

Funktionelle Oberflächenbeschichtungen und Nanomembranen zur Untersuchung von Biomolekülen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Julian Johannes Scherr
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2019

D30

Im Fachbereich 14 – Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. C. Glaubitz.

Gutachter: Prof. Dr. A. Terfort

Prof. Dr. D. Rhinow

Datum der Disputation:

Danksagung

Im Laufe der Bearbeitung meiner Dissertation haben mich viele Menschen begleitet, ohne die ich dieses Ziel nicht erreicht hätte und bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Terfort für die Möglichkeit, meine Promotion in seinem Arbeitskreis durchführen zu können, die innovativen Anregungen und gleichzeitige Freiheit bei der Wahl meiner Forschungsprojekte sowie die ständige Diskussionsbereitschaft. Wir hatten eine fruchtbare Zusammenarbeit und darüber hinaus ein sehr gutes persönliches Verhältnis.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Daniel Rhinow für die gute Zusammenarbeit, welche zu sehr guten Ideen und Forschungsprojekten geführt hat sowie die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Martin Kind, Felix Klockmann, Marc Zeplichal und Philipp Werner danke ich besonders für die Hilfe bei der Korrektur meiner Arbeit, die wissenschaftlichen Diskussionen und ihre großartige Kameradschaft. Insbesondere meinem Laborkollegen Felix danke ich dafür, dass er mich mit meinen Eigenheiten angenommen hat und wir eine produktive Zeit mit viel Spaß verbringen konnten.

Den weiteren Mitgliedern der beiden Arbeitsgruppen Terfort und Auner, Claudia Rittmeyer, Dr. Larissa Zherlitsyna, Sebastian Schneider, Ulrich Koch, Tobias Santowski, Alexander Sturm, Michael Gärtner, Christina Schulze, Adrian Wiesner, Sebastian Balsler, Joshua Gies, Mathias Rößling, Thorsten Hanf, Ise Uecker, Johannes Bernd, Christian Fischer, Sonja Katzbach, Michael Rudolph, Yiming Xian, Dr. Theresa Weber, Dr. Tarek Abu-Husein, Dr. Xiujun Yu, Thaleia Vavaleskou, Franco Di Gregorio, Gordon Keitl, Dr. Matthias Füser, Dr. Felix Neumeyer, Dr. Matthias Berger, Dr. Christoph E. C. Partes, Kathrin Barbe, und Dr. Zibin Zhang, danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft, eine wundervolle Arbeitsatmosphäre, ein konstruktives Miteinander und fantastische Grillabende.

Außerdem danke ich Herrn Feldhaar und dem Team der Institutswerkstatt Feinmechanik um Herrn Müller und Herrn Schmitt für ihre Unterstützung bei Problemen und der Realisierung technischer Projekte, Bernhard Klug für seinen Beistand bei Arbeiten im

Reinraum sowie Niklas Döring und Marion Basoglu für die Möglichkeit der Kritisch-Punkt-Trocknung.

Danken möchte ich auch den zahlreichen Bachelor- und Masterstudenten, Sebastian Balsler, Christian Fischer, Arno Förster, Joshua Gies, Marie-Lena Harwardt, Marcel Herzog, Lasse Hoffmann, Sebastian Holler, Florian Hurter, Johannes Keller, Philipp Kramer, Chantal Kunkel, Sebastian Mandel, Julian Massoth, Nathalie Meiser, Ines Katharina Müller, Sebastian Neumann, Dennis Pyper, David Ritter, Mathias Rößling, Alexander Scholz, Jana Sommer und Philipp Werner, welche mir bei der Umsetzung der vielen Projekte geholfen haben. Besonders danken möchte ich Sebastian Balsler für die ergebnisreiche Zusammenarbeit in der Entwicklung der SPHyNs.

Ferner danke ich meinen Kooperationspartnern aus den Arbeitsgruppen Turchanin, Rhinow und Lindhorst für ihre gute Arbeit und Unterstützung in den gemeinsamen Projekten.

Zuallerletzt möchte ich meinen größten Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Daniel dafür aussprechen, dass Sie immer an mich geglaubt und mich unterstützt haben.

***„Wer nichts als Chemie versteht,
versteht auch die nicht recht“***

Georg Christoph Lichtenberg
(1742 - 1799)

***Für meine Eltern,
Elke und Dietmar***

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Elektronenmikroskopie.....	3
1.1.1. Rasterelektronenmikroskopie	4
1.1.2. Transmissionselektronenmikroskopie.....	5
1.2. Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie von Biomolekülen	6
1.2.1. Probenpräparation für die Kryo-TEM	7
1.2.2. Trägermaterialien für die Kryo-TEM	8
1.2.2.1. Amorphe Kohlenstoffschichten	9
1.2.2.2. Kohlenstoffnanomembranen.....	10
1.2.2.3. Polymere Nanomembranen.....	11
1.2.3. Strukturberechnung von Biomolekülen mittels Kryo-TEM	11
1.3. Selbstanordnende Monoschichten	13
1.4. Adsorption von Proteinen an Oberflächen	15
1.5. Adhäsion von Bakterien an Oberflächen.....	16
1.6. Biorepulsive Oberflächen	17
1.6.1. Polyglycerolschichten	18
1.7. Spezifische Anbindung von Biomolekülen	20
1.8. Methoden zur Oberflächencharakterisierung	23
1.8.1. Grundlagen: Reflexion von Licht an Metalloberflächen	23
1.8.2. Grundlagen: Reflexion und Transmission in Mehrschichtsystemen	25
1.8.3. Ellipsometrie	28
1.8.3.1. Bestimmung des Brechungsindex und der Schichtdicke.....	29
1.8.4. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	30
1.8.4.1. Aufbau eines SPR-Spektrometers.....	34
1.8.5. Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie.....	36
1.8.6. Röntgenphotoelektronenspektroskopie.....	37

2.	Die bearbeiteten Themen im übergeordneten Zusammenhang	39
3.	Bearbeitete Projekte: Innovative Trägermaterialien für die Kryoelektronenmikroskopie	43
3.1.	Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie von Membranproteinen	43
3.2.	Aufbau kontinuierlicher Hydrogel-Nanomembranen durch Quervernetzung.....	47
3.2.1.	Herstellung von Hydrogel-Nanomembranen durch Quervernetzung von Polyglycerol mit EGDGE und deren Charakterisierung	47
3.2.2.	TEM-Untersuchungen der Hydrogel-Nanomembranen	51
3.2.3.	Schlussfolgerungen	52
3.2.4.	Experimentelles.....	53
3.3.	Selbst-perforierende Hydrogel-Nanomembranen zur Verbesserung der Proteinverteilung auf TEM-Netzen	55
3.3.1.	Herstellung und Charakterisierung selbst-perforierender Hydrogel-Nanomembranen.....	56
3.3.2.	Untersuchungen der Proteinverteilung mittels Kryo-TEM.....	61
3.3.3.	Schlussfolgerungen	65
3.4.	Nicht-kovalente Funktionalisierung amorpher Kohlenstofffilme	67
3.4.1.	Synthese Pyren-haltiger Polyglycerolderivate.....	68
3.4.2.	Funktionalisierung und Charakterisierung amorpher Kohlenstofffilme mit Polyglycerol	71
3.4.3.	Untersuchungen der Proteinverteilung mittels Kryo-TEM.....	73
3.4.4.	Herstellung eines Hydrogel-funktionalisierten Netzwerkes aus einwandigen Kohlenstoffnanoröhren	75
3.4.5.	Untersuchungen eines Hydrogel-funktionalisierten Kohlenstoffnanoröhren-Netzwerkes hinsichtlich der Reduktion der Elektronenstrahl-induzierten Bewegung von Partikeln.....	78
3.4.6.	Schlussfolgerungen	81
3.5.	Funktionalisierte Kohlenstoffnanomembranen mit spezifischen Anbindungsstellen	83

3.5.1.	Biorepulsive Funktionalisierung von Kohlenstoffnanomembranen mit Polyglycerol	84
3.5.2.	Untersuchungen zur spezifischen Anbindung von Proteinen über Ethylendiamintetraessigsäure	88
3.5.2.1.	Funktionalisierung von PG-Oberflächen mit EDTA	89
3.5.2.2.	Proteinanbindung an die mit EDTA-funktionalisierten PG-Oberflächen....	92
3.5.3.	Untersuchungen zur spezifischen Anbindung von Proteinen über ein Nitrilotriessigsäure-Derivat	96
3.5.3.1.	Synthese des multivalenten NTA-Derivates	98
3.5.3.2.	Funktionalisierung von PG-Oberflächen mit NTA ₄ Cyclen.....	99
3.5.3.3.	Proteinanbindung an die mit NTA ₄ Cyclen-funktionalisierten PG-Oberflächen.....	102
3.5.3.4.	TEM-Untersuchungen der mit NTA ₄ Cyclen funktionalisierten PG-CNM	104
3.5.4.	Schlussfolgerungen	107
3.5.5.	Experimentelles.....	108
4.	Bearbeitete Projekte: Mehrkomponenten Strukturierung von Kohlenstoffnanomembranen mittels Laserablation.....	113
4.1.	Herstellung strukturierter CNMs mittels DLP.....	113
4.2.	Schlussfolgerungen.....	118
5.	Bearbeitete Projekte: DMAP-vermittelte Ligationsstrategie zur Modifizierung des bakteriellen Lektins FimH.....	121
5.1.	Untersuchung der DMAP-vermittelten Ligation anhand einer FimH Modelloberfläche.....	121
5.1.1.	Untersuchungen von mixed-SAMs als Modelloberfläche für FimH.....	124
5.1.1.1.	Synthese der SAM-bildenden Moleküle.....	125
5.1.1.2.	Herstellung und Charakterisierung der gemischten SAMs.....	125
5.1.2.	Untersuchungen der DMAP-vermittelten Ligation anhand eines bakteriellen Adhäsionstests	128
5.1.3.	Schlussfolgerungen	131

5.1.4. Experimentelles.....	132
6. Zusammenfassung.....	141
7. Literaturverzeichnis	151
8. Abkürzungsverzeichnis.....	163
9. Eigene Anteile an Veröffentlichungen in Fachjournalen.....	167

1. Einleitung

In einem lebenden Organismus laufen ständig biologische Prozesse ab, welche diesen am Leben erhalten, aber auch dessen Tod herbeiführen können. Die biologischen Prozesse sind durch die Interaktion einer Fülle verschiedener Biomoleküle miteinander bestimmt, welche durch die Biochemie auf molekularer Ebene untersucht und beschrieben werden. Zu den Biomolekülen zählen neben einer Vielzahl kleiner organischer Verbindungen, die in einem Organismus vorkommen, auch Makromoleküle wie Polysaccharide, Nukleinsäuren oder Proteine. Viele Makromoleküle falten sich in eine definierte dreidimensionale Struktur, die für ihre biologische Funktion wichtig ist. Veränderungen der Biomoleküle oder der biologischen Abläufe, in welche diese involviert sind, können zur Erkrankung des Organismus führen. Allein die Veränderung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen kann zu schweren Krankheiten wie Alzheimer oder Parkinson führen.¹ Aus diesem Grund ist ein Verständnis der biologischen Vorgänge und die Kenntnis der Struktur der beteiligten Biomoleküle entscheidend, um die Entstehung von Krankheiten verstehen und verhindern zu können oder eine Therapie von Patienten zu ermöglichen.

