwassers gewogen. Bei den Messungen wurden 6 verschiedene Hydrogelmonolithen in Wasserbädern mit verschiedenen Temperaturen gequollen. Nach 24 h wurden die Hydrogele gewogen und das Wasserbad gewechselt.

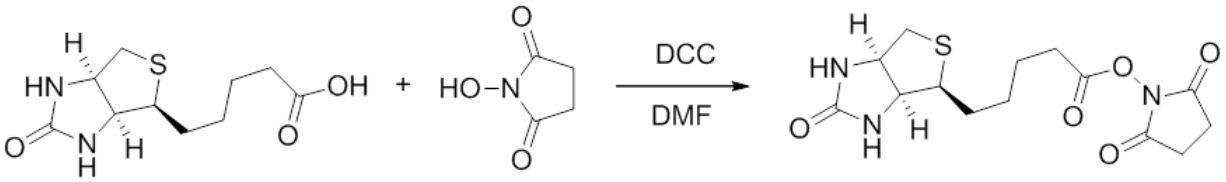
Die Messung der Quellgrade der biotinhaltigen makroskopischen Hydrogele erfolgte in PBS-Puffer. Für die Bestimmung des Quellgrades unter Avidineinfluss wurden die Hydrogelmonolithen in eine Lösung von 60 µmol/ L Avidin in PBS-Puffer gegeben und der Quellgrad analog bestimmt.

5.5 Synthesen

5.5.1 Monomersynthesen

5.5.1.1 Synthese von Biotinyl-3-aminopropylmethacrylamid (BAPMA) und Biotinyl-2-aminoethylmethacrylat (BAEMA)

(i) Synthese von Biotinyl-N-hydroxysuccinimidester (Biotin-NHS)



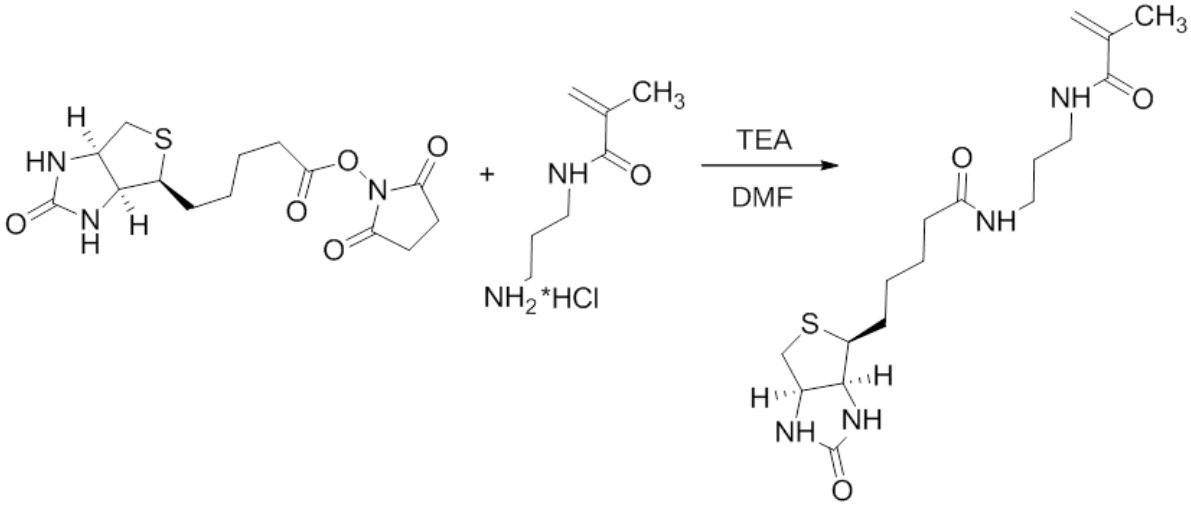
D-Biotin (2,00 g, 8,19 mmol) und N-Hydroxysuccinimid (NHS, 0,94 g, 8,19 mmol) wurden in trockenem DMF (60 mL) bei 60 °C gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 2,21 g, 10,71 mmol) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der gebildete Harnstoff wurde anschließend abfiltriert und mit DMF gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden dann unter vermindertem Druck aufkonzentriert und in Diethylether gefällt. Der Niederschlag wurde aus Isopropanol umkristallisiert und das Produkt unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,2 g (79 %)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 1,34 -1,74 (m, 6H, (C$\underline{H_2}$)$_3$-COO), 2,54-2,89 (m, 8H, -C$\underline{H_2}$S-, -C(=O)C$\underline{H_2}$C$\underline{H_2}$C(=O)- and -C$\underline{H_2}$COO-), 3,06-3,16 (m, 1H, -C$\underline{H}$S-), 4,10-4,12 and 4,27-4,37 (m + m, 1H + 1H, zweimal -C$\underline{H}$-N-CO-N-), 6,36-6,42 (m, 2H, -N$\underline{H}$CON$\underline{H}$).

^{13}C NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 24,7 (-$\underline{C}$H$_2$CH$_2$COO-), 25,9 (-$\underline{C}$H$_2$CON-), 28,0 (-$\underline{C}$H$_2$CH$_2$CH$_2$COO-), 28,3 ($\underline{C}$H$_2$CH$_2$CH2CH2COO), 30,5 ($\underline{C}$H$_2$S), 40,4 (-$\underline{C}$H$_2$COO-), 55,7 (-$\underline{C}$HS-), 59,6 and 61,5 (-$\underline{C}$HNHCO-), 163,1 (-NH$\underline{C}$ONH-), 169,4 (-$\underline{C}$OO), 170,7 (-$\underline{C}$(=O)N-$\underline{C}$(=O)-.

(ii) Synthese von Biotinyl-3-aminopropylmethacrylamid (BAPMA)



3-Aminopropylmethacrylamidhydrochlorid (379 mg, 2,12 mmol), Biotin-NHS (713 mg, 2,09 mmol) und Hydrochinon (21 mg, 0,19 mmol) wurden in trockenem DMF (15 mL) bei 60 °C gelöst. Anschließend wurde bei Raumtemperatur Triethylamin (0,6 mL) rasch zugegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und mit DMF gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeengt und in einem großen Überschuss Diethylether gefällt. Der weiße Niederschlag wurde anschließend mit kaltem Isopropanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die NMR-Spektren zeigen Reste von Triethylamin, die sich durch Trocknen oder Umkristallisieren aus Isopropanol nicht entfernen ließen.

Ausbeute: 725 mg (90 % - enthält Reste von Triethylamin))

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 1,25-1,76 (m, 8H, -CH(C*H*$_2$)$_3$- und -C*H*$_2$(CH$_2$NHCO)$_2$), 1,85 (s, 3H, -CH$_2$CC*H*$_3$), 2,06 (t, 2H, J=7,3 Hz, -C*H*$_2$CONH-), 2,54—3,15 (m, 7H, -C*H*$_2$S-, -C*H*S-, zweimal -CONHC*H*$_2$-), 4,08-4,18 und 4,26-4,36 (m+m, 1H+1H, zweimal -C*H*NCON-), 5,31 und 5,64 (s+s, 1H+1H, C*H*$_2$=C-CO-), 6,35-6,41 (m, 2H, -N*H*CON*H*-), 7,70-8,02 (m, 2H, -CON*H*-).

^{13}C NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 18,6 (*C*H$_3$-), 25,3 (-*C*H$_2$CH$_2$CON-), 28,0 und 28,2 und 29,3 (-*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CON-) und (-NHCH$_2$-*C*H$_2$-CH$_2$NH-) und (-*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$CON-), 35,3 (-*C*H$_2$S-), 35,8 (-*C*H$_2$CONH-), 36,7 und 36,6 (-*C*H$_2$NHCO-), 55,9 (-*C*HS-), 59,2 und 61,0 (*C*HNHCO), 118,8 (CH$_2$=), 140,0 (=*C*-CO), 162,7 (-NH*C*ONH-), 167,4 (=C-*C*ONH-), 172,1 (-CH$_2$-*C*ONH-).

(iii) Synthese von Biotinyl-2-aminoethylmethacrylat (BAEMA)

Die Synthese erfolgte analog der Synthese von BAPMA. Es wurde Biotin-NHS (1000,0 mg, 2,93 mmol) mit 2-Aminoethylmethacrylathydrochlorid (495,0 mg, 2,93 mmol) unter der Zugabe von Triethylamin (1,6 mL) in trockenem DMF (30 mL) umgesetzt. Als Stabilisator diente Hydrochinon (4,2 mg, 0,03 mmol).

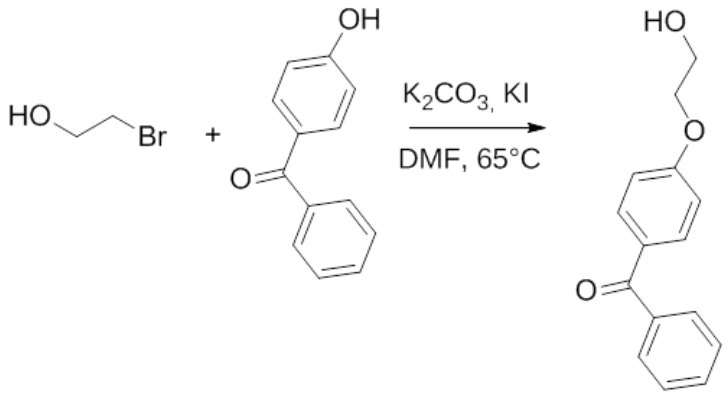
Ausbeute: 922 mg (89 % - enthält Reste von Triethylamin)

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): **^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm):** 1,23-1,67 (m, 6H, -CH(C$\underline{H_2}$)$_3$-), 1,87 (s, 3H, -CH$_2$CC$\underline{H_3}$), 2,06 (t, 2H, J=7,3 Hz, -C$\underline{H_2}$CONH-), 2,54—3,10 (m, 5H, -C$\underline{H_2}$S-, -C$\underline{H}$S-, -CONHC$\underline{H_2}$-), 3,32 (m, überlagert vom Lösungsmittelpeak, C$\underline{H_2}$OCO), 4,05-4,09 und 4,28-4,33 (m+m, 1H+1H, zweimal -C$\underline{H}$NCON-), 5,67 und 6,05 (s+s, 1H+1H, C$\underline{H_2}$=C-CO-), 6,35-6,41 (m, 2H, -N$\underline{H}$CON$\underline{H}$-), 7,95-7,99 (m, 1H, -CON$\underline{H}$-).

^{13}C NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 18,0 ($\underline{C}$H$_3$-), 24,5 25,2 und 28,1 (-($\underline{C}$H$_2$)$_3$CH$_2$CON-), 33,3 (-CH$_2$CONH-), 35,7 (-OCH$_2\underline{C}$H$_2$NHCO-), 37,5 (-$\underline{C}$H$_2$S-) 55,4 (-$\underline{C}$HS-), 59,3 und 61,1 (zweimal $\underline{C}$HNHCONH), 63,1 ($\underline{C}$H$_2$OCO), 125,9 ($\underline{C}$H$_2$=), 135,8 (=$\underline{C}$-CO), 162,8 (-NH$\underline{C}$ONH-), 166,6 (=C-$\underline{C}$OO-), 172,5 (-CH$_2$-$\underline{C}$ONH-).