Eine Möglichkeit zur Aufklärung der Struktur eines Biomoleküls stellt die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) dar. Seit 60 Jahren werden Elektronenmikroskope verwendet, um inerte Materialien mit hochfokussierten Elektronenstrahlen zu untersuchen. Die Aufnahme von hochauflösenden mikroskopischen Bildern von sensitiven biologischen Proben war jedoch aufgrund der hochenergetischen Strahlung lange nicht möglich.² Die moderne Kryo-EM begann mit der Weiterentwicklung der Probenpräparation durch Dubochet *et al.*, bei welcher die zu untersuchenden Biomoleküle in einer dünnen Schicht aus amorphem Eis ausgefroren werden. Hierdurch können deren Strukturen unter nahezu nativen Bedingungen mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) mit niedriger Elektronendosis beobachtet werden.^{3,4} Seitdem wurden Strukturen von Biomolekülen mit immer weiter verbesserter Auflösung publiziert. Seit 2013 nahm diese Entwicklung rasant zu, was insbesondere auf die Entwicklung einer neuen Generation von Elektronendetektoren und Verbesserungen in der Bildverarbeitung zurückzuführen ist. Die Aufnahme von Daten in bisher nicht

bekannter Qualität und die Möglichkeit, Elektronenstrahl-induzierte Bewegungen computerunterstützt zu korrigieren, führten zu Auflösungen besser als 3 Å.⁵

Der im Jahr 2017 an Jacques Dubochet, Joachim Frank und Richard Henderson verliehene Nobelpreis für Chemie honorierte die Leistungen in der Weiterentwicklung der Kryo-EM. Trotz des Fortschrittes, welcher durch die neuen Entwicklungen erlangt werden konnte, ist die Strukturaufklärung vieler Biomoleküle schwierig, da die Herstellung qualitativ hochwertiger Proben, die sich für eine hochauflösende Mikroskopie eignen, schwierig ist. Viele Faktoren, wie die Reinheit der Probe, das Puffermedium oder intrinsische Eigenschaften der Biomoleküle, können zu Inhomogenitäten führen. Die Präparation einer homogenen Probe mit einer ausreichend hohen Proteinkonzentration ist oftmals eine Herausforderung.⁶

Neben der Kenntnis der Struktur eines Biomoleküls sind die Wechselwirkungen von Biomolekülen untereinander zum Verständnis biologischer Prozesse auf molekularer Ebene von Bedeutung. Eine Möglichkeit zur Erforschung der Wechselwirkungen von Biomolekülen ist die Herstellung biomimetischer Oberflächen. Diese Oberflächen ahmen eine biologische Vorlage nach und ermöglichen die Betrachtung der Interaktion der nachgebildeten Oberflächen mit anderen Biomolekülen. Anschließend können die daraus gewonnenen Erkenntnisse wieder auf die biologische Vorlage übertragen werden. Hierdurch werden die Untersuchungen von Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen sowie von den dabei zugrundeliegenden Adhäsionsmechanismen möglich.⁷ Beispielsweise wurde eine Oberfläche hergestellt, welche die Kohlenhydratoberfläche einer Zelle nachahmt und zusätzlich eine photochemische Schaltung der Kohlenhydrateinheiten ermöglicht. Die Adhäsion eines Bakteriums an diese Oberfläche konnte aufgrund der Wechselwirkung von bakteriellen Proteinen mit den Kohlenhydrateinheiten photochemisch gesteuert werden.⁸ Derartige Systeme erlauben, ein tieferes Verständnis für die molekularen Prozesse in biologischen Systemen zu entwickeln.

In dieser Arbeit werden Projekte beschrieben, welche neuartige Materialien zur Untersuchung von Biomolekülen, insbesondere Proteinen, entwickeln. Ein Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Materialien, welche die Präparation von Biomolekülen zur Bestimmung ihrer Struktur mittels Kryo-TEM vereinfachen. Ein anderer Teil beschäftigt

sich mit biomimetischen Materialien, welche die Struktur eines Biomoleküls oder eines Ensembles von Biomolekülen nachahmen und deren Untersuchung ermöglichen.

1.1. Elektronenmikroskopie

In der Elektronenmikroskopie wird die zu untersuchende Probe mithilfe von Elektronen abgebildet, wobei es zwei hauptsächlich verwendete Arten von Elektronenmikroskopien gibt: Die Rasterelektronenmikroskopie (REM; scanning electron microscopy, SEM) und die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM).

Die REM ist eine Methode zur Untersuchung von Oberflächen, indem diese mit einem stark fokussierten Elektronenstrahl entlang eines Rasters abgefahren werden. Die entlang des Rasters aufgrund verschiedener Prozesse von der Probe ausgesendeten Elektronen werden detektiert und ein Abbild der Oberfläche erhalten. In der TEM wird die zu untersuchende Probe von einem Elektronenstrahl durchstrahlt und, vergleichbar zu einem Lichtmikroskop, auf einem Flächendetektor abgebildet. Die REM erreicht Auflösungen im Bereich weniger Nanometer,⁹ wohingegen die TEM sogar Auflösungen von etwa einem Ångström ermöglicht.¹⁰

Generell wird beim Arbeiten mit freien Elektronen in einem Elektronenmikroskop ein Vakuumsystem benötigt, um Zusammenstöße der Elektronen mit Gasmolekülen zu vermeiden und Bauteile, wie die Elektronenquelle, zu schützen. Es gibt verschiedene Methoden, um den für die Elektronenmikroskopie benötigten Elektronenstrahl zu erzeugen. Häufig verwendete Elektronenquellen basieren auf der thermischen Emission von Elektronen (Wolfram-Haarnadelkathode oder Lanthanhexaborid (LaB₆)-Kathode) oder dem Anlegen einer hohen Spannung an eine dünne Metallspitze (Feldemissionskathode). Anschließend werden die aus der Kathode ausgetretenen freien Elektronen im elektrischen Feld beschleunigt.^{9,10}

Der erzeugte Elektronenstrahl muss weiterhin mithilfe eines elektromagnetischen Linsensystems fokussiert werden. Elektromagnetische Elektronenlinsen bestehen aus einer Spule, deren magnetisches Feld eine Kraft auf die Elektronen ausübt und diese zur optischen Achse lenkt. In der TEM ist aufgrund der kleinen Wellenlänge eines beschleunigten Elektrons gemäß der Theorie von Abbe¹¹ eine Auflösung von wenigen

Picometern möglich. Im Gegensatz zu einem Lichtmikroskop kommen jedoch keine geschliffenen, optischen Linsen, sondern elektromagnetische Elektronenlinsen zum Einsatz. Es ist nicht möglich, eine fehlerfreie elektromagnetische Elektronenlinse zu verwirklichen. Dies führt dazu, dass in der Elektronenmikroskopie Abbildungsfehler ein größeres Problem darstellen und das Auflösungsvermögen eines Elektronenmikroskops herabgesetzt wird.¹⁰ Anschließend wird der fokussierte Elektronenstrahl auf die Probe gelenkt und zur Erzeugung eines Abbildes der Probe genutzt. Hier unterscheiden sich die REM und TEM grundlegend.

1.1.1. Rasterelektronenmikroskopie

In einem REM wird in einer Hochvakuumkammer ein Elektronenstrahl erzeugt und fokussiert. Der erzeugte Elektronenstrahl wird mithilfe eines Ablenkungssystems entlang eines Rasters schnell über die Probe hinwegbewegt. Hierdurch wird der gesamte zu untersuchende Bereich der Probe bestrahlt. An jedem Punkt werden die von der Probe ausgehenden Elektronen detektiert, wodurch ein Abbild der Probe entsteht (siehe Abbildung 1).⁹

Verschiedene Prozesse führen zu den von der Probe ausgehenden Elektronen. Hauptsächlich werden jedoch die von der Probe zurückgestreuten Elektronen und emittierten Sekundärelektronen zum Abbilden der Probe genutzt. Trifft der Primärelektronenstrahl auf die Probe, kommt es zu elastischen und inelastischen Stößen mit den Atomen in der Oberfläche. Bei der elastischen Streuung von Elektronen an der Probe werden die Elektronen mit praktisch gleicher kinetischer Energie von der Probe zurückgestreut. Das bedeutet, die Energie dieser rückgestreuten Elektronen liegt im Bereich mehrerer keV. Stoßen die Elektronen inelastisch mit Atomen in der Oberfläche zusammen, kommt es zur Erzeugung von Sekundärelektronen. Sekundärelektronen entstehen durch das Herauslösen von schwach gebundenen Elektronen aus dem Festkörper und besitzen üblicherweise eine kinetische Energie im Bereich weniger Elektronenvolt. Zur Detektion werden häufig Elektronenzintillationsdetektoren oder Halbleiterdetektoren verwendet.⁹

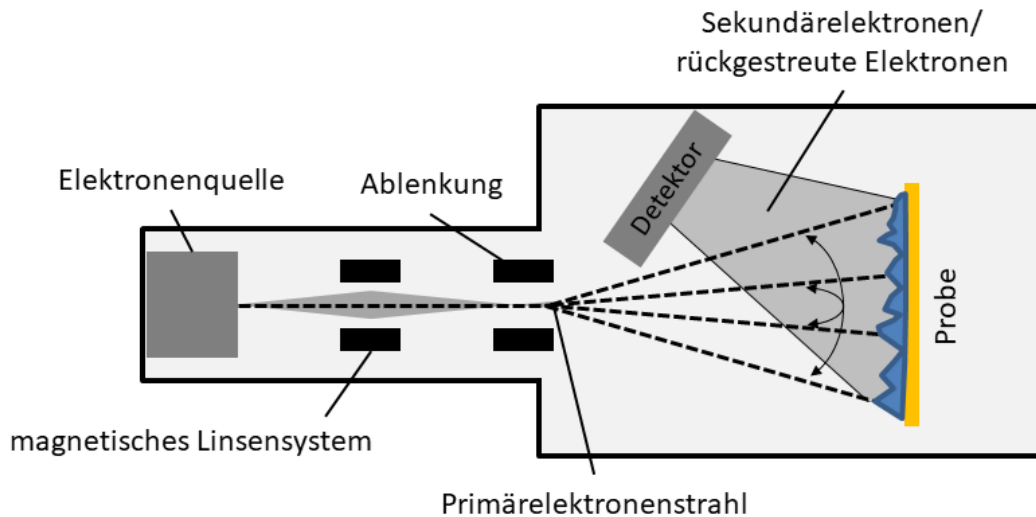


Abbildung 1: Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops: Der Elektronenstrahl wird durch magnetische Linsen fokussiert und auf die Probe abgelenkt (Primärelektronenstrahl). Die von der Probe ausgehenden Elektronen (rückgestreute und Sekundärelektronen) können detektiert und ein Abbild der Probe erhalten werden.

1.1.2. Transmissionselektronenmikroskopie

Der schematische Aufbau eines TEMs ist in Abbildung 2 dargestellt. Dieses besteht aus einer Vakuumkammer mit Vakuumsystem (nicht dargestellt), in welcher eine Elektronenquelle einen Elektronenstrahl erzeugt. Dieser trifft durch ein elektromagnetisches Linsensystem auf die Probe, wodurch diese parallel beleuchtet wird.¹⁰

Beim Durchgang durch die Probe werden die Elektronen durch elastische und inelastische Stöße an den Atomkernen abgelenkt. Hierdurch wird ein Abbild der vom Elektronenstrahl durchleuchteten Probe erhalten. Der Kontrast im TEM entsteht vornehmlich durch die Massenzahl der in der Probe enthaltenen Elemente. Dicke Probenbereiche und Areale mit schwereren Atomen erscheinen dunkler.¹² In der Kryo-EM biologischer Moleküle, welche aus leichten Elementen (kleine Kernladungszahl) bestehen, wird hauptsächlich der Phasenkontrast zur Bilderzeugung verwendet.¹³

Hinter der Probe befindet sich ein weiteres elektromagnetisches Linsensystem (Objektiv und Projektive). Dieses erzeugt ein vergrößertes Bild der Probe, welches auf dem Bildschirm abgebildet wird. Zur Darstellung des Endbildes kann beispielsweise ein Photofilm, Leuchtschirm oder ein CCD-Detektor verwendet werden. Die digitale

Bilderfassung hat jedoch die Aufnahme auf Photofilmen praktisch ersetzt, da diese anschließend zur standardmäßig computerunterstützten Analyse digitalisiert werden müssen.^{10,13}

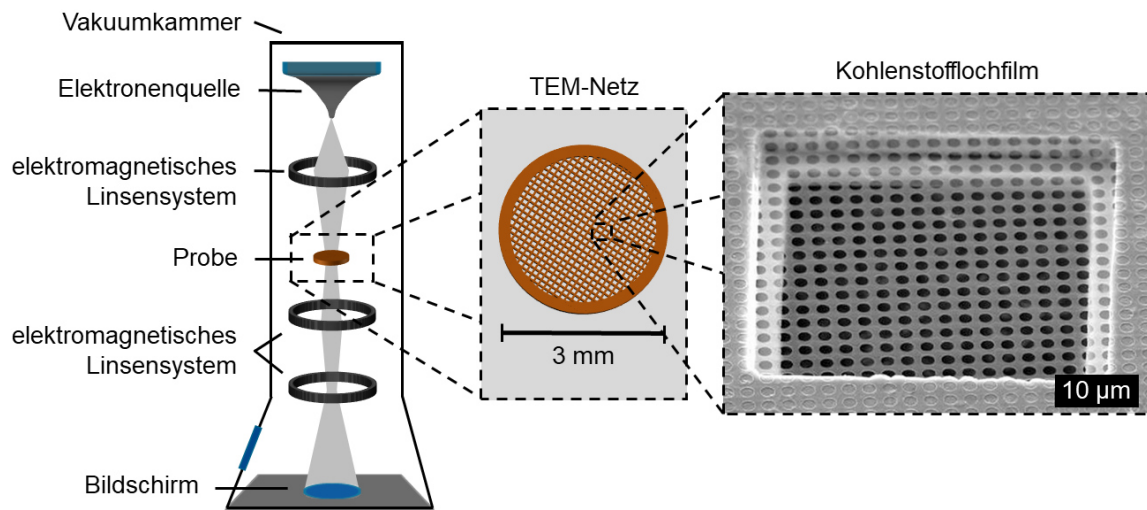


Abbildung 2: Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM), TEM-Netz und Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines amorphen Kohlenstofflochfilms¹⁴ (mit freundlicher Genehmigung der Firma Quantifoil®). Ein TEM besteht aus einer Vakuummutter, in welcher ein Elektronenstrahl erzeugt wird, der durch elektromagnetische Linsen auf die Probe gerichtet wird und diese durchstrahlt. Ein weiteres elektromagnetisches Linsensystem vergrößert das Bild der Probe und bildet es auf einem Bildschirm ab. Die zu untersuchenden Biomoleküle (Probe) werden auf einem amorphem Kohlenstofflochfilm, welcher von einem TEM-Netz gestützt wird, präpariert.

Die Probe wird auf einem kreisförmigen TEM-Netz mit einem Durchmesser von 3 mm präpariert und in dem Probenhalter fixiert. Das Metallnetz hat üblicherweise eine Maschengröße von einigen 10 bis zu mehreren hundert Mikrometern. Für TEM an Biomolekülen haben sich zudem amorphe Kohlenstofflochfilme als Trägermaterial bewährt.

1.2. Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie von Biomolekülen

Die Kryo-TEM erlaubt die Untersuchung biologischer Proben bei tiefen Temperaturen in einem nahezu nativen Umfeld. Die Methode ermöglicht hierdurch die Auflösung

Molekularer Strukturen von Biomolekülen, wodurch ein Verständnis für biologische Abläufe entwickelt werden kann.²

Um die biologische Probe bei tiefen Temperaturen in einem TEM mikroskopieren zu können, muss diese zunächst in geeigneter Weise präpariert werden.

1.2.1. Probenpräparation für die Kryo-TEM

Die Präparation von Biomolekülen für die Kryo-TEM erfolgt üblicherweise auf einem TEM-Netz, das mit einem Lochfilm bedeckt ist. Je nach Probenanforderung sind TEM-Netze aus verschiedenen Materialien (Kupfer, Gold, Molybdän, Siliziumnitrid oder Siliziumoxid) erhältlich. Die darauf liegenden Lochfilme bestehen üblicherweise aus Kohlenstoff, aber auch Gold oder Siliziumverbindungen finden hier Anwendung. Außerdem kommen verschiedene Lochgrößen und Geometrien zum Einsatz. Je nach Probeneigenschaften oder Anforderungen des Experiments muss das Netz-Material oder die Lochgeometrie angepasst werden. Aufgrund der Haftungseigenschaften der Biomoleküle kann es zusätzlich notwendig sein, den Lochfilm vorzubehandeln (z.B. mittels Plasma), um eine optimale Verteilung der Biomoleküle in der Eisschicht zu erhalten.¹⁵ Von entscheidender Bedeutung ist auch die Vorbereitung der zu mikroskopierenden Probe. Diese sollte möglichst nur das zu untersuchende Biomolekül enthalten, um eine homogene Kryo-Probe zu erhalten. Hierfür sind oftmals viele Reinigungsschritte notwendig.⁶

Die Biomoleküle werden in einer vorzugsweise dünnen Schicht aus amorphem Eis (<20 nm)¹⁶ in den Löchern des Trägermaterials fixiert. Hierfür muss die wässrige Probe schnell ($\sim 10^6$ °C/sec) gefroren werden.³ Dies ist notwendig, um die Ausbildung von Eiskristallen zu vermeiden und einen amorphen Eisfilm zu erhalten. Eiskristalle sind im TEM sichtbar¹⁷ und erschweren oder verhindern hierdurch die Mikroskopie des zu untersuchenden Biomoleküls. Außerdem kann ein langsames Frieren biologischer Proben Einfluss auf die Struktur der enthaltenen Biomoleküle haben und diese verändern.¹⁸ Es wird darauf geachtet, dass die Eisschicht nicht zu dick ist, um eine optimale Dichte an Biomolekülen im Eis zu erhalten (siehe Abbildung 3).

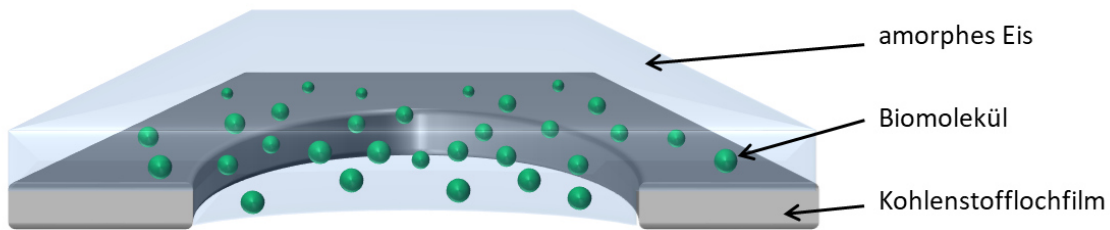


Abbildung 3: Präparierte Kryo-Probe: Die Biomoleküle sind in einer dünnen Schicht aus amorphem Eis, welches das Loch eines Kohlenstofflochfilms überspannt, fixiert.