5.5.1.2 Synthese von 2-(4-Benzoylphenoxy)ethylmethacrylat (BPEM)

(i) Synthese von 2-(4-Benzoylphenoxy)ethanol



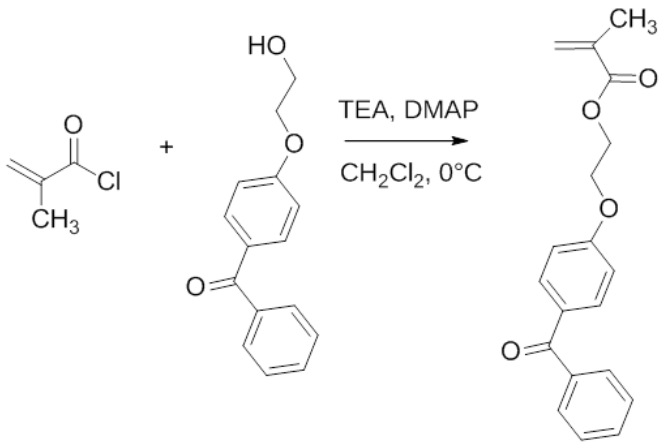
4-Hydroxybenzophenon (10,0 g, 50,44 mmol) wurde in trockenem DMF (150 mL) gelöst, K_2CO_3 (13,82 g, 100 mmol), KI (3,98 g, 24 mmol) und 2-Bromethanol (5,3 mL, 74 mmol) wurden zugefügt und die Lösung über Nacht bei 65 °C gerührt. Nach Umsatzkontrolle mittels Dünnschichtchromatographie wurden zwei weitere Portionen K_2CO_3 (7,0 g, 50 mmol) und 2-Bromethanol (4,4 mL, 62 mmol) zugefügt und die Lösung für weitere 18 h gerührt. Die gelbliche Reaktionslösung wurde dann in 1,5 L Eiswasser gegossen, der Niederschlag abzentrifugiert und schließlich der gesammelte Feststoff im Vakuum über $CaCl_2$ getrocknet.

Ausbeute: 10,7 g (86 %)

R_f (Hexan / Ethylacetat 2:1) = 0,29

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 4,03 (m, 2H, HOC*H*$_2$-), 4,18 (t, 2H, J=4,5 Hz, -OC*H*$_2$$CH_2$OH), 6,99-7,00 (m, 2H, zweimal -OCC*HCH*-), 7,47-7,50 (m, 2H, zweimal meta -CCHC*H*CH-), 7,57-7,60 (m, 1H, para -C*H*CHCHC-), 7,76-7,85 (m, 4H, viermal -COCC*H*-).

(ii) Synthese von 2-(4-Benzoylphenoxy)ethylmethacrylat (BPEM)



2-(4-Benzoylphenoxy)ethanol (10,0 g, 41,2 mmol) aus der ersten Stufe wurde mit Triethylamin (11,4 mL, 45,4 mmol) und 4-Dimethylaminopyridin (0,25 g, 2,1 mmol) in Dichlormethan (225 mL) gelöst. Unter Kühlung im Eisbad wurde Methacrylsäurechlorid (4,6 mL, 45,4 mmol) in Dichlormethan zugetropft. Danach wurde weitere 2 h bei 0 °C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde dann in eine gesättigte $NaHCO_3$-Lösung gegossen und die organische Phase zusätzlich mit weiteren Portionen gesättigter $NaHCO_3$-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und über eine Kiesegelsäule filtriert. Das Produkt wurde durch Evaporieren des Lösungsmittels als weißer kristalliner Feststoff erhalten.

Ausbeute: 7,5 g (60 %)

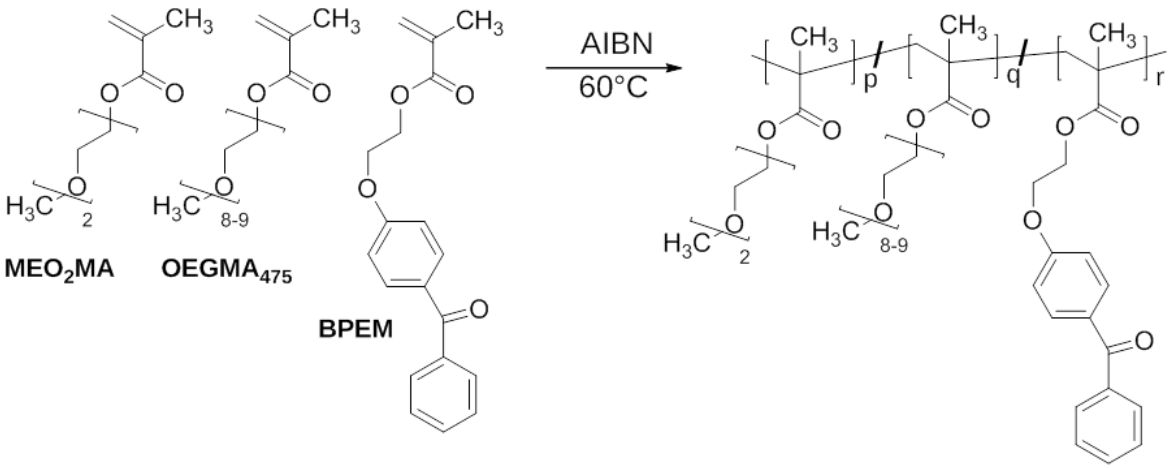
R_f (Ethylacetat / Hexan 3:2) = 0,87

^{1}H NMR (300 MHz, Aceton-d6) δ (ppm): 1,94 (s, 3H, -$CH_2CC\underline{H_3}$), 4,45 (t, 2H, J=4,5 Hz, -$OC\underline{H_2}$-), 4,55 (t, 2H, J=4,5 Hz, -$COOC\underline{H_2}$-), 5,66 und 6,11 (s+s, 1H+1H, $C\underline{H_2}$=C-CO-), 7,11-7,16 (m, 2H, zweimal -OCC*<u>H</u>CH*-), 7,52-7,58 (m, 2H, zweimal -CCHC*<u>H</u>*CH-), 7,62-7,68 (m, 1H, -C*<u>H</u>*CHCHC-), 7,96-7,84 (m, 4H, viermal -$C\underline{H_2}$C-).

^{13}C NMR (300 MHz, Aceton-d6) δ (ppm): 17,8 ($\underline{C}H_3$-), 63,2 (-$COO\underline{C}H_2$-), 66,6 (-$O\underline{C}H_2$-), 114,8 (-OCC*<u>H</u>CH*-), 125,4 ($C\underline{H_2}$=C-CO-), 128,5 (CCH*<u>C</u>*HCH-), 129,7 (-CHCH*<u>C</u>*HCCO-), 130,9 (-CO*<u>C</u>*CHCHC-), 132,2 (-*<u>C</u>*HCHCHC-), 132,5 (-OCCH*<u>C</u>*HCCO-), 136,7 (-CH_2=$\underline{C}CH_3$-), 138,8 (CO<u>C</u>CHCHCH-), 162,77 (=$C(CH_3)\underline{C}OO$), 166,9 (O*<u>C</u>*CH), 194,6 (-$C\underline{C}OC$-).

5.5.2 Polymersynthesen

5.5.2.3 Synthese der photovernetzbaren Copolymere



(i) Synthese der Copolymere mit moderater Molmasse (B-1, B-2a, B-3a, B-4, T-1-5)

Alle Copolymere wurden nach einer Standardprozedur synthetisiert. Alle Arbeitsschritte wurden unter sorgfältigem Schutz vor Umgebungslicht entweder in einem abgedunkelten Labor unter Gelblicht, oder mit permanent mit Alufolie geschützten Proben durchgeführt. Exemplarisch wird die Synthese von T-4 beschrieben.

Di(ethylenglykol)methylethermethacrylat (MEO_2MA, 2,00 g, 10,63 mmol, 69 Äquivalente), Oligo(ethylenglykol)methylethermethacrylat ($OEGMA_{475}$, M_n = 475 g/ mol, 2,17 g, 4,55 mmol, 30 Äquivalente) und 2-(4-Benzoylphenoxy)ethylmethacrylat (BPEM, 0,024 g, 0,076 mmol, 0,5 Äquivalente) wurden in einem Einhalsrundkolben in Ethanol (23,9 g, 85 Gew.-%) gelöst. AIBN (0,013 g, 0,076 mmol, 0,5 Äquivalente) wurde hinzugefügt, der Kolben mit einem Gummiseptum verschlossen und die Lösung für 30 min mit N_2 gespült. Anschließend wurde der Kolben für 20 h im auf 60 °C vorgeheizten Ölbad erhitzt.

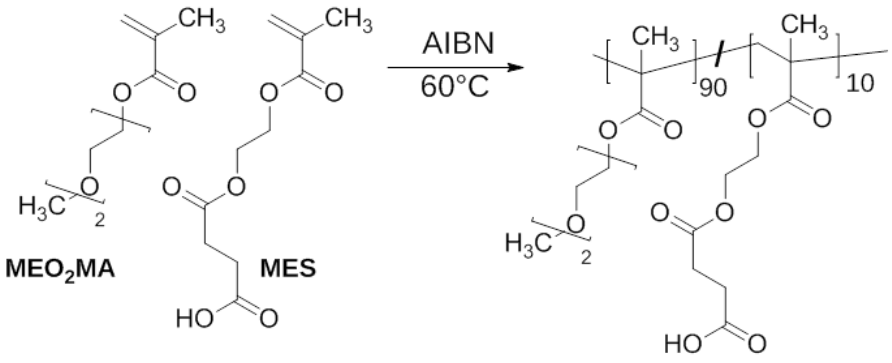
Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Kolben geöffnet und die Reaktionsmischung Luftsauerstoff ausgesetzt. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer eingeengt, die Lösung mit Wasser verdünnt und gegen vollentsalztes Wasser für 4 Tage dialysiert. (Dialysemembran ZelluTrans von Roth mit einem Molekulargewicht cut-off von 4000-6000 g/ mol). Das Copolymer wurde anschließend durch Gefriertrocknung isoliert. Die Ausbeute betrug 3,65 g (87 %).

Das isolierte Copolymer wurde mittels ^{1}H-NMR, GPC (Eluent DMF) und Trübungsphotometrie in Reinstwasser analysiert (Ergebnisse s. **Tabelle 3-1**, S. 31).

(ii) Synthese der Copolymere mit höherer Molmasse (B-2b, B-3b)

Zum Erzielen höheren Molmassen wurden abweichend vom Standardprotokoll 0,25 Äquivalente AIBN zu der Reaktionsmischung gegeben und die Monomere mit einer Konzentration von 20 Gew.-% in EtOH polymerisiert. Die Reaktionszeit betrug 4 h, die Ausbeute nach der Aufreinigung ca. 80 %.