In Abbildung 4 ist die Präparation von Kryo-Proben dargestellt. Hierzu wird eine kleine Menge der Probenlösung, welche das Biomolekül gelöst in einem Puffermedium enthält, auf das Netz aufgetragen. Unter genau kontrollierten Bedingungen wird überschüssige Lösung durch Kontakt mit einem Filterpapier entfernt (sog. „Blotting“). Abschließend wird die Probe sofort durch Eintauchen in ein flüssiges Kryogen (häufig flüssiges Ethan) gefroren und in einen gekühlten Kryo-Halter überführt.¹⁵

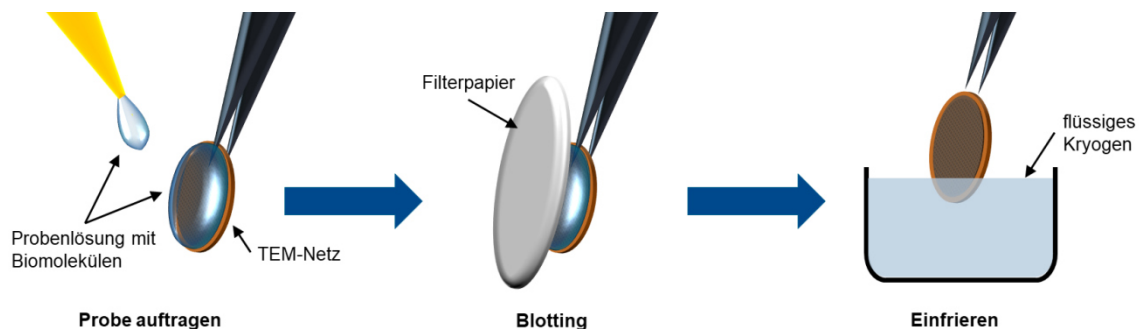


Abbildung 4: Probenpräparation für die Kryo-TEM: Die Probe wird auf einem Lochfilm, welcher auf einem TEM-Netz fixiert ist, aufgetragen. Anschließend wird überschüssige Lösung durch kurzen Kontakt mit einem Filterpapier entfernt und die Probe rasch eingefroren.¹⁵

1.2.2. Trägermaterialien für die Kryo-TEM

An Trägermaterialien für die Kryo-Elektronenmikroskopie werden spezielle Anforderungen gestellt. Idealerweise sind die Materialien bei den tiefen Temperaturen, bei denen das Experiment durchgeführt wird, leitfähig, um Ladungen abführen zu können. Hierdurch werden Aufladungseffekte, welche zu einer Unschärfe des Bildes

führen, vermieden. Werden kontinuierliche Filme verwendet, sollten die Materialien möglichst dünn sein (im Optimalfall eine Atomlage dick), um das Rauschen aufgrund inelastischer Streuung der Elektronen gering zu halten. Außerdem müssen die Materialien im Elektronenstrahl relativ stabil sein. Graphen bietet diese Eigenschaften und ist in dieser Hinsicht ein optimaler Trägerfilm,¹⁹ aber auch andere Materialien, wie amorphe Kohlenstofffilme, Kohlenstoffnanomembranen²⁰ (engl. *Carbon nanomembranes*, CNMs) oder organische Filme,²¹⁻²³ eignen sich.

1.2.2.1. Amorphe Kohlenstoffschichten

Amorphe Kohlenstofflochsichten sind das am häufigsten verwendete Material zur Präparation biologischer Proben für die Kryo-TEM. Es finden sowohl kontinuierliche als auch löchrige Kohlenstofffilme Anwendung. Diese Lochfilme können durch Photolithographie hergestellt werden. Hierfür wird ein Siliziumwafer mit einer Schicht aus Gelatine, welche mit Glutaraldehyd quervernetzt wird, beschichtet. Auf diese Lage wird ein Photolack aufgebracht und durch eine Maske belichtet. Im Anschluss an die Belichtung wird die quervernetzte Schicht aus Gelatine enzymatisch verdaut, der strukturierte Photolack abgehoben und auf das TEM-Netz übertragen. Im Vakuum wird eine Schicht Kohlenstoff auf dem Photolack aufgebracht. Abschließend wird der Photolack entfernt und hierdurch ein TEM-Netz erhalten, welches mit dem strukturierten Kohlenstofflochfilm beschichtet ist.²⁴

In Abhängigkeit des Herstellungsverfahrens und des Alters der Kohlenstoffschichten unterscheiden sich deren Eigenschaften. Gleichmaßen variiert die Affinität der Biomoleküle zu der hydrophoben Oberfläche des amorphen Kohlenstoffes stark, weswegen häufig eine Modifizierung der Oberfläche notwendig ist. Die Oberflächeneigenschaften können durch UV-Licht- oder Plasmabehandlung, aber auch durch Beschichtung mit Poly-L-lysin oder Detergentien angepasst werden. Das jeweilige Verfahren ermöglicht, die Verteilung der Partikel in den Löchern des Kohlenstofffilms zu verändern. Das Vorgehen muss jedoch für jede Probe individuell optimiert werden, um eine optimale Verteilung der Biomoleküle zu erreichen.^{6,25}

1.2.2.2. Kohlenstoffnanomembranen

Kohlenstoffnanomembranen (CNMs) sind zweidimensionale Kohlenstoffschichten mit einer hohen mechanischen Stabilität und einer Dicke von etwa einem Nanometer. Eine Möglichkeit zur Herstellung von CNMs ist die Bestrahlung von Oligophenyl-basierten selbstanordnenden Monolagen (SAMs, siehe Kapitel 1.3.) mit Elektronen, wodurch es zur Quervernetzung der einzelnen Moleküle kommt. Außerdem werden funktionelle Gruppen in den SAMs von der Bestrahlung mit Elektronen beeinflusst, so werden bspw. Nitrogruppen zu Aminogruppen reduziert (siehe Abbildung 5). Die Verwendung funktioneller Kopfgruppen ermöglicht aber auch eine Funktionalisierung der Nanomembran. Mithilfe von Elektronen- und EUV-Lithographie oder durch die Verwendung eines fokussierten Elektronen- oder Laserstrahls ist es möglich, CNMs zu strukturieren.²⁶⁻²⁸

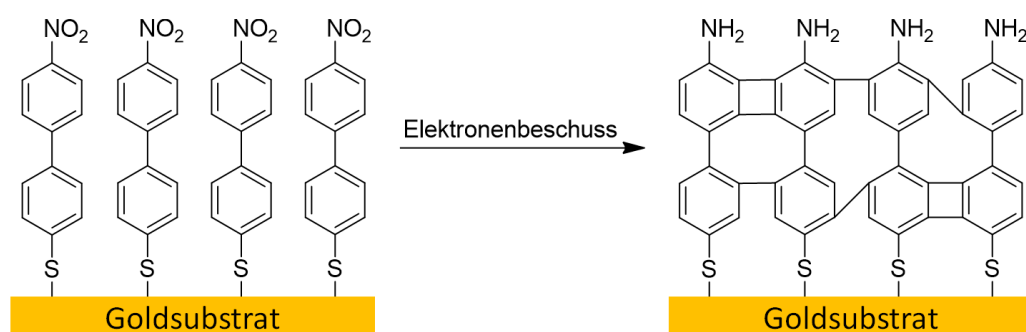


Abbildung 5: Herstellung von Kohlenstoffnanomembranen durch Elektronenbeschuss einer selbstanordnenden Monolage. Durch den Beschuss mit Elektronen werden Nitrogruppen zu Aminogruppen reduziert.²⁷

CNMs können von dem Substrat, auf welchem sie quervernetzt wurden, abgelöst und auf TEM-Netze übertragen werden. Somit können freistehende Membranen erhalten werden. Diese eignen sich insbesondere aufgrund ihrer geringen Dicke bei gleichzeitig hoher mechanischer Stabilität als Trägermaterial für die TEM.^{20,29-31} Werden CNMs im Ultrahochvakuum stark erhitzt, kommt es zu einer Umlagerung von Atomen, wodurch sich die Leitfähigkeit erhöht (*conductive carbon nanomembrane, cCNM*). Die erhöhte Leitfähigkeit ist im TEM-Experiment von Vorteil, da hierdurch Aufladungseffekte verringert werden.²⁰

1.2.2.3. Polymere Nanomembranen

Eine Vielzahl organischer Moleküle wurde für die Herstellung polymerer Nanomembranen verwendet. Es konnten bereits freistehende Membranen erhalten werden, welche im TEM untersucht wurden.^{22,23,32-34} Nachteile polymerer Nanomembranen sind ihre schlechte elektrische Leitfähigkeit und die häufig große Dicke.¹⁵ Die organischen Filme können durch chemische Quervernetzung einzelner Moleküle auf einer Oberfläche hergestellt und anschließend transferiert werden.⁷

Ein Beispiel hierfür ist eine Polyethylenglykol(PEG)-basierte Nanomembran (siehe Abbildung 6). Zu deren Fabrikation wird eine Mischung eines Epoxy- und eines Amino-terminierten PEG-Derivates auf eine Oberfläche aufgebracht und durch Erwärmen zur Reaktion gebracht. Anschließend kann das quervernetzte Polymer als Membran von dem Substrat abgehoben werden. Hierdurch können freistehende Membranen mit einer Dicke von 10 - 350 nm oder mehr erhalten werden.²²

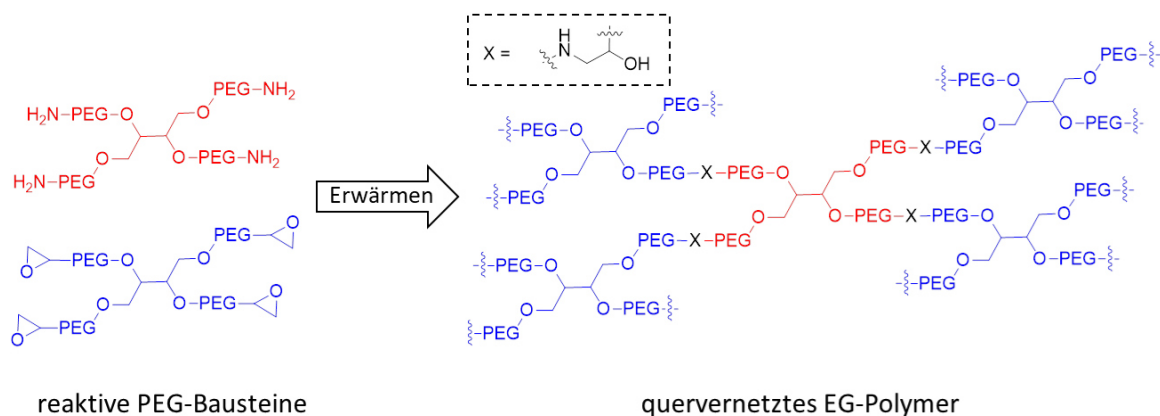


Abbildung 6: PEG-basierte polymere Nanomembran.²² Die beiden reaktiven Polymerbausteine werden durch Erhitzen zur Reaktion gebracht und bilden ein quervernetztes EG-Polymer. Wird dieser Vorgang kontrolliert auf einem geeigneten Substrat durchgeführt, können polymere Nanomembranen erhalten werden.

1.2.3. Strukturberechnung von Biomolekülen mittels Kryo-TEM

Für die Berechnung der Struktur von Biomolekülen werden TEM-Aufnahmen mit hochenergetischen Elektronen von den Partikeln in den Löchern des Lochfilms

gesammelt. Die Verwendung einer hohen Beschleunigungsspannung und einer geringen Elektronendosis hilft Schädigungen des sensitiven, biologischen Materials zu vermeiden, da hierdurch die Ionisationswahrscheinlichkeit abnimmt. Die Qualität der mikroskopischen Aufnahmen ist entscheidend für die Auflösung und die Qualität der Struktur, die aus ihnen bestimmt wird.

Zur Bestimmung der Struktur von Biomolekülen wird die *single particle analysis* (SPA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein computerunterstütztes Verfahren, in welchem verschiedene Orientierungen vieler Proteine gemittelt werden. Aufgrund der vielen Ansichten der Partikel ist es möglich, die dreidimensionale Struktur des Biomoleküls aus der zweidimensionalen Projektion zu berechnen.

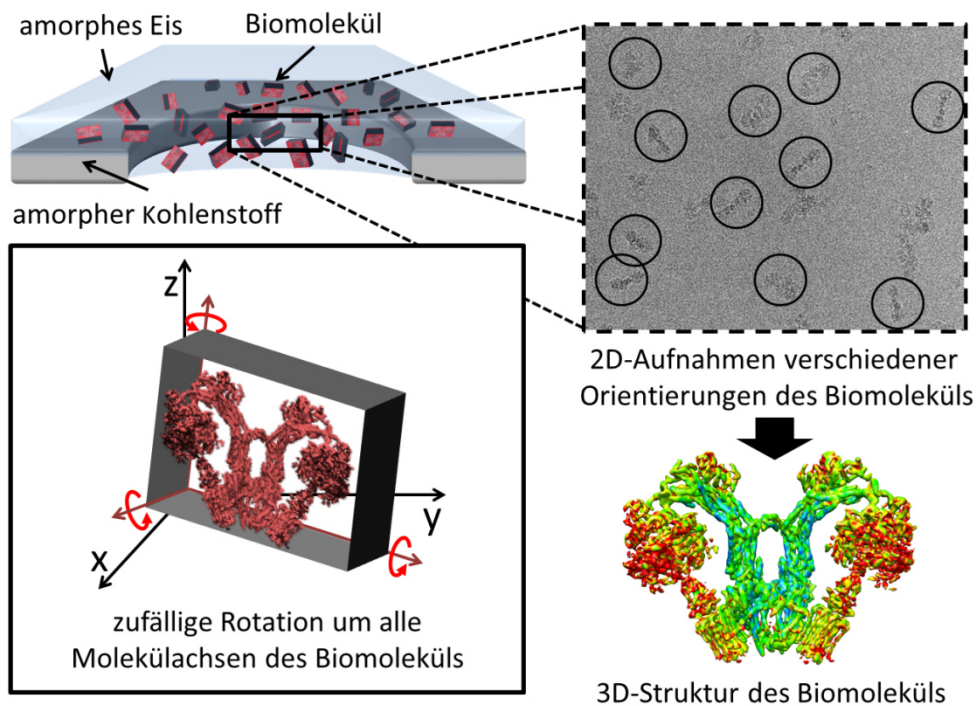


Abbildung 7: 3D-Strukturbestimmung mittels *single particle analysis* (SPA). Eine Vielzahl an Partikeln mit verschiedenen Orientierungen des Biomoleküls werden in einem amorphen Eisfilm in den Löchern eines amorphen Kohlenstofflochfilms gefroren. Anschließend werden TEM-Aufnahmen der Partikel in den Löchern gesammelt. Aus den 2D-Aufnahmen vieler Partikel mit verschiedenen Orientierungen des Biomoleküls kann die 3D-Struktur des Biomoleküls berechnet werden. Teile der Abbildung wurden der Literatur 35 entnommen.

Die SPA unterscheidet sich hiermit von der Tomographie, bei der viele Ansichten desselben Biomoleküls aufgenommen werden, indem das TEM-Netz im Strahl gekippt wird. Hierdurch wird die kumulierte Elektronendosis der bei verschiedenen Kippwinkeln

gesammelten Aufnahmen, auf ein Biomolekül eingestrahlt. Dies führt dazu, dass bei sensitivem biologischen Proben mit einer geringen Elektronendosis gearbeitet werden muss, um eine Schädigung der Probe zu minimieren, was wiederum zu einem geringeren Kontrast in der Aufnahme führt. In der SPA verteilt sich die Elektronendosis auf die in verschiedenen Orientierungen vorliegenden Biomoleküle, weswegen hier mit deutlich höheren (ein bis zwei Größenordnungen) Elektronendosen gearbeitet werden kann.¹⁵

In der SPA ist wichtig, dass nur gleichartige Biomoleküle für die Berechnung verwendet werden. Außerdem geht die Methode von der Annahme aus, dass die dreidimensionale Struktur der Objekte korrekt durch die zweidimensionalen Projektionen dargestellt wird. Typische SPA Datensätze bestehen aus vielen tausend mikroskopischen Aufnahmen, in denen wiederum bis zu tausend Projektionen des Biomoleküls in verschiedenen Orientierungen enthalten sein können. Bei der anschließenden Mittelung der vielen Projektionen steigt das Signal-zu-Rausch Verhältnis deutlich an. Alle Projektionen werden anhand ihrer Orientierung sortiert und eine dreidimensionale Struktur des Biomoleküls berechnet. Weiterhin gibt es eine Vielzahl an Methoden, die Datensätze durch eine geeignete Nachbearbeitung zu optimieren.¹⁵

1.3. Selbstanordnende Monoschichten

Eine wichtige Methode zur gleichmäßigen Beschichtung von Oberflächen, die beispielsweise für die Herstellung von Membranen weiter prozessiert werden sollen, sind Selbstanordnende Monoschichten (engl. *self-assembled monolayers*, SAMs). SAMs stellen eine Möglichkeit zur gezielten Funktionalisierung von Oberflächen mit organischen Molekülen dar. Durch kovalente Bindung der oberflächenaktiven Moleküle an das Substrat und nachfolgende Selbstanordnung aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen können oft hochgeordnete Monoschichten entstehen.

Ein SAM-bildendes Molekül besteht aus einer Ankergruppe, einem Spacer und einer Kopfgruppe. Die Ankergruppe bindet an das Substrat und ist über einen Spacer an die Kopfgruppe gebunden (siehe Abbildung 8). Die Kopfgruppe kann unterschiedlich funktionalisiert werden und ermöglicht hierdurch, die Eigenschaften der Oberfläche in einem weiten Bereich zu variieren. Zur Bildung einer SAM muss die Ankergruppe eine

kovalente Bindung mit dem Substrat eingehen können. Hierfür wurden eine Reihe verschiedener Systeme entwickelt. Das am besten untersuchte System sind Organothiolate auf Goldoberflächen. Zur Abscheidung eines SAMs wird das Substrat einer verdünnten Lösung oder dem Dampf der SAM-bildenden Verbindung ausgesetzt (siehe Abbildung 8).³⁶

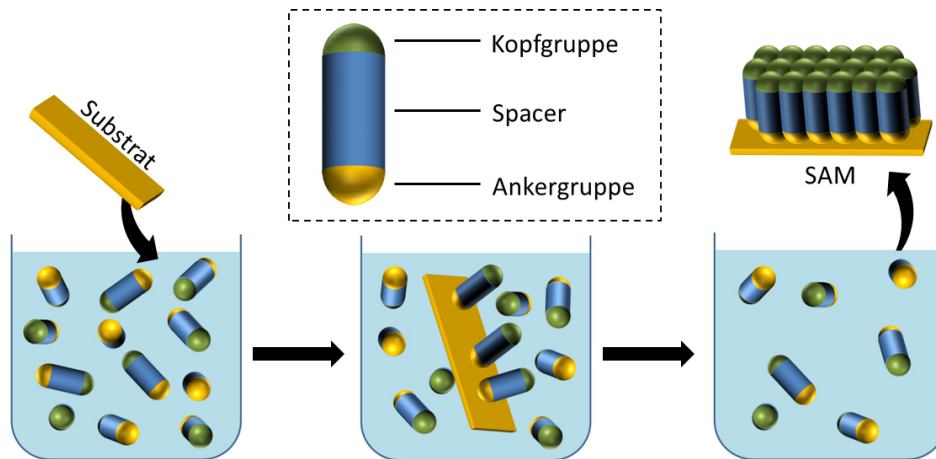


Abbildung 8: Abscheidung und Aufbau einer SAM: Zur Abscheidung einer SAM wird das Substrat in eine Lösung des SAM-bildenden Moleküls eingetaucht. Es kommt zur Anbindung der Moleküle über die Ankergruppe. Die Moleküle ordnen sich aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen der Kopfgruppen und der Spacer. Nach einer definierten Zeit wird das mit einer SAM beschichtete Substrat aus der Lösung genommen und abgespült.