5.5.2.4 Synthese des carboxylgruppenhaltigen Copolymers P(MEO_2MA-co-MES)

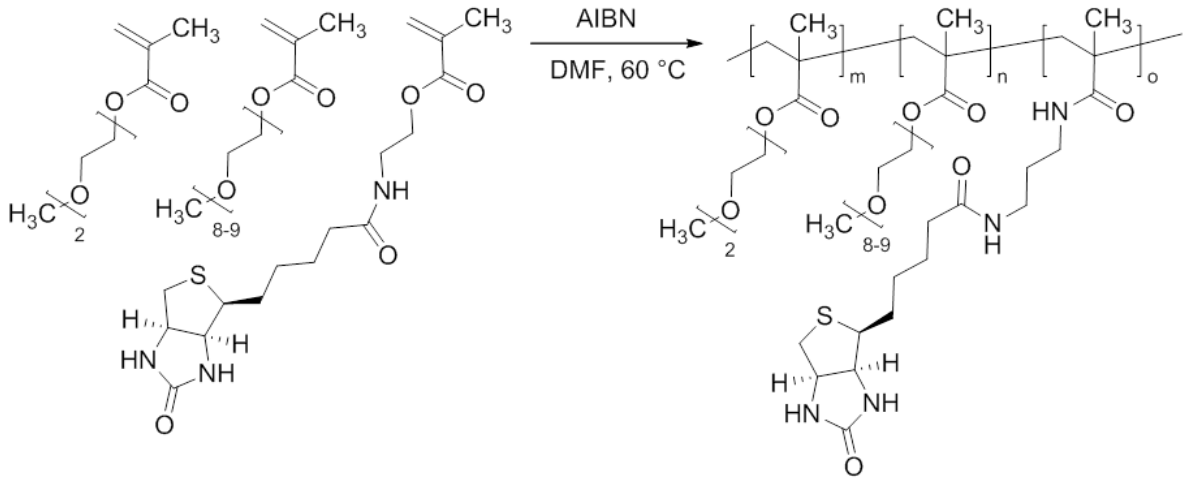


Di(ethylenglykol)methylethermethacrylat (MEO_2MA, 4,006 g, 21,28 mmol, 90 Äquivalente) wurde zusammen mit 2-Succinyloxyethylmethacrylat (MES, 0,565 g, 2,454 mmol, 10 Äquivalente) und AIBN (0,019 g, 0,118 mmol, 0,5 Äquivalente) in einem Einhalsrundkolben mit Rührfisch in Ethanol (30,0 g, 87 Gew-%) gelöst. Der Kolben wurde mit einem Gummiseptum verschlossen und 40 min lang N_2 durch die Lösung geleitet. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 16 h in ein auf 60 °C vorgeheiztes Ölbad gehängt. Die Reaktion wurde durch Öffnen des Kolbens beendet, die Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer eingeengt und mit Wasser aufgenommen. Das Copolymer wurde durch Dialyse gegen vollentsalztes Wasser aufgereinigt (3 Tage, Dialysemembran ZelluTrans von Roth mit einem Molekulargewicht cut-off von 4000-6000 g/ mol) und mittels Gefriertrocknung isoliert.

GPC (DMF, kalibriert mit Polystyrolstandards): M_n^{app} = 92 kg/ mol, PDI = 4,5.

Kein Trübungspunkt in Reinstwasser oder PBS-Puffer, Trübungspunkt in Zitronensäurepuffer (pH 5) = 15,9 °C, Trübungspunkt in Zitronensäurepuffer (pH 3) = 13,3 °C.

5.5.2.5 Synthese der biotinhaltigen Copolymere (Bt-1-4)

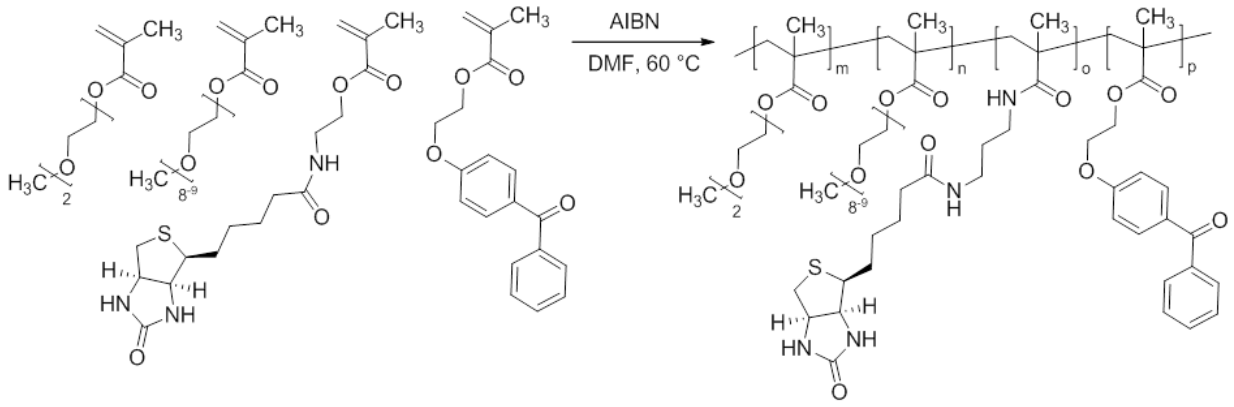


Alle Copolymere wurden nach einer Standardprozedur synthetisiert. Exemplarisch wird die Synthese von Bt-4 beschrieben.

Di(ethylenglykol)methylethermethacrylat (MEO_2MA, 270 mg, 1,433 mmol, 66 Äquivalente), Oligo(ethylenglykol)methylethermethacrylat ($OEGMA_{475}$, M_n = 475 g/ mol, 146 mg, 0,307 mmol, 14 Äquivalente) und Biotinyl-3-aminopropylmethacrylamid (BAPMA, 149 mg, 0,405 mmol, 19 Äquivalente) wurden in einem Einhalsrundkolben in DMF (2,1 g, 80 Gew.-%) bei 50 °C gelöst. Die Reaktionsmischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und AIBN (2,0 mg, 0,012 mmol, 0,5 Äquivalente) wurde hinzugefügt. Der Kolben wurde mit einem Gummiseptum verschlossen und zum Entfernen von Sauerstoff wurde für 30 min N_2 durch die Lösung geleitet. Die Polymerisation fand bei 60 °C für 20 h in einem vorgeheizten Ölbad statt. Zur Beendigung der Reaktion wurde der Kolben auf Raumtemperatur gekühlt und geöffnet. Das Copolymer wurde durch Dialyse gegen entsalztes Wasser aufgereinigt (3 Tage, Dialysemembran ZelluTrans von Roth mit einem Molekulargewicht cut-off von 4000-6000 g/ mol). Durch Gefriertrocknung wurden schließlich 489 mg des Copolymers isoliert (86 %).

Das isolierte Copolymer wurde mittels ^{1}H-NMR, GPC (Eluent DMF) und Trübungsphotometrie in Reinstwasser analysiert (Ergebnisse s. **Tabelle 3-5**, S. 68).

5.5.2.6 Synthese der biotinhaltigen, photovernetzbaren Copolymere (Q-1, Q-5)



Die Synthese der Copolymere wurde in einem abgedunkelten Labor unter Gelblicht durchgeführt. Die Synthesevorschrift beschreibt die Synthese von Q-5.

Di(ethylenglykol)methylethermethacrylat (MEO_2MA, 2,005 g, 10,626 mmol, 85 Äquivalente), Oligo(ethylenglykol)methylethermethacrylat ($OEGMA_{475}$, M_n = 475 g/ mol, 0,587 g, 1,181 mmol, 10 Äquivalente) und Biotinyl-2-aminoethylmethacrylat (BAEMA, 0,223 g, 0,621 mmol, 5 Äquivalente) wurden in einem Rundkolben in DMF (9,4 g, 77 Gew.-%) bei 50 °C weitestgehend gelöst. Ungelöste Reste wurden in der Reaktionslösung belassen. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur wurden 2-(4-Benzoylphenoxy)ethylmethacrylat (BPEM, 0,018 g, 0,059 mmol) und AIBN (0,005 g, 0,0316 mmol) zugegeben, der Kolben mit einem Gummiseptum verschlossen und die Reaktionsmischung für 30 min mit N_2 gespült. Anschließend wurde der Kolben in ein auf 60 °C vorgeheiztes Ölbad gegeben. Nach 20 h wurde die Reaktion durch Öffnen des Kolbens beendet. Das Copolymer wurde mittels Dialyse gegen vollentsalztes Wasser aufgereinigt (5 Tage, Dialysemembran ZelluTrans von Roth mit einem Molekulargewicht cut-off von 4000-6000 g/ mol). 2,36 g des Copolymer wurden durch Gefriertrocknung isoliert (83 %).

Das isolierte Copolymer wurde mittels ^{1}H-NMR, GPC (Eluent DMF) und Trübungsphotometrie (3 g/ L in PBS-Puffer) analysiert (Ergebnisse s. **Tabelle 3-6**, S. 76).

5.5.3 Synthese der Hydrogelmonolithe

Für die Synthese der Hydrogelmonolithe wurden ca. 2 cm lange Glasröhrchen mit einem Innendurchmesser von 4,2 mm zurechtgeschnitten. 4 der Röhrchen wurden in ein Reagenzglas gegeben und die Reaktionsmischung eingefüllt. Anschließend wurde das Reagenzglas mit einem Gummiseptum verschlossen und für 30 min N_2 durch die Lösung geleitet. Nach 20 h war die Reaktionslösung vollständig geliert. Das Reagenzglas wurde aufgebrochen, das Hydrogel zerschnitten und die Hydrogelmonolithen aus den Glasröhrchen in ein Wasserbad gepresst. Die Reinigung der Hydrogelmonolithen erfolgte durch 2-tägiges Waschen in Reinstwasser unter ständigem Austausch der Waschlösung.

(i) Hydrogelmonolithen aus OEG-Comonomeren

Die Reaktionsmischung für die OEG-Hydrogelmonolithen bestand aus MEO_2MA (1,202 g, 6,384 mmol, 84 Äquivalente), $OEGMA_{475}$ (0,583 g, 1,228 mmol), Ethylenglykoldimethacrylat (31,7 µL, 0,1522 mmol, 2 Äquivalente) und AIBN (12 mg, 0,076 mmol, 1 Äquivalent) gelöst in Ethanol (5,43 g, 75 Gew.-%).

(ii) Hydrogelmonolithen aus NIPAM

Die Reaktionsmischung für die NIPAM-Hydrogelmonolithen bestand aus NIPAM (4,75 g, 41,98 mmol), Bisacrylamid (0,263 g, 1,706 mmol) und AIBN (0,083 g, 0,505 mmol) gelöst in Ethanol (18,2 g, 78 Gew.-%).

(iii) biotinhaltige Hydrogelmonolithen

Die Reaktionsmischung für die biotinhaltigen Hydrogelmonolithen bestand aus MEO_2MA (584 mg, 2,914 mmol, 84 Äquivalente), $OEGMA_{475}$ (68 mg, 0,142 mmol, 4 Äquivalente), BAPMA (127 mg, 0,344 mmol, 10 Äquivalente) und Poly(ethylenglykol)dimethacrylat (M_n = 20 kg/ mol, 346 mg, 0,0173 mmol) und AIBN (8,0 mg, 0,048mmol), gelöst in Trifluorethanol (6,46 g, 85 Gew.-%).

6 Literaturverzeichnis

1. M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, K. Przemyslaw, M. Rinaudo und F. Schué, *Pure Appl. Chem.*, 2012, **84**, 377-410.
2. D. Schmaljohann, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2006, **58**, 1655-1670.
3. D. Li, Q. He, Y. Yang, H. Möhwald und J. Li, *Macromolecules*, 2008, **41**, 7254-7256.
4. C. Pietsch, R. Hoogenboom und U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 5653-5656.
5. D. Kungwatchakun und M. Irie, *Makromol. Chem. Rapid Comm.*, 1988, **9**, 243-246.
6. R. Kröger, H. Menzel und M. L. Hallensleben, *Macromol. Chem. Phys.*, 1994, **195**, 2291-2298.
7. F. D. Jochum und P. Theato, *Macromolecules*, 2009, **42**, 5941-5945.
8. Y. Jia, X. X. Zhu, L. Liu und J. Li, *Langmuir*, 2012, **28**, 4500-4506.
9. P. Mi, L.-Y. Chu, X.-J. Ju und C. H. Niu, *Macromol. Rapid Comm.*, 2008, **29**, 27-32.
10. A. S. Hoffman, A. Afrassiabi und L. C. Dong, *J. Contr. Release*, 1986, **4**, 213-222.
11. V. Aseyev, H. Tenhu und F. Winnik, *Adv. Polym. Sci.*, 2011, **242**, 29-89.
12. Y. Zhao, L. Tremblay und Y. Zhao, *Macromolecules*, 2011, **44**, 4007-4011.
13. M. W. Urban, *Handbook of Stimuli-Responsive Materials*, Wiley, Weinheim, Germany, 2011.
14. A. Lendlein und S. Kelch, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 2034-2057.
15. E. Smela, *Adv. Mater.*, 2003, **15**, 481-494.
16. W. T. S. Huck, *Mater. Today*, 2008, **11**, 24-32.
17. Y. Lu, S. Proch, M. Schrinner, M. Drechsler, R. Kempe und M. Ballauff, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 3955-3961.
18. C. Yu, S. Mutlu, P. Selvaganapathy, C. H. Mastrangelo, F. Svec und J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 1958-1961.
19. Q. Luo, S. Mutlu, Y. B. Gianchandani, F. Svec und J. M. J. Fréchet, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 3694-3702.
20. E. S. Gil und S. M. Hudson, *Prog. Polym. Sci.*, 2004, **29**, 635.
21. M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai und T. Okano, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 505.
22. C. de las Heras Alarcon, S. Pennadam und C. Alexander, *Chem. Soc. Rev.*, 2005, **34**, 276-285.
23. A. K. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu und S. Kankane, *Prog. Polym. Sci.*, 2008, **33**, 1088-1118.
24. E. Wischerhoff, K. Uhlig, A. Lankenau, H. Börner, A. Laschewsky, C. Duschl und J.-F. Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 5666-5668.
25. D. Roy, J. N. Cambre und B. S. Sumerlin, *Prog. Polym. Sci.*, 2009, **35**, 278-301.
26. M. A. Cohen Stuart, W. T. S. Huck, J. Genzer, M. Müller, C. Ober, M. Stamm, G. B. Sukhorukov, I. Szleifer, V. V. Tsukruk, M. Urban, F. Winnik, S. Zauscher, I. Luzinov und S. Minko, *Nat. Mater.*, 2010, **9**, 101-113.
27. E. Wischerhoff, N. Badi, J.-F. Lutz und A. Laschewsky, *Soft Matter*, 2010, **6**, 705-713.
28. A. S. Hoffman, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, **64**, 18-23.
29. S. Chaterji, I. K. Kwon und K. Park, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 1083-1122.
30. R. Duncan und R. Gaspar, *Mol. Pharm.*, 2011, **8**, 2101-2141.

31. G. Cheng, H. Xue, Z. Zhang, S. Chen und S. Jiang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 8831-8834.
32. J. Trmcic-Cvitas, E. Hasan, M. Ramstedt, X. Li, M. A. Cooper, C. Abell, W. T. S. Huck und J. E. Gautrot, *Biomacromolecules*, 2009, **10**, 2885-2894.
33. J. E. Gautrot, B. Trappmann, F. Oceguera-Yanez, J. Connelly, X. He, F. M. Watt und W. T. S. Huck, *Biomaterials*, 2010, **31**, 5030-5041.
34. M. Krämer, J.-F. Stumbé, H. Türk, S. Krause, A. Komp, L. Delineau, S. Prokhorova, H. Kautz und R. Haag, *Angew. Chem.*, 2002, **114**, 4426-4431.
35. O. Soga, C. F. van Nostrum und W. E. Hennink, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 818-821.
36. J.-F. Lutz, *J. Polym. Sci.; Part A: Polym. Chem.*, 2008, **46**, 3459-3470.
37. R. Hoogenboom und H. Schlaad, *Polymers*, 2011, **3**, 467-488.
38. M. Barz, R. Luxenhofer, R. Zentel und M. J. Vicent, *Polym. Chem.*, 2011, **2**, 1900-1918.
39. J.-F. Lutz und A. Hoth, *Macromolecules*, 2006, **39**, 893-896.
40. M. Füllbrandt, R. von Klitzing und A. Schönhals, *Soft Matter*, 2012, **8**, 12116-12123.
41. H. Feil, Y. H. Bae, J. Feijen und S. W. Kim, *J. Membr. Sci.*, 1991, **64**, 283-294.
42. W. E. Hennink, H. Talsma, J. C. H. Borchert, S. C. De Smedt und J. Demeester, *J.Contr. Release*, 1996, **39**, 47-55.
43. A. Bertz, S. Wöhl-Bruhn, S. Miethe, B. Tiersch, J. Koetz, M. Hust, H. Bunjes und H. Menzel, *J. Biotechnol.*, 2013, **163**, 243-249.
44. H. G. Elias, *Makromoleküle Band 2: Physikalische Strukturen und Eigenschaften*, Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
45. R. Liu, M. Fraylich und B. Saunders, *Colloid Polym. Sci.*, 2009, **287**, 627-643.
46. G. D. Smith und D. Bedrov, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 3095-3097.
47. D. Zhang, S. H. Lahasky, L. Guo, C.-U. Lee und M. Lavan, *Macromolecules*, 2012, **45**, 5833-5841.
48. W. Gao, D. Xu, D. W. Lim, S. L. Craig und A. Chilkoti, *Polymer Chemistry*, 2011, **2**, 1561-1566.
49. J. W. Robinson, C. Secker, S. Weidner und H. Schlaad, *Macromolecules*, 2013, **46**, 580-587.
50. N. Zhang, S. Salzinger und B. Rieger, *Macromolecules*, 2012, **45**, 9751-9758.
51. E. Djokpé und W. Vogt, *Macromol. Chem. Phys.*, 2001, **202**, 750-757.
52. A. Laschewsky, E. D. Rekaï und E. Wischerhoff, *Macromol. Chem. Phys.*, 2001, **202**, 276-286.
53. F. M. Winnik, *Polymer*, 1990, **31**, 2125-2134.
54. A. Suzuki und S. Kojima, *J. Chem. Phys.*, 1994, **101**, 10003 - 10008.
55. Y. Zhang, S. Furyk, D. E. Bergbreiter und P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 14505-14510.
56. C. Hofmann und M. Schönhoff, *Colloid Polymer Sci.*, 2009, **287**, 1369-1376.
57. F. A. Plamper, A. A. Steinschulte, C. H. Hofmann, N. Drude, O. Mergel, C. Herbert, M. Erberich, B. Schulte, R. Winter und W. Richtering, *Macromolecules*, 2012, **45**, 8021-8026.
58. A. K. Tucker und M. J. Stevens, *Macromolecules*, 2012, **45**, 6697-6703.
59. H. Kitano, T. Hirabayashi, M. Gemmei-Ide und M. Kyogoku, *Macromol. Chem. Phys.*, 2004, **205**, 1651-1659.
60. J.-F. Lutz, K. Weichenhan, Ö. Akdemir und A. Hoth, *Macromolecules*, 2007, **40**, 2503-2508.
61. S.-I. Yamamoto, J. Pietrasik und K. Matyjaszewski, *J. Polym. Sci.; Part A: Polym. Chem.*, 2008, **46**, 194-202.
62. C. Pietsch, M. W. M. Fijten, H. M. L. Lambermont-Thijs, R. Hoogenboom und U. S. Schubert, *J. Polym. Sci.; Part A: Polym. Chem.*, 2009, **47**, 2811-2820.

63. B. H. Lessard, E. J. Y. Ling und M. Marić, *Macromolecules*, 2012, **45**, 1879-1891.
64. S. Sun und P. Wu, *Macromolecules*, 2012, **46**, 236-246.
65. B. Trzebicka, D. Szweda, S. Rangelov, A. Kowalczuk, B. Mendrek, A. Utrata-Wesołek und A. Dworak, *J. Polym. Sci.; Part A: Polym. Chem.*, 2013, **51**, 614-623.
66. S. Han, M. Hagiwara und T. Ishizone, *Macromolecules*, 2003, **36**, 8312.
67. J. F. Lutz, Ö. Akdemir und A. Hoth, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 13046-13047.
68. C. Weber, R. Hoogenboom und U. S. Schubert, *Prog. Polym. Sci.*, 2012, **37**, 686-714.
69. A. Miasnikova und A. Laschewsky, *J. Polym. Sci.; Part A: Polym. Chem.*, 2012, **50**, 3313-3323.
70. J. F. Lutz und A. Hoth, *Macromolecules*, 2006, **39**, 893-896.
71. W. R. Gombotz, W. Guanghui, T. A. Horbett und A. S. Hoffman, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1991, **25**, 1547-1562.
72. J. M. Harris, *Poly(ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, Plenum Press, New York, USA, 1992.
73. K. L. Prime und G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 10714-10721.
74. I. Szleifer, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, 1997, **2**, 337-344.
75. A. Hucknall, S. Rangarajan und A. Chilkoti, *Adv. Mater.*, 2009, **21**, 2441-2446.
76. G. Gunkel, M. Weinhart, T. Becherer, R. Haag und W. T. S. Huck, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 4169-4172.
77. A. S. Hoffman und P. S. Stayton, *Macromol. Symp.*, 2004, **207**, 139-152.
78. J.-F. Lutz und H. G. Börner, *Prog. Polym. Sci.*, 2008, **33**, 1-39.
79. A. K. Bajpai, J. Bajpai, R. Saini und R. Gupta, *Polymer Rev.*, 2011, **51**, 53-97.
80. Z. Ding, R. B. Fong, C. J. Long, P. S. Stayton und A. S. Hoffman, *Nature*, 2001, **411**, 59-62.
81. T. Miyata, A. Jikihara, K. Nakamae und A. S. Hoffman, *Macromol. Chem. Phys.*, 1996, **197**, 1135-1146.
82. Z.-R. Lu, P. Kopeková und J. Kopecek, *Macromol. Biosci.*, 2003, **3**, 296-300.
83. J. Kim, S. Nayak und L. A. Lyon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 9588-9592.
84. K. Kempe, C. Weber, K. Babiuch, M. Gottschaldt, R. Hoogenboom und U. S. Schubert, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 2591-2600.
85. T. Miyata, N. Asami und T. Uragami, *Nature*, 1999, **399**, 766-769.
86. C. Luo, F. Zuo, X. Ding, Z. Zheng, X. Cheng und Y. Peng, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2008, **107**, 2118-2125.
87. S. Kitano, Y. Koyama, K. Kataoka, T. Okano und Y. Sakurai, *J. Contr. Release*, 1992, **19**, 161-170.
88. E. Uğuzdoğan, H. Kayı, E. Denkbaş, S. Patır und A. Tuncel, *Polymer Int.*, 2003, **52**, 649-657.
89. A. Matsumoto, R. Yoshida und K. Kataoka, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 1038-1045.
90. T. Hoare und R. Pelton, *Macromolecules*, 2007, **40**, 670-678.
91. G. R. Hendrickson und L. A. Lyon, *Soft Matter*, 2009, **5**, 29-35.
92. C. Ancla, V. r. Lapeyre, I. Gosse, B. Catargi und V. Ravaine, *Langmuir*, 2011, **27**, 12693–12701.
93. X. Zhang, Y. Guan und Y. Zhang, *Biomacromolecules*, 2011, **13**, 92-97.
94. E. Kokufata, Y.-Q. Zhang und T. Tanaka, *Nature*, 1991, **351**, 302-304.
95. J. Shepherd, P. Sarker, K. Swindells, I. Douglas, S. MacNeil, L. Swanson und S. Rimmer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 1736-1737.
96. P. Sarker, J. Shepherd, K. Swindells, I. Douglas, S. MacNeil, L. Swanson und S. Rimmer, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 1-5.
97. T. R. Hoare und D. S. Kohane, *Polymer*, 2008, **49**, 1993-2007.
98. J. Kopecek, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 2009, **47**, 5929.