Zur Bildung von SAMs auf Basis der Schwefel-Gold-Bindung können verschiedene reaktive Schwefelverbindungen wie Alkan- oder Arentiole verwendet werden. Außerdem ist es möglich, die jeweiligen Disulfide zu verwenden.³⁶ Thiolat-SAMs besitzen nur eine mäßige thermische Beständigkeit³⁷ (Abbau ab ca. 100 °C) und können an Luft oxidieren.^{38,39}

Eine gängige Methode zur Abscheidung von SAMs auf Gold besteht darin, das Goldsubstrat in eine verdünnte ethanolische Lösung ($\approx 1-10$ mM) der SAM-bildenden Spezies einzutauchen und diese für 12-18 Stunden bei Raumtemperatur einwirken zu lassen.⁴⁰ In Abhängigkeit von dem zu immobilisierenden Molekül, können jedoch Abweichungen bei der Einwirkzeit, der Temperatur oder der Konzentration nötig sein.

Als Goldsubstrat dient in der Regel eine auf einem Trägermaterial (z.B. Siliziumwafer) aufgebrachte Gold (111)-Oberfläche. Diese thermodynamisch begünstigte Oberfläche hat sich für die Herstellung von SAMs etabliert, da sie sich leicht herstellen lässt.⁴¹

Die erhaltenen Schichten sind häufig nicht defektfrei. Bei den Defekten handelt es sich z.B. um einzelne fehlende Moleküle (sog. *pinholes*) oder ganze Reihen fehlender Moleküle sowie fehlgeordneten Domänen. Neben den Abscheidebedingungen sind die Eigenschaften der Moleküle für die Ordnung der SAMs entscheidend. Insbesondere die Spacerlänge entscheidet, ob ein stark fehlgeordneter SAM entsteht, da kürzere Kettenlängen zu weniger stabilisierenden Wechselwirkungen führen.⁴⁰

1.4. Adsorption von Proteinen an Oberflächen

Die Eigenschaften, welche eine Oberfläche besitzt, sind auch entscheidend für die Anlagerung von Proteinen. Proteine besitzen hydrophile und hydrophobe Untereinheiten, was es ihnen ermöglicht, an einer Vielzahl von Oberflächen zu adsorbieren. Hierbei können sie über viele Stellen eine Fülle an Wechselwirkungen mit der jeweiligen Oberfläche ausbilden und sich dadurch fest an diese anlagern.⁴² Die Art der Wechselwirkung hängt von der Beschaffenheit der Oberfläche ab. So lagern sich beispielsweise hydrophobe Seitenketten an hydrophobe Oberflächen an. Außerdem können die adsorbierenden Proteine die auf der Oberfläche befindlichen Wassermoleküle verdrängen. Dieser Vorgang ist entropisch begünstigt, da sich die Wassermoleküle danach frei bewegen können und somit mehr Freiheitsgrade erhalten.⁴³

Der Adsorptionsvorgang von Proteinen an Oberflächen kann in mehrere Schritte unterteilt werden (siehe Abbildung 9), wobei sich zunächst das Protein der Oberfläche nähert und erste Wechselwirkungen ausbildet. Anschließend verdrängt das Protein die an der Oberfläche angelagerten Wassermoleküle und lagert sich unter Beibehaltung seiner nativen Form reversibel an die Oberfläche an. Am Ende kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch das Protein denaturiert und so die Wechselwirkungen mit der Oberfläche maximiert. Das Protein ist so irreversibel an der Oberfläche angelagert.⁴⁴

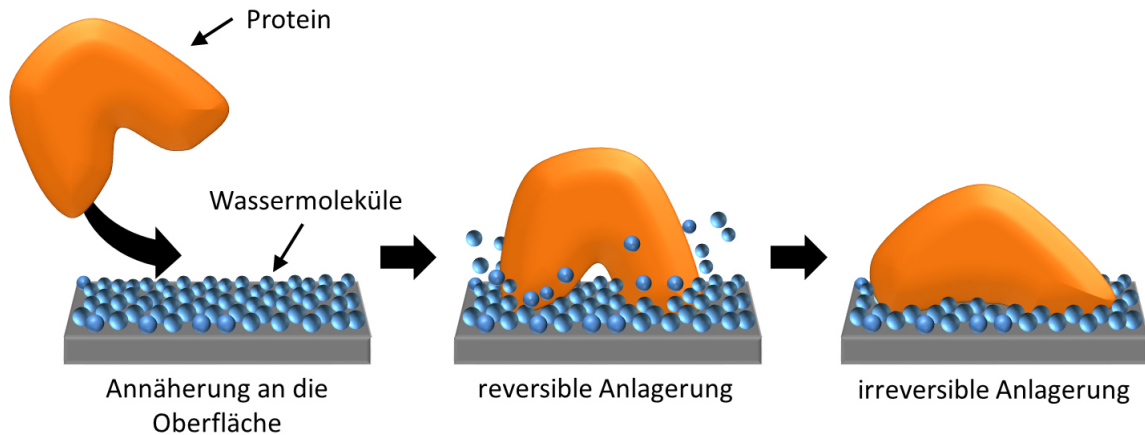


Abbildung 9: Proteinanlagerung an eine Oberfläche: Das Protein nähert sich der Oberfläche und adsorbiert zunächst reversibel, wobei die an der Oberfläche angelagerten Wassermoleküle verdrängt werden. Anschließend kommt es zur Konformationsänderung (Denaturierung) und das Protein adsorbiert irreversibel an der Oberfläche.⁴⁴

1.5. Adhäsion von Bakterien an Oberflächen

Für die Entstehung von Infektionen ist die Bakterienadhäsion ein essentieller Schritt. Deswegen ist das Unterbinden der bakteriellen Adhäsion, gerade bei zunehmenden Antibiotikaresistenzen, ein stark wachsendes Forschungsgebiet.^{45,46}

Es wird grundsätzlich zwischen zwei Arten der Bakterienadhäsion unterschieden, die aktive und die passive Adhäsion. Bei der aktiven Adhäsion haften nur die lebenden Mikroben an der Oberfläche, das heißt, es bedarf einer physiologischen Aktivität zur Anlagerung. Bei der passiven Adhäsion kann eine Anhaftung auch im abgestorbenen Zustand erfolgen.⁴⁷

Der Mechanismus der aktiven Adhäsion läuft bei den meisten Bakterien in zwei Schritten ab (siehe Abbildung 10). Im ersten Schritt sondern die Bakterienstämme Haftproteine ab, um durch diese mit der Oberfläche wechselwirken zu können. Im zweiten Schritt verwenden die Bakterien fadenförmige Fortsätze (Flagellen, Fimbrien, Pili) um sich mit Hilfe dieser Proteine zu verankern.⁴⁸ Um sich vor Umwelteinflüssen zu schützen sondern die sessilen Bakterien dann extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) ab, welche sie umhüllen. EPS bestehen hauptsächlich aus Polysacchariden, enthalten aber auch Proteine, Nukleinsäuren, Peptidoglycane oder Lipide. Die Gesamtheit von EPS und aggregierten Bakterien bezeichnet man als Biofilm.^{45,49,50}

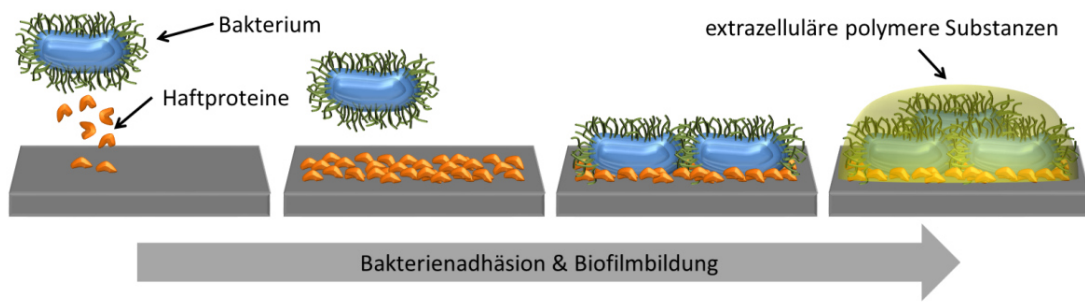


Abbildung 10: Bakterienadhäsion mit anschließender Biofilmbildung: Zunächst sondert das Bakterium Haftproteine ab, welche es ihm im Anschluss ermöglichen, leicht an der Oberfläche zu adhären. Haben sich Bakterien an die Oberfläche angelagert, produzieren sie extrazelluläre polymere Substanzen, um sich vor Umwelteinflüssen zu schützen.

1.6. Biorepulsive Oberflächen

Die unkontrollierte Ansammlung von Biomaterial auf Oberflächen, welche in Kontakt mit einem biologischen Medium stehen, schränkt deren Funktionalität ein und führt zur Anlagerung weiteren Biomaterials.⁵¹ Um die Bildung eines derartigen Biofilmes zu verhindern, wurden mehrere Oberflächenbeschichtungen entwickelt. Diese basieren häufig auf der Unterdrückung der Adsorption von Proteinen, da viele *Biofouling*-Prozesse mit deren Anlagerung beginnen.⁵¹ Außerdem finden Beschichtungen Verwendung, welche giftig für Mikroorganismen sind und hierdurch deren Wachstum unterdrücken. So fanden hydrophobe, hydrophile und nanostrukturierte Oberflächen sowie anti-fouling Lackierungen Anwendung, welche beispielsweise Tributylzinnoxid oder andere Biozide enthalten.^{52,53} Große Aufmerksamkeit erhielten umweltfreundliche, polymere Beschichtungen, wie Polyglycerol (PG),^{54–57} Polyethylenglykol (PEG),^{43,58–62} Phospholipide^{51,63} oder Polysaccharide,^{51,64} welche Hydrogele ausbilden können und hierdurch die Bildung eines Biofilmes verhindern. Wichtig ist, dass die biorepulsive Beschichtung unter den vorgesehenen Einsatzbedingungen ausreichend stabil ist.⁶⁵

Insbesondere Polymere wie PEG oder PG, welche in Verbindung mit Wasser Hydrogele ausbilden, haben sich zur biorepulsiven Oberflächenbeschichtung bewährt.^{55,66–69} Beobachtungen zeigten, dass der Entropiegewinn aus der Hydratation dieser Oberfläche größer ist als deren intermolekulare Wechselwirkungen mit dem Protein. Durch die Anlagerungen des Proteins an das Hydrogel wird dessen Beweglichkeit eingeschränkt, was zu einer Reduktion der Freiheitsgrade führt, was wiederum entropisch nachteilig ist.