99. J. P. Gong und W. Hong, *Soft Matter*, 2012, **8**, 8006-8007.
100. P. J. Flory und J. Rehner, *J. Chem. Phys.*, 1943, **11**, 521 - 527.
101. P. J. Flory, *J. Chem. Phys.*, 1950, **18**, 108 - 112.
102. R. Toomey, D. Freidank und J. Rühe, *Macromolecules*, 2004, **37**, 882-887.
103. I. Dimitrov, B. Trzebicka, A. H. E. Müller, A. Dworak und C. B. Tsvetanov, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 1275-1343.
104. N. Fechler, N. Badi, K. Schade, S. Pfeifer und J.-F. Lutz, *Macromolecules*, 2008, **42**, 33-36.
105. A. Bivigou-Koumba, E. Görnitz, A. Laschewsky, P. Müller-Buschbaum und C. Papadakis, *Colloid Polym.Sci.*, 2010, **288**, 499-517.
106. A. Miasnikova, Dissertation, Universität Potsdam, 2012.
107. C. Herfurth, Dissertation, Universität Potsdam, 2012.
108. S. Ahn, R. M. Kasi, S.-C. Kim, N. Sharma und Y. Zhou, *Soft Matter*, 2008, **4**, 1151-1157.
109. I. Tokarev und S. Minko, *Soft Matter*, 2009, **5**, 511-524.
110. J. A. Yoon, C. Gayathri, R. R. Gil, T. Kowalewski und K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 2010, **43**, 4791-4797.
111. J. A. Yoon, T. Kowalewski und K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, 2011, **44**, 2261-2268.
112. N. Welsch, A. L. Becker, J. Dzubiella und M. Ballauff, *Soft Matter*, 2012, **8**, 1428-1436.
113. A. Laschewsky, O. Ouari, C. Mangeney und L. Jullien, *Macromol. Symp.*, 2001, **164**, 323-340.
114. H. Ma, M. Wells, T. P. Beebe und A. Chilkoti, *Adv. Funct. Mater.*, 2006, **16**, 640-648.
115. X. Laloyaux, B. Mathy, B. Nysten und A. M. Jonas, *Langmuir*, 2010, **26**, 838-847.
116. P. Akkahat, W. Mekboonsonglarp, S. Kiatkamjornwong und V. P. Hoven, *Langmuir*, 2012.
117. Y. Lu, S. Chen, Y. Hu und T. C. Chung, *Polymer Int.*, 2004, **53**, 1963-1967.
118. R. Jordan und A. Ulman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 243-247.
119. S. Minko, Ed. M. Stamm, Springer Heidelberg, 2008, pp. 215-234.
120. D. Schmaljohann, D. Beyerlein, M. Nitschke und C. Werner, *Langmuir*, 2004, **20**, 10107-10114.
121. B. Voit, S. Gramm, V. Steinert, C. Werner und S. Zschoche, *Vakuum in Forschung und Praxis*, 2011, **23**, 29-33.
122. A. Nykänen, M. Nuopponen, A. Laukkanen, S.-P. Hirvonen, M. Rytelä, O. Turunen, H. Tenhu, R. Mezzenga, O. Ikkala und J. Ruokolainen, *Macromolecules*, 2007, **40**, 5827-5834.
123. G. Decher und J.-D. Hong, *Makromol. Chem. Macromol. Symp.*, 1991, **46**, 321-327.
124. P. Ott, K. Trenkenschuh, J. Gensel, A. Fery und A. Laschewsky, *Langmuir*, 2010, **26**, 18182-18188.
125. X. Zhang, C. Jiang, M. Cheng, Y. Zhou, X. Zhu, J. Nie, Y. Zhang, Q. An und F. Shi, *Langmuir*, 2012.
126. G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, London, 2008.
127. R. G. Acres, A. V. Ellis, J. Alvino, C. E. Lenahan, D. A. Khodakov, G. F. Metha und G. G. Andersson, *J. Phys. Chem. C*, 2012, **116**, 6289-6297.
128. A. B. Artyukhin, K. J. Burnham, A. A. Levchenko, R. V. Talroze und P. Stroeve, *Langmuir*, 2003, **19**, 2243-2248.
129. A. Fandrich, J. Buller, E. Wischerhoff, A. Laschewsky und F. Lisdat, *ChemPhysChem*, 2012, **13**, 2020-2023.
130. E. Wischerhoff, N. Badi, A. Laschewsky, J.-F. Lutz und H. G. Börner, Springer Berlin / Heidelberg, 2011, vol. 240, pp. 1-33.

131. J.-P. Fouassier und J. F. Rabek, *Radiation Curing in Polymer Science and Technology: Practical aspects and applications*, Springer, Barking, England, 1993.
132. N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, Sausalito, USA, 1991.
133. I. Fleming, *Grenzorbitale und Reaktionen organischer Verbindungen*, VCH, Weinheim, Deutschland, 1990.
134. S. K. Christensen, M. C. Chiappelli und R. C. Hayward, *Macromolecules*, 2012, **45**, 5237-5246.
135. S. Tocker, *Germany Pat.*, DE1504685A1, 1963, *Verfahren zur Herstellung geformter Gebilde*.
136. A. Vidyasagar, J. Majewski und R. Toomey, *Macromolecules*, 2008, **41**, 919-924.
137. M. E. Nash, W. M. Carroll, P. J. Foley, G. Maguire, C. O. Connell, A. V. Gorelov, S. Beloshapkin und Y. A. Rochev, *Soft Matter*, 2012, 3889-3899.
138. O. Prucker, C. A. Naumann, J. Rühe, W. Knoll und C. W. Frank, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 8766-8770.
139. N. Griep-Raming, M. Karger und H. Menzel, *Langmuir*, 2004, **20**, 11811-11814.
140. M. Junk, R. Berger und U. Jonas, *Langmuir*, 2010, **26**, 7262-7269.
141. B. D. Vogt, E. K. Lin, W.-l. Wu und C. C. White, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 12685-12690.
142. S. Gramm, Dissertation, Technische Universität Dresden, 2006.
143. H. G. Tompkins und W. A. McGahan, *Spectroscopic Ellipsometry and Reflectometry: A User's Guide*, John Wiley & Sons, New York, USA, 1999.
144. H. Stroppe, *Physik für Studenten der Natur- und Ingenieurwissenschaften*, Fachbuchverl. Leipzig im Carl-Hanser-Verl., Leipzig, Deutschland, 2005.
145. A. J. Tudos und R. B. M. Schasfoort, in *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, The Royal Society of Chemistry, 2008, pp. 1-14.
146. E. Kretschmann und H. Raether, *Z. Naturforsch., Teil A*, 1968, **23**, 2135-2136.
147. B. Liedberg, C. Nylander und I. Lunström, *Sensor Actuator*, 1983, **4**, 299-304.
148. A. Dirani, X. Laloyaux, A. E. Fernandes, B. Mathy, O. Schicke, O. Riant, B. Nysten und A. M. Jonas, *Macromolecules*, 2012.
149. J. W. McGinity, T. R. Patel, A. H. Naqvi und J. A. Hill, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1976, **2**, 505-519.
150. G. Dorman und G. D. Prestwich, *Biochemistry*, 1994, **33**, 5661-5673.
151. V. Kumar und D. Kalonia, *AAPS PharmSciTech*, 2006, **7**, E47-E53.
152. D. Pussak, M. Behra, S. Schmidt und L. Hartmann, *Soft Matter*, 2012, **8**.
153. D. Ruhlmann, K. Zahouily und J. P. Fouassier, *Eur. Polym. J.*, 1992, **28**, 1063-1067.
154. A. M. Rufs, A. Valdebenito, M. C. Rezende, S. Bertolotti, C. Previtali und M. V. Encinas, *Polymer*, 2008, **49**, 3671-3676.
155. P. Hrdlovič, I. Lukáč und I. Zvara, *Eur. Polym. J.*, 1981, **17**, 1121-1126.
156. G. Castro, S. Blanco und O. Giordano, *Molecules*, 2000, **5**, 424-425.
157. H. G. Elias, *Makromoleküle Band 1: Chemische Struktur und Synthesen*, Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
158. W. A. Pliskin und E. E. Conrad, *IBM J. Res. Dev.*, 1964, **8**, 43-51.
159. S. Franssila, in *Introduction to Microfabrication*, John Wiley & Sons, Ltd, New York, USA, 2010, pp. 503-504.
160. A. Erbe, Dissertation, Universität Potsdam, 2004.
161. M. Born und E. Wolf, *Principles of optics : electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2011.
162. N. A. Peppas, H. J. Moynihan und L. M. Lucht, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1985, **19**, 397-411.

163. T. Canal und N. A. Peppas, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1989, **23**, 1183-1193.
164. L. Pugliese, A. Coda, M. Malcovati und M. Bolognesi, *J. Mol. Biol.*, 1993, **231**, 698-710.
165. R. París und I. Quijada-Garrido, *Eur. Polym. J.*, 2009, **45**, 3418-3425.
166. E. A. Bekturov und Z. K. Bakauova, *Synthetic water-soluble polymers in solution*, Hüthig & Wepf, Basel, Switzerland, 1986.
167. T. Shikata, M. Okuzono und N. Sugimoto, *Macromolecules*, 2013, **46**, 1956-1961.
168. S. Sun und P. Wu, *Macromolecules*, 2010, **43**, 9501-9510.
169. C. Hashimoto, A. Nagamoto, T. Maruyama, N. Kariyama, Y. Irisa, A. Ikehata und Y. Ozaki, *Macromolecules*, 2013, **46**, 1041-1053.
170. Ö. Akdemir, N. Badi, S. Pfeifer, Z. Zarafshani, A. Laschewsky, E. Wischerhoff und J.-F. Lutz, *ACS Symp. Ser.*, 2009, **1023**, 189-202.
171. K. Otake, H. Inomata, M. Konno und S. Saito, *Macromolecules*, 1990, **23**, 283-289.
172. H. G. Schild und D. A. Tirrell, *J. Phys. Chem.* , 1990, **94**, 4352-4356.
173. C. Boutris, E. G. Chatzi und C. Kiparissides, *Polymer*, 1997, **38**, 2567-2570.
174. M. Donbrow, R. Hamburger und E. Azaz, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1975, **27**, 160-166.
175. M. Donbrow, E. Azaz und A. Pillersdorf, *J. Pharmaceut. Sci.*, 1978, **67**, 1676-1681.
176. L. C. Lopérgolo, A. B. Lugão und L. H. Catalani, *Polymer*, 2003, **44**, 6217-6222.
177. G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier Science, London, UK, 2010.
178. P. Theato und H. A. Klok, *Functional Polymers by Post-Polymerization Modification*, Wiley, Weinheim, 2012.
179. Y. Li, Y.-K. Gong, K. Nakashima und Y. Murata, *Langmuir*, 2002, **18**, 6727-6729.
180. Y. Zhang und P. S. Cremer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 658-663.
181. P. Tatar Güner und A. L. Demirel, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 14510-14514.
182. K. Skrabania, J. Kristen, A. Laschewsky, Ö. Akdemir, A. Hoth und J.-F. Lutz, *Langmuir*, 2006, **23**, 84-93.
183. J. Weiss, A. Li, E. Wischerhoff und A. Laschewsky, *Polymer Chemistry*, 2012, **3**, 352-361.
184. A. M. Al-Ghamdi und H. A. Nasr-El-Din, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1997, **125**, 5-18.
185. L. Schramm, *Surfactants*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2000.
186. T. Cai, W. J. Yang, Z. Zhang, X. Zhu, K.-G. Neoh und E.-T. Kang, *Soft Matter*, 2012, **8**, 5612-5620.
187. Y. Osada, *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 1979, **17**, 3485-3498.
188. F. E. Bailey, R. D. Lundberg und R. W. Callard, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, 1964, **2**, 845-851.
189. N. Kubota, N. Tatsumoto, T. Sano und Y. Matsukawa, *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, **80**, 798-805.
190. J. Klier, A. B. Scranton und N. A. Peppas, *Macromolecules*, 1990, **23**, 4944-4949.
191. F. Mallwitz und A. Laschewsky, *Adv. Mater.*, 2005, **17**, 1296-1299.
192. J. J. Harris, P. M. DeRose und M. L. Bruening, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 1978-1979.
193. J. Dai, A. W. Jensen, D. K. Mohanty, J. Erndt und M. L. Bruening, *Langmuir*, 2001, **17**, 931-937.
194. A. Zengin, E. Yildirim und T. Caykara, *J.Polym. Sci.; Part A: Polym. Chem.*, 2013, **51**, 954-962.
195. M. Wilchek, E. A. Bayer und O. Livnah, *Immunol. Let.*, 2006, **103**, 27-32.
196. X. Jiang, M. Ahmed, Z. Deng und R. Narain, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 994-1001.
197. J. Brandrup, E. H. Immergut und W. McDowell, *Polymer Handbook*, Wiley, New York, USA, 1975.