Die Interaktionen der Proteine mit der Hydrogeloberfläche über Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals und elektrostatische Wechselwirkungen werden eingeschränkt und die Adhäsion vermindert.^{43,62,70,71}

1.6.1. Polyglycerolschichten

Polyglycerol ist aufgrund seiner hohen Biokompatibilität und gleichzeitig biorepulsiven Eigenschaften in den Fokus der Forschung gerückt.^{55,72} PG wird durch die Polymerisation von Glycidol (2,3-Epoxy-1-propanol) erhalten, wobei lineare oder hyperverzweigte Polymere entstehen können. Welches Polymer erhalten wird, kann durch Einstellen der Reaktionsbedingungen gesteuert werden.^{73,74}

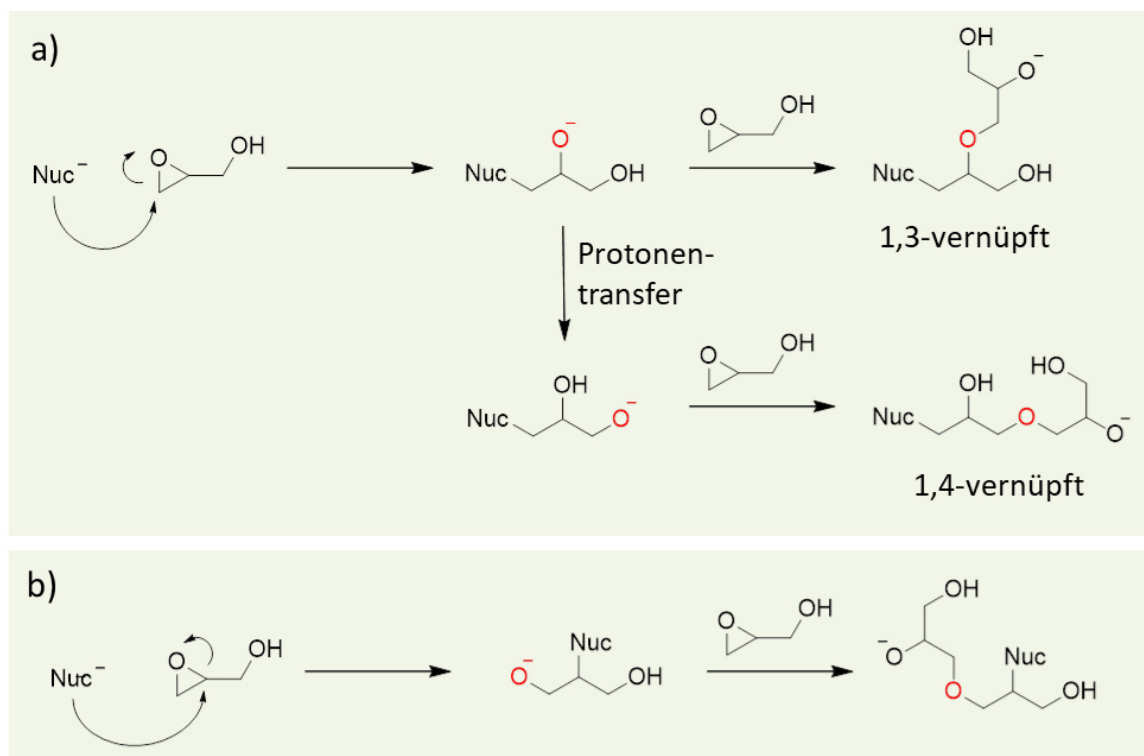


Abbildung 11: Polymerisation von Glycidol zu Polyglycidol: a) Angriff eines Nukleophils (Nuc) am C₁-Atom eines Glycidolmoleküls. Das gebildete Alkoholat-Anion reagiert mit weiteren Glycidolmolekülen zu Polyglycidol. Es ist jedoch möglich, dass es zu einem Protonentransfer kommt, wodurch 1,3- und 1,4-verknüpftes Polyglycidol entstehen kann. b) Angriff eines Nukleophils (Nuc) am C₂-Atom eines Glycidolmoleküls und anschließende Kettenfortpflanzung.

Das Epoxid wird durch einen nukleophilen Angriff an der äußeren, niedriger substituierten Seite (C_1 -Atom) geöffnet, wodurch es zur Bildung eines Alkoholat-Anions kommt (siehe Abbildung 11, a). Allerdings ist die sterische Hinderung am höher substituierten Kohlenstoffatom (C_2 -Atom) nicht groß genug, um einen Angriff vollständig zu verhindern, weswegen es möglich ist, dass der Angriff auch dort erfolgt (siehe Abbildung 11, b).⁷⁵ Das gebildete Alkoholat-Anion kann als Nukleophil mit weiteren Glycidol-Molekülen reagieren und so das Polymer in einer Kettenreaktion aufgebaut werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Wanderung des Protons der Hydroxygruppe, wodurch das Sauerstoffatom der Hydroxygruppe als Nukleophil reagieren kann (siehe Abbildung 11, a).^{73,76} Zusätzlich können inter- und intramolekulare Protonentransfers stattfinden.⁷³

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, eine Oberfläche mit PG zu beschichten und hierdurch biorepulsiv zu funktionalisieren. Auf Oberflächen von Materialien mit einer nativen Oxidschicht, wie Aluminium, Stahl oder Silizium, kann PG durch eine ringöffnende, anionische Polymerisation aufgewachsen werden. Das Glycidol wird in diesem Fall nukleophil von einem Sauerstoffatom aus der Oxidschicht angegriffen, welche als Initiator für die Kettenreaktion dient. Mit diesem Verfahren lassen sich viele Nanometer dicke PG-Schichten auf Oberflächen polymerisieren (siehe Abbildung 12, a). Für eine vollständige Biorepulsivität gegenüber Proteinen sind Schichtdicken von etwa 5 nm auf den oxidischen Oberflächen nötig.^{66,77,78}

Außerdem kann Glycidol auf zuvor nukleophil funktionalisierten Oberflächen aufgewachsen werden.^{78,79} Ein Beispiel ist die Polymerisation auf Aluminium, auf welchem zuvor eine Monolage 3-Aminopropyltrimethoxysilan (APTMS) aufgebracht wurde.⁶⁷ Die nukleophile Aminogruppe des APTMS kann anschließend als Initiator für die Polymerisation verwendet werden (siehe Abbildung 12, b).

Eine weitere Strategie zur Beschichtung von Oberflächen mit PG ist die Funktionalisierung der PG-Polymere mit reaktiven Gruppen, welche eine direkte Anbindung an eine Oberfläche ermöglichen.⁸⁰⁻⁸⁴ Diese Methode ermöglicht eine exakte Kontrolle der PG-Dendrimere, welche auf der Oberfläche angebracht werden, da die Polymerbausteine zuvor definiert hergestellt werden können. Ein Beispiel hierfür ist die Funktionalisierung von PG mit einem Disulfid, welches anschließend als Monolage auf einer Goldoberfläche abgeschieden werden kann (siehe Abbildung 12, c).⁵⁶

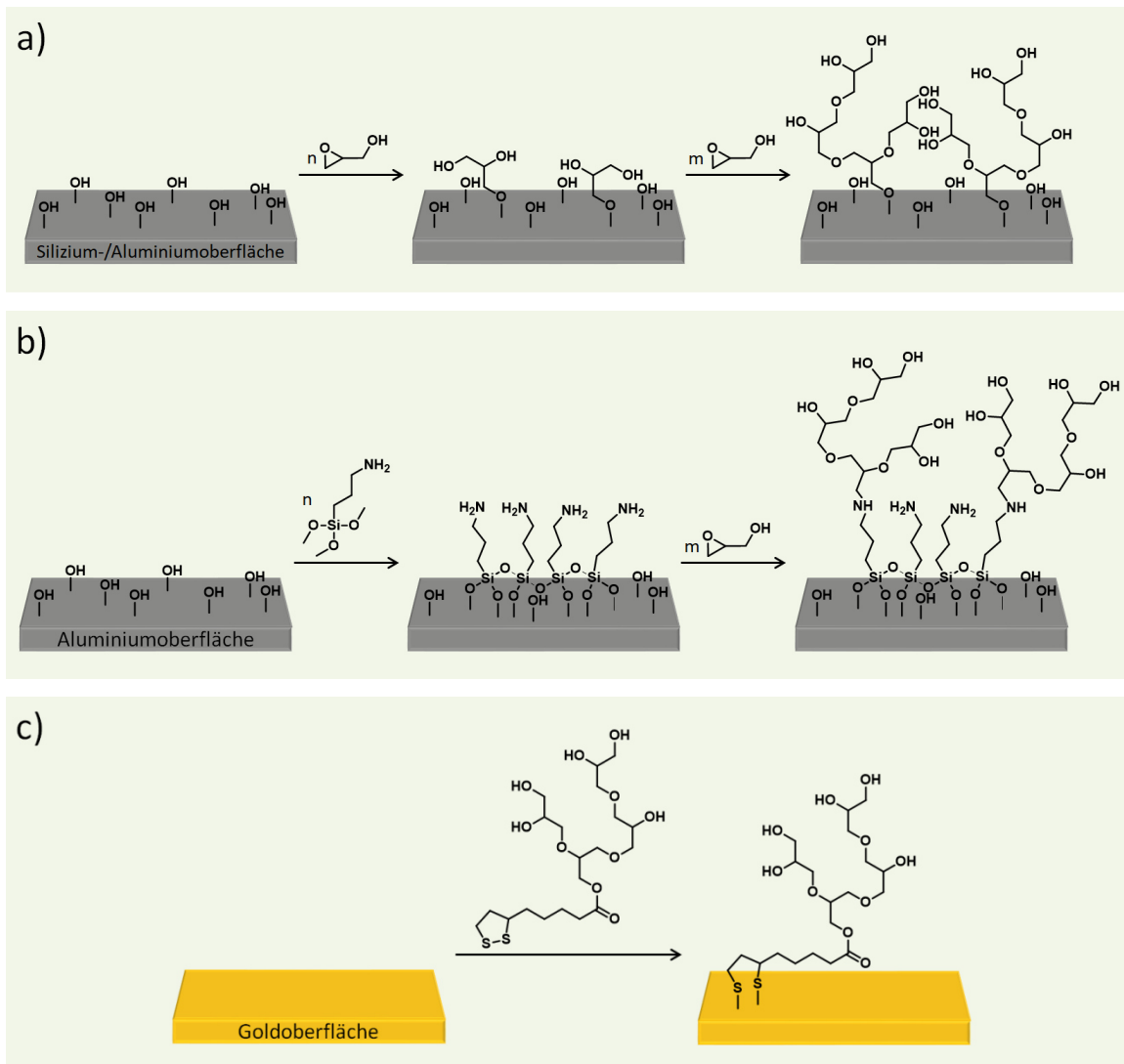


Abbildung 12: Möglichkeiten zur Beschichtung von Oberflächen mit Polyglycerol (PG): a) Direktes Aufwachsen von PG durch die Polymerisation von Glycidol an oxidischen Oberflächen. Die Hydroxygruppen der Oberfläche wirken hierbei als Initiator für die Reaktion. b) Nukleophile Funktionalisierung der Oberfläche mit einem geeigneten Reagenz (hier APTMS). Anschließend dienen die aufgebrachtten nukleophilen Stellen als Initiator für die Polymerisation. c) Mit einem Disulfid funktionalisiertes PG kann direkt auf Goldoberflächen abgeschieden werden.