198. J. P. Magnusson, A. Khan, G. Pasparakis, A. O. Saeed, W. Wang und C. Alexander, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 10852-10853.
199. N. M. Green, *Biochem. J.*, 1965, **94**, 23c-24c.
200. M. Colonne, Y. Chen, K. Wu, S. Freiberg, S. Giasson und X. X. Zhu, *Bioconjugate Chem.*, 2007, **18**, 999-1003.
201. J. D. Hirsch, L. Eslamizar, B. J. Filanoski, N. Malekzadeh, R. P. Haugland, J. M. Beechem und R. P. Haugland, *Anal. Biochem.*, 2002, **308**, 343-357.
202. J. DeChancie und K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 5419-5429.
203. O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek und J. L. Sussman, *Proc Natl Acad Sci Unit States Am*, 1993, **90**, 5076-5080.
204. D. J. Vanderah, G. Valincius und C. W. Meuse, *Langmuir*, 2002, **18**, 4674-4680.
205. D. Sung, S. Park und S. Jon, *Langmuir*, 2009, **25**, 11289-11294.
206. E. Stenberg, B. Persson, H. Roos und C. Urbaniczky, *J. Colloid Interface Sci.*, 1991, **143**, 513-526.
207. A. Subramanian, J. Irudayaraj und T. Ryan, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **21**, 998-1006.

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

7.1 Abbildungen

Abbildung 1-1: Schema zur Zielstellung dieser Arbeit. **a)** Immobilisierung eines thermoresponsiven Hydrogels auf eine Oberfläche. **b)** Einstellen der Hydrogeleigenschaften: Das Hydrogel soll als Matrixmaterial für eine selektive Proteinbindung dienen. Zusätzlich soll getestet werden, ob das Hydrogel direkt auf eine Proteinbindung reagieren kann. 3

Abbildung 2-1: Strukturen häufig verwendeter thermoresponsiver Polymere mit zugehöriger LCST.[11] Von links nach rechts: Poly-(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM), Poly-(*N*-isopropylmethacrylamid) (PNIPMAM), Poly-(methylvinylether) (PMVE), Poly-(*N*-vinyl-ε-caprolactam), (PVCL), Poly-(2-ethyl-2-oxazolin), (PEtOx), Poly-((oligoethylenglykol)methylethermethacrylat), (POEGMA, LCST je nach Seitenkettenlänge). 9

Abbildung 2-2: a) Strategie für die Realisierung eines Antikörper-responsiven Hydrogels mittels kompetitiver Verdrängung nach Miyata et al..[85] *Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature,* T. Miyata et al., 1999, 399, 766-769, *copyright 1999.* 10

Abbildung 2-3: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm für Benzophenon bei 77 K.[132] Dargestellt sind die elektronischen Niveaus des Grundzustands S_0, der angeregten Singulettzustände S_1, S_2, der Triplettzustände T_1, T_2, sowie die Übergänge zwischen den Niveaus in Richtung des Grundzustands. Blaue, gekringelte Pfeile markieren strahlungslose Übergänge (Schwingungsrelaxation SR, Innere Umwandlung IC und Interkombination ISC), schwarze Pfeile Übergänge, die mit Aufnahme oder Abgabe elektromagnetischer Strahlung verbunden sind (Fluoreszenz F und Phosphoreszenz P). Aufgrund der geringen Energieunterschiede zwischen den Niveaus erfolgt die Interkombination sehr schnell. 17

Abbildung 2-4: Vernetzungsreaktion polymergebundener Benzophenone durch Photoaktivierung. Atom X steht für verschiedene Elemente: Kohlenstoff oder Heteroatome. Bei Heteroatomen mit freiem Elektronenpaar ist die H-Abstraktion energetisch begünstigt. 18

Abbildung 2-5: Links: Reflexion und Brechung eines polarisierten Lichtstrahls an einer Oberfläche. Bei der Reflexion ändert sich der Polarisationszustand. Rechts: Reflexion und Brechung eines Lichtstrahls an einem Multischichtsystem mit verschiedenen Brechungsindizes n. 20

Abbildung 2-6: Schematischer Aufbau eines Nullellipsometers: Das Licht fällt unter einem festen Winkel ϕ auf das Substrat. Der Polarisationszustand wird durch Polarisator und Kompensator bestimmt. Die optischen Elemente werden so eingestellt, dass nach Durchlaufen des Analysators die Lichtintensität minimal wird. 21

Abbildung 2-7: Reflektierte Intensität an einer Metalloberfläche in Abhängigkeit des Einstrahlwinkels. Oberhalb des Winkels der Totalreflexion θ_T erreicht die reflektierte Intensität ein Maximum. Beim Resonanzwinkel θ_{SPR-1} werden die Oberflächenplasmonen resonant angeregt. Binden Moleküle an die Metalloberfläche (grüne Kurve), verschiebt sich der Resonanzwinkel zu $\theta_{SPR-2.}$ 23

Abbildung 2-8: Aufbau eines SPR-Gerätes nach der Kretschmann-Konfiguration. Das Licht wird über ein Prisma auf die Metalloberfläche geleitet, wo es die Oberflächenplasmonen anregt. Die reflektierte Lichtintensität wird bei verschiedenen Winkeln θ über einen mit einem Goniometer verknüpften Detektor gemessen. 24

Abbildung 3-1: Syntheseschema für die frei radikalische Copolymerisation des photovernetzbaren Copolymers. 29

Abbildung 3-2: UV/vis – Spektrum des Monomers BPEM in n-Hexan (--- 10-fache Vergrößerung). 30

Abbildung 3-3: Polymerschichtdicken auf Siliziumwafern hergestellt durch Rotationsbeschichtung verschiedener Lösungen von Copolymer B-3a in Ethylacetat. Variation der Rotationsgeschwindigkeit und der Polymerkonzentration. Die Schichtdickenmessung erfolgte mittels Ellipsometrie. 33

Abbildung 3-4: Absorption einer 800 nm dicken BPEM-Copolymerschicht nach unterschiedlicher Bestrahlungsdauer mit UV-Licht (durchgezogene, schwarze Linie 0 min, --- 1 min,⋯2 min, -·- 3 min, ··- 4 min, --- 6 min, ⋯10 min, -·- 16 min). Inset: Abnahme des Absorptionsmaximums bei 287 nm mit fortwährender UV-Bestrahlung. 35

Abbildung 3-5: Stabilität der UV-vernetzten Schichten gegenüber dem Wasch- und Extraktionsprozess: Verbleibende Schichtdicke auf den Siliziumwafern nach dem Waschprozess. **a)** verbleibende Schichtdicke bei unterschiedlichem Vernetzeranteil im Copolymer. **b)** Vergleich der verbleibenden Schichtdicke von Copolymeren mit unterschiedlicher Molmasse und Vernetzeranteil. Grau, liniert: Copolymere mit niedrigerer Molmasse (M_n = 50 – 140 kg/ mol, Copolymere B-1, B-2a, B-3a, B-4), blau, kariert: Copolymere mit höherer Molmasse (M_n = 290 – 350 kg/ mol, Copolymere B-2b und B-3b). 37

Abbildung 3-6: Quellgrad bestimmt über ellipsometrische Messungen der Schichtdicke unter Wasser. Gequollene Schichten aus binären Copolymeren mit unterschiedlichen

Vernetzeranteilen x_{BPEM} (B-1, B-2a, B-3a, B-4). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung aus mehreren Messungen dar. Blaue, gestrichelte Linie: exponentieller Fit der Datenpunkte mit der Funktion $y = A \cdot x_{BPEM}^{-1/3}$ 38

Abbildung 3-7: Thermisch induzierter Kollaps einer Hydrogelschicht aus Copolymer T-3. Ellipsometrische Messungen der Schichtdicke und des Brechungsindex. (■) Schichtdicke, (Δ) Brechungsindex und (♦) Schichtdicke, berechnet aus dem Brechungsindex nach Formel 2-3 und Formel 2-4. 42

Abbildung 3-8: Thermoresponsiver Kollaps verschiedener Hydrogelschichten aus unterschiedlichen Copolymeren. Volle Symbole: Quellgrade SR der Hydrogelfilme in Wasser, bestimmt über die Schichtdicke aus ellipsometrischen Messungen. Offene Symbole: Trübungsmessungen der Copolymere in Wasser. **a)** ternäre Copolymere aus MEO_2MA, $OEGMA_{475}$ und BPEM. Dreiecke aufwärts (▲, Δ) für Copolymer T-4, Kreise (●, ○) für Copolymer T-3, Dreiecke abwärts (▼, ∇) für Copolymer T-1. 44

Abbildung 3-9: Quellgrad in mehreren Heiz- und Kühlzyklen für eine Hydrogelschicht aus dem thermoresponsiven Copolymer T-1. 46

Abbildung 3-10: Gravimetrisch bestimmte Quellgrade von makroskopischen Hydrogelen aus PNIPAM (■) und P(MEO_2MA-co-$OEGMA_{475}$) (●) bei unterschiedlichen Temperaturen. Die Quellgrade sind auf den größten Wert normiert. Die Linien dienen ausschließlich als Hilfslinien zur besseren Orientierung. 47

Abbildung 3-11: DSC-Thermogramme für makroskopische Hydrogele aus P(MEO_2MA-co-$OEGMA_{475}$) (- -) und PNIPAM (─). Dargestellt sind die Heizkurven mit einer Heizrate von 2K/ min. Die onset-Temperaturen ergeben sich aus dem Schnittpunkt der Tangenten an einen idealisierten symmetrischen Peak mit der Basislinie, die Wärmemenge aus der Peakfläche unter der Basislinie. 49

Abbildung 3-12: Lampenemissionsspektren der verwendeten UV-Lampen mit einem Strahlungsmaximum bei 366 nm (- -) und 254 nm (─). Aufgenommen mit einem photonischen Mehrkanalanalysator. 50

Abbildung 3-13: **a)** Nach dem Waschprozess verbleibende Schichtdicke nach verschiedenen Bestrahlungsdauern. **b)** Quellgrad der mit verschiedenen Bestrahlungsdauern hergestellten Hydrogelschichten. 52

Abbildung 3-14: Schema zur Vernetzung über Amidbildung: Synthese des Copolymers über frei radikalische Copolymerisation, Rotationsbeschichtung des Copolymers mit Jeffamin®

ED 900 und Erhitzen der beschichteten Substrate. Im Copolymer sind x = 9 und y = 1. In Jeffamin® ED 900 sind (p+r) ≈ 6; q ≈ 12,5. 55

Abbildung 3-15: Quellgrad bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Lösungsmitteln für eine Polymerschicht aus dem Copolymer P(MEO_2MA-co-MES), vernetzt mit 0,5 mol-% Jeffamin® ED 900. (,) Quellgrad in PBS-Puffer, (!) Quellgrad in Reinstwasser, (B) Quellgrad in Zitronensäurepuffer pH 5. 62

Abbildung 3-16: Polymerschichten mit verschiedenem Vernetzergehalt: Quellgrade bei verschiedenen Temperaturen. **a)** In Reinstwasser (schwarze, quadratische Symbole): (!) 0,5 % Vernetzer, ()) 1 % Vernetzer, (∀) 5 % Vernetzer. **b)** in PBS-Puffer (blaue, runde Symbole): (,) 0,5 % Vernetzer, (.) 1 % Vernetzer, (6) 5 % Vernetzer. 63

Abbildung 3-17: Schema für die Synthese des Biotinderivats BAPMA (oben) und die ternäre Copolymerisation mit MEO_2MA und $OEGMA_{475}$. 65

Abbildung 3-18: ^{1}H-NMR-Spektrum eines ternären Copolymers aus BAPMA, MEO_2MA und $OEGMA_{475}$, aufgenommen in $CDCl_3$.....66

Abbildung 3-19: UV-vis-Spektrum einer HABA-Avidin Lösung vor (- - -) und nach der Zugabe einer 0,05 g/ L Lösung des biotinhaltigen Polymers Bt-4. Die schwarze Linie (—) zeigt das Absorptionsspektrum von reinem HABA. 69

Abbildung 3-20: Trübungskurven des biotinylierten Copolymers Bt-4 ohne Avidin (■), mit 30 µmol/ L Avidin (□) und mit 45 µmol/ L Avidin (Δ). Die Messungen erfolgten in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). 70

Abbildung 3-21: Verschiebung des Trübungspunktes bei 50 % Transmission für biotinhaltige Copolymere unter dem Einfluss von Avidin. Die Avidinkonzentration beträgt jeweils 1 g/ L. **a)** Variation der Polymerkonzentration des Copolymers Bt-4 **b)** Variation des Biotingehalts im Copolymer (ξ Bt-1, 7 Bt-2, ! Bt-4). 71

Abbildung 3-22: Trübungskurven des biotinhaltigen Copolymers Bt-4 mit verschiedenen Mengen potentiell vorgesättigtem Avidin. Vor der Zugabe des Avidins zu der Polymerlösung wurde die dreifach molare Menge Biotin zugegeben: (!) 0 µmol/ L Avidin, (4) 65 µmol/ L Avidin vorbehandelt mit 195 µmol/ L Biotin, (K) 130 µmol/ L Avidin vorbehandelt mit 390 µmol/ L Biotin. 72

Abbildung 3-23: Kontrollversuche zur Spezifität des Einflusses von Avidin auf thermoreponsive biotinylierte Copolymere. **a)** Trübungskurve eines binären Copolymers aus MEO_2MA und $OEGMA_{475}$ (OEG-2) ohne Avidin (●) und mit 90 µmol/ L Avidin (○). **b)**

Trübungskurve des biotinhaltigen Copolymers Bt-4 allein (■) und des Copolymers in Gegenwart von 120 µmol/ L BSA (○). 74

Abbildung 3-24: Schema der Synthese von quarternären thermoresponsiven, photovernetzbaren Copolymeren mit Biotingruppen. 75

Abbildung 3-25: Sensorgramme von Hydrogelschichten aus Q-1 (─) und aus Q-5 (-··-). Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der unterschiedlichen Immobilisierungsschritte. BSA: Injektion einer Lösung aus BSA in PBS-Puffer (60 µmol/ L). s: Spülen mit PBS-Puffer. A: Injektion von 1 mL einer Lösung von Avidin in PBS (1,5 µmol/ L). B: Injektion von 1 mL einer Biotinlösung in PBS-Puffer (0,8 mmol/ L) 77

Abbildung 3-26: Quellgrade von Hydrogelschichten aus biotinhaltigen Copolymeren in PBS-Puffer bei unterschiedlichen Temperaturen. Vor- (!) und nach der Zugabe von 1,5 µmol/ L Avidinlösung (.), 15 µmol/ L Avidinlösung (7) und 0,8 mmol/ L Biotinlösung (X). **a)** Quellgrade einer Hydrogelschicht aus Q-1 mit 0,1 mol-% Photovernetzer. Der Wert in Klammern wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt. **b)** Quellgrade einer Hydrogelschicht aus Q-5 mit 0,5 mol-% Photovernetzer. Eingefügt: Vergrößerung für die Quellgrade der Hydrogelschicht Q-1. 83

Abbildung 3-27: Gravimetrisch bestimmte Quellgrade eines biotinhaltigen Hydrogels bei verschiedenen Temperaturen. Die Zusammensetzung des Hydrogels beträgt MEO_2MA/BAPMA/PEG_{20000}-Dimethacrylat 95/5/0,5. Quellgrade in PBS-Puffer (!) und in einer Avidinlösung (60 µmol/ L in PBS) (7). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus der gravimetrischen Bestimmung 6 verschiedener Hydrogelproben in PBS-Puffer und 3 verschiedener Hydrogelproben in Avidinlösung. Die Synthese der verschiedenen Hydrogelproben erfolgte in einem Reaktionsansatz. 85

7.2 Tabellen

Tabelle 3-1: Charakterisierung der synthetisierten Copolymere 31

Tabelle 3-2: Berechnung der Maschenweite in gequollenen Hydrogelschichten nach Formel 3-2 und Formel 3-3 aus vernetzten, binären Copolymeren 40

Tabelle 3-3: Nach dem Waschprozess verbleibende Schichtdicken der mit UV-Licht unterschiedlicher Wellenlänge vernetzten Polymerschichten 51

Tabelle 3-4: Herstellung und Charakterisierung der verschiedenen mittels thermischer Amidbildung vernetzten Hydrogelschichten 61

Tabelle 3-5: Charakterisierung der synthetisierten biotinhaltigen Copolymere 68
Tabelle 3-6: Charakterisierung der quarternären, photovernetzbaren Copolymere.....76

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Weder diese noch eine andere Arbeit wurde von mir an einer anderen Universität oder Hochschule zum Zwecke der Einleitung eines Promotionsverfahrens vorgelegt.

Potsdam, den _____

Jens Buller

Anhang

NMR-Spektren der neuen Monomere

Abbildung A-1: ^{1}H-NMR-Spektrum von BPEM in Aceton-d6…….……B

Abbildung A-2: ^{13}C-NMR-Spektrum von BPEM in Aceton-d6……B

Abbildung A-3: ^{1}H-NMR-Spektrum von BAPMA in DMSO-d6. In grau zum Vergleich das Spektrum von Biotin in DMSO-d6…….C

Abbildung A-4: ^{13}C-NMR-Spektrum von BAPMA in DMSO-d6……..……..C

Photos

Abbildung A-5: Bild von zwei mit OEG-Copolymer beschichteten Siliziumwafern. Links: Schichtdicke ca. 100 nm, rechts: Schichtdicke ca. 200 nm. Schichtdicken bestimmt mittels Ellipsometrie.....….....D

Abbildung A-6: Bild von zwei Hydrogelmonolithen basierend auf OEG. Links: gequollen, rechts:
getrocknet……...…….…….……...D

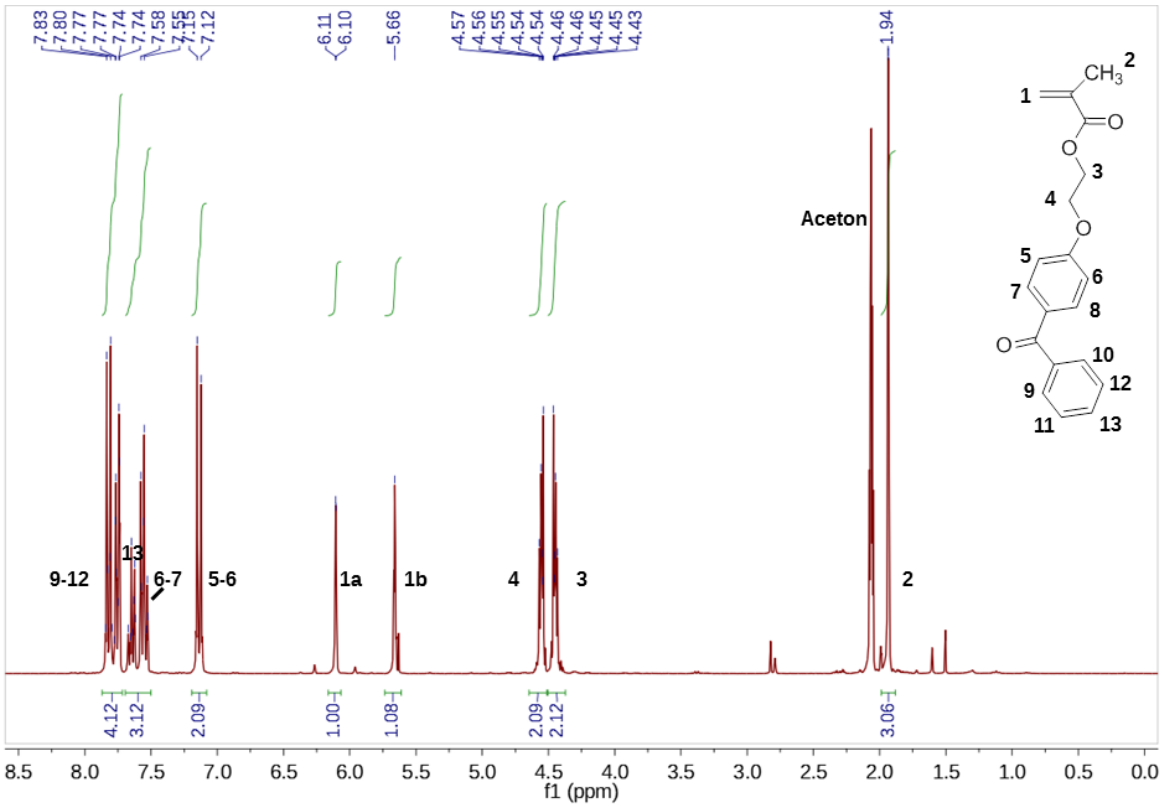


Abbildung A-1: ^{1}H-NMR-Spektrum von BPEM in Aceton-d6.

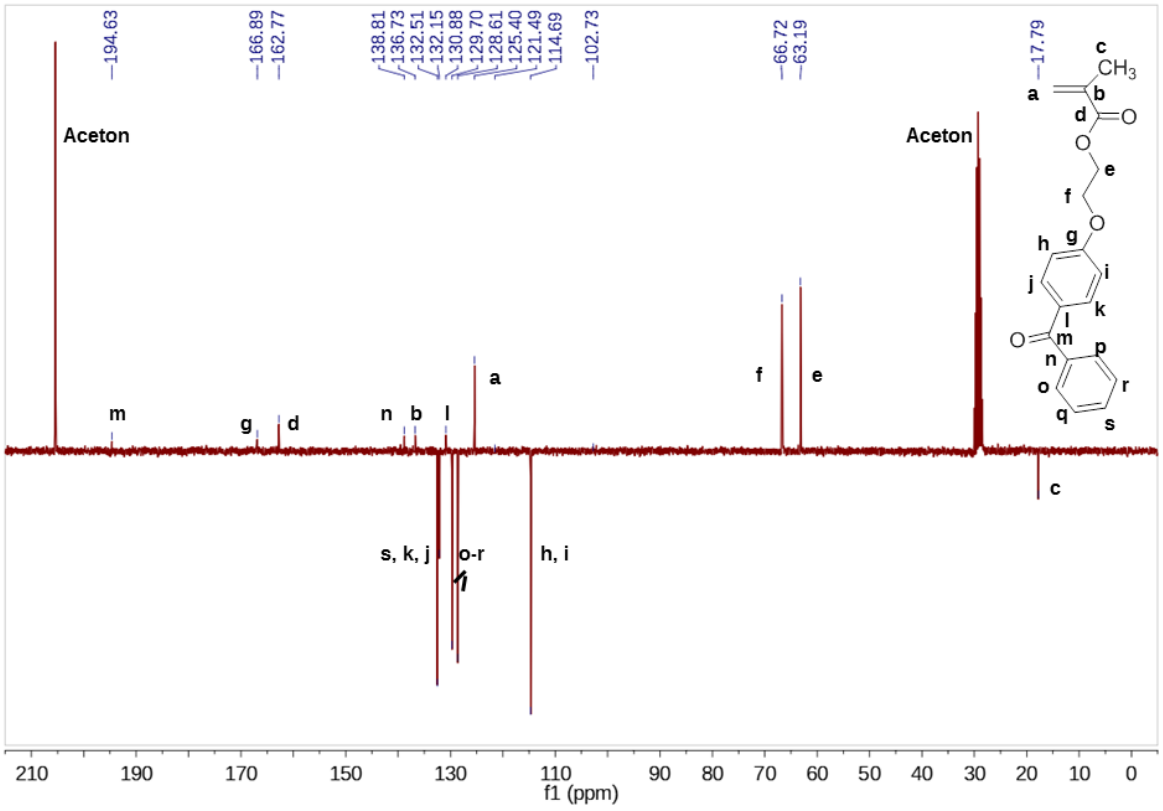


Abbildung A-2: ^{13}C-NMR-Spektrum von BPEM in Aceton-d6.

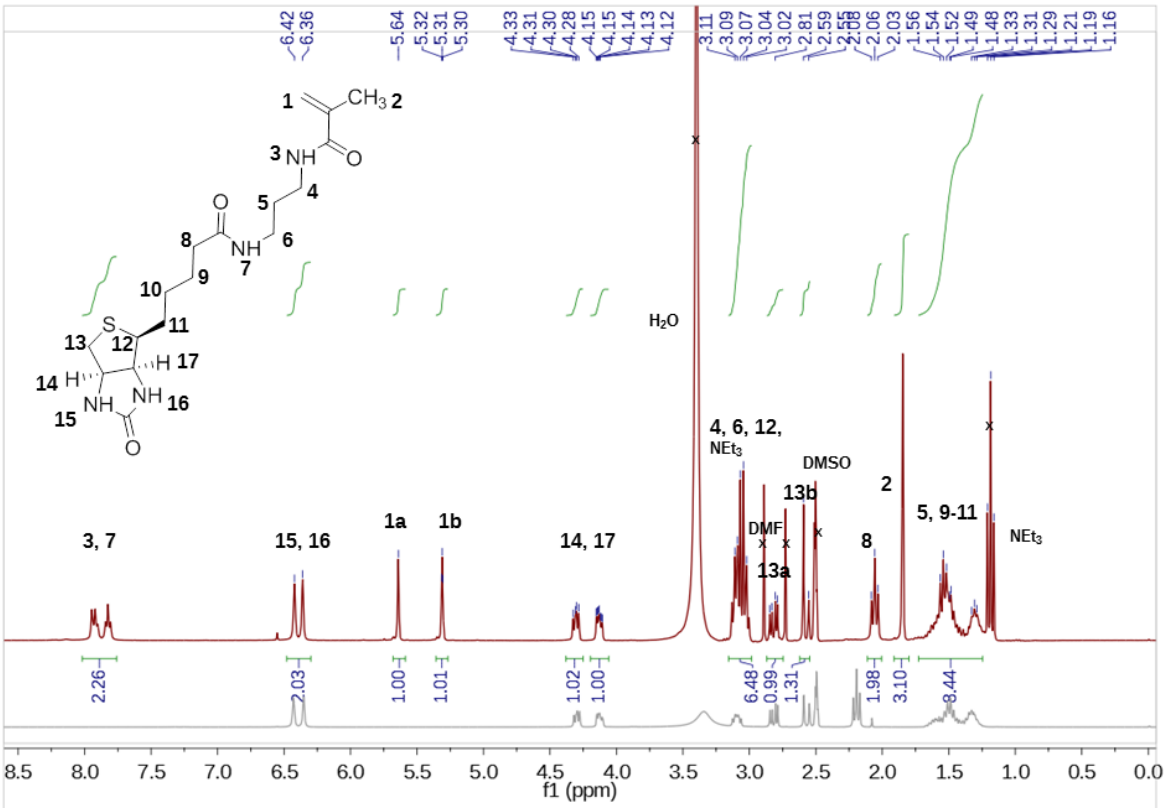


Abbildung A-3: ^{1}H-NMR-Spektrum von BAPMA in DMSO-d6. In grau zum Vergleich das Spektrum von Biotin in DMSO-d6.

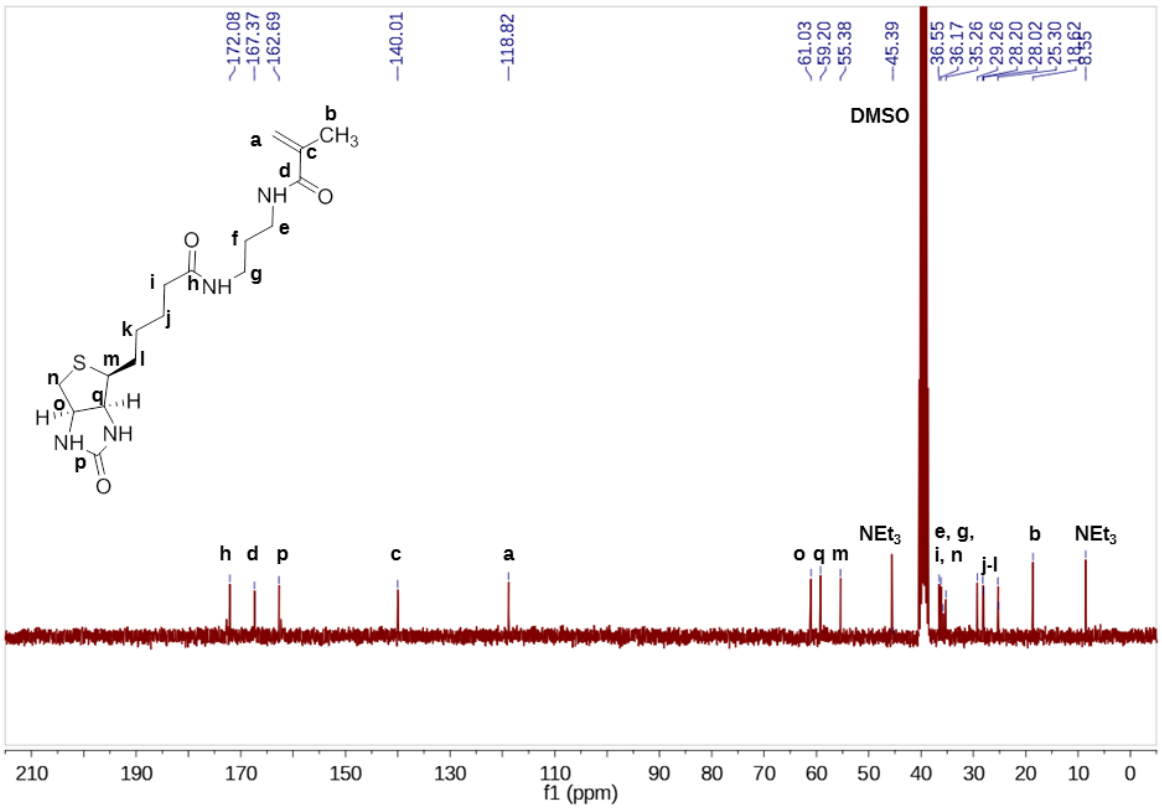


Abbildung A-4: ^{13}C-NMR-Spektrum von BAPMA in DMSO-d6.

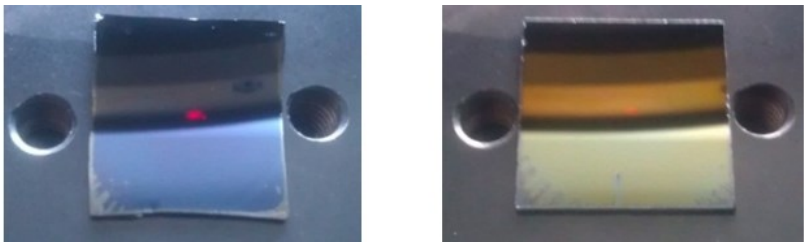


Abbildung A-5: Bild von zwei mit OEG-Copolymer beschichteten Siliziumwafern. Links: Schichtdicke ca. 100 nm, rechts: Schichtdicke ca. 200 nm. Schichtdicken bestimmt mittels Ellipsometrie.

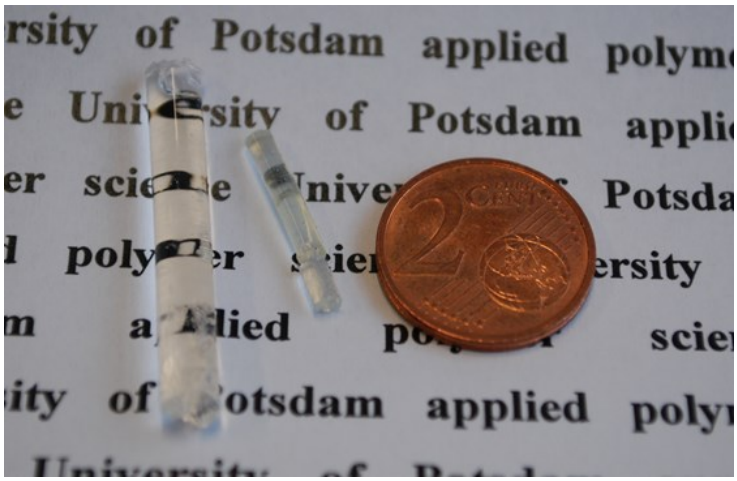


Abbildung A-6: Bild von zwei Hydrogelmonolithen basierend auf OEG. Links: gequollen, rechts: getrocknet.