1.7. Spezifische Anbindung von Biomolekülen

Zur spezifischen Anbindung von Biomolekülen an Oberflächen wurde eine Vielzahl an Systemen entwickelt, welche insbesondere in der Aufreinigung oder Sensorik Anwendung finden.^{85–88} Allen liegt eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem zu bindenden Biomolekül und einem passenden Gegenstück, welches an eine Oberfläche gebunden ist, zugrunde.

Biomoleküle können in ihrer nativen, unveränderten Form an Oberflächen angebunden werden. In diesem Fall werden natürlich auftretende Affinitäten von Biomolekülen untereinander ausgenutzt. So werden oft Antikörper, Oligonukleotide, Aptamere oder Phagen immobilisiert und, aufgrund ihrer spezifischen Wechselwirkung mit Biomolekülen, zu deren Erkennung verwendet.⁸⁹

Eine andere Möglichkeit ist, das zu bindende Biomolekül zu verändern, um mithilfe dieser Markierung (engl. *tag*) eine spezifische Wechselwirkung zu erreichen.^{87,88} Derartige Veränderungen haben teilweise einen starken Einfluss auf die Eigenschaften des Biomoleküls, was jedoch auch gewünscht sein kann. So gibt es beispielsweise löslichkeitsvermittelnde Proteinfusions-Tags.⁹⁰ Für jedes Protein und für verschiedene Anwendungen werden die Affinitäts-Tags angepasst. Häufig wird auch eine Kombination mehrerer verwendet.⁹¹

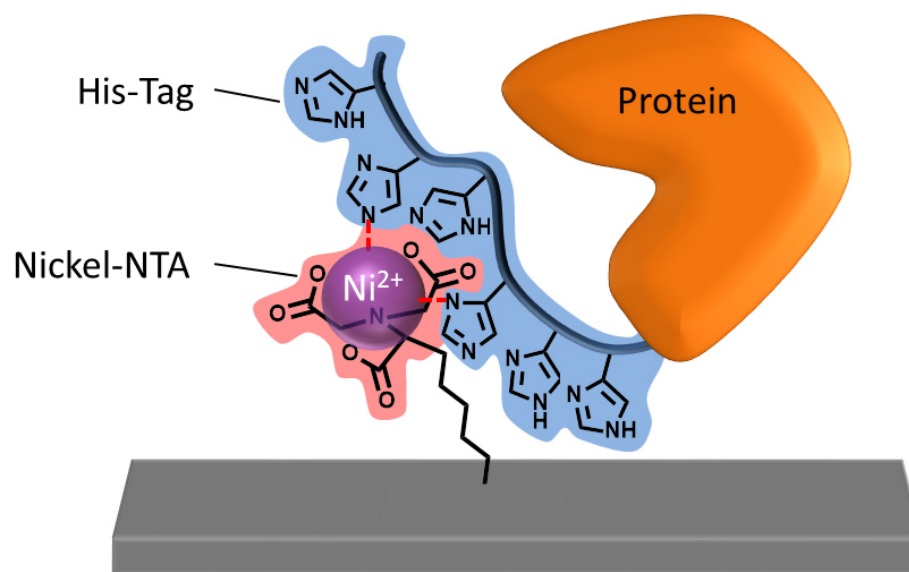


Abbildung 13: Proteinanbindung an eine mit Nickel-NTA funktionalisierte Oberfläche über einen His-Tag: Der Nickel-NTA-Komplex besitzt zwei freie Koordinationsstellen, welche von zwei Histidin-Einheiten des His-Tags besetzt werden können. Hierdurch können Proteine an Oberflächen angebunden werden.

Eine häufig verwendete Methode ist die der Metallionen-Affinitätschromatographie, bei der bestimmte Aminosäuresequenzen des Proteins an chelatisierte Metallionen binden.^{88,91,92} Zu dieser Klasse gehört auch der Polyhistidin-Tag, kurz His-Tag. Dieser Tag besteht aus mindestens sechs Histidin-Resten, welche an den C- oder N-Terminus

des gewünschten Proteins kloniert werden. His-markierte Proteine binden mit hoher Affinität an zweiwertige Nickel-, Kobalt- oder Kupferionen. In Kombination mit dem His-Tag werden häufig Derivate der Nitrilotriessigsäure (NTA) mit Nickelionen zur Immobilisierung der Metallionen verwendet. Hierbei bildet sich ein oktaedrischer Chelatkomplex aus, bei welchem zwei Koordinationsstellen des Nickelions durch Wassermoleküle besetzt sind. An diese Koordinationsstellen können die Histidine des His-Tags mit hoher Affinität selektiv binden (siehe Abbildung 13). Andere Biomoleküle können anschließend durch Waschen der festen Phase entfernt werden. Das Protein kann durch Waschen mit einem kompetitiven Reagenz wie Imidazol oder durch Entfernen des Metallions mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) aus dem Komplex gelöst werden.^{91,92}

Um His-Tag Proteine mit höherer Affinität zu binden, können multivalente Verbindungen eingesetzt werden, in welchen mehrere NTA-Gruppen miteinander verknüpft sind. Für Moleküle mit einer bis drei NTA-Gruppen steigt die Stabilität des Komplexes mit dem His-Tag mit zunehmender Anzahl an NTA-Gruppen an. Die Nickel-Komplexdissoziationskonstante des dreifachen NTA-Derivats liegt im nanomolaren Bereich und damit um den Faktor 1000 niedriger als die des einfachen NTA-Derivats. Es konnte gezeigt werden, dass die Länge des His-Tags einen Einfluss auf die Komplexbildung hat. Ein Hexahistidin-Tag weist eine geringere Affinität als ein Decahistidin-Tag auf.⁹³

1.8. Methoden zur Oberflächencharakterisierung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Charakterisierung von Oberflächen verwendet, deren theoretischer Hintergrund in diesem Kapitel erläutert werden soll. Hierfür werden zunächst die Grundlagen für die Wechselwirkung von Licht mit Oberflächen beschrieben.

1.8.1. Grundlagen: Reflexion von Licht an Metalloberflächen^{94,95}

Licht ist eine elektromagnetische Welle. Die zeit(t)- und orts(\vec{r})-abhängige Ausbreitung des elektrischen Feldes einer elektromagnetischen Welle in einem Medium kann durch Gleichung 1 beschrieben werden.

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{-i(\vec{k}\vec{r} - \omega t)} \quad (1)$$

Dabei ist \vec{k} der Wellenvektor, welcher orthogonal auf dem elektrischen Feldvektor steht und mit der Ausbreitungsrichtung der transversalen Welle übereinstimmt und ω die Kreisfrequenz. Für den Wellenvektor gelten folgende Zusammenhänge bezüglich Brechungsindex (n), Wellenlänge (λ), Kreisfrequenz (ω) und Lichtgeschwindigkeit im Vakuum (c):

$$\vec{k} = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2} = n \frac{2\pi}{\lambda} = n \frac{\omega}{c} \quad (2)$$

Wenn Licht an einer Oberfläche reflektiert wird, kann der elektrische Feldstärkevektor (\vec{E}) durch zwei Komponenten beschrieben werden, von denen eine senkrecht (\vec{E}_s) und die andere parallel (\vec{E}_p) zur Ebene aus Oberflächennormalen und Ausbreitungsrichtung (Einfallsebene) ausgerichtet ist (siehe Abbildung 14).

$$\vec{E} = \begin{pmatrix} E_p \\ E_s \end{pmatrix} \quad (3)$$

Die elektrischen Feldvektoren haben eine Phasenverschiebung Δ_{sp} zueinander, welche sich aus der Differenz der beiden Phasen von \vec{E}_s und \vec{E}_p ergibt ($\Delta_{sp} = \delta_p - \delta_s$). Die Phasenverschiebung zwischen den elektrischen Feldvektoren ist bei

linear polarisiertem Licht ein ganzzahliges Vielfaches von π . Ist der Betrag der elektrischen Feldvektoren gleich groß und ist die Phasenverschiebung ein halbzahlig Vielfaches von π ($\frac{1}{2}\pi, 1\frac{1}{2}\pi, 2\frac{1}{2}\pi, \dots$), spricht man von zirkular polarisiertem Licht. Alle anderen Möglichkeiten werden als elliptisch polarisiert bezeichnet.

Die komplexe Darstellung der elektrischen Feldvektoren durch ihren Betrag und ihre Phase ist in Gleichung 4 dargestellt.

$$\vec{E} = |\vec{E}|e^{-i\delta} \quad (4)$$

Somit lässt sich der Polarisationszustand des Lichts durch den Betrag der elektrischen Feldvektoren \vec{E}_s und \vec{E}_p und ihre Phasen δ_p und δ_s darstellen (Gleichung 5).

$$\vec{E} = \begin{pmatrix} |\vec{E}_p|e^{-i\delta_p} \\ |\vec{E}_s|e^{-i\delta_s} \end{pmatrix} \quad (5)$$

Wird ein Lichtstrahl von einer Oberfläche reflektiert, ändern sich die involvierten Phasen und Amplituden (siehe Abbildung 16).

Die Phasenänderung (Δ) wird beschrieben durch die Differenz der Phasenverschiebung zwischen parallelem und senkrechtem Feldvektor bei dem einfallenden ($\Delta_{sp, \text{ein}}$) und dem ausfallenden Licht ($\Delta_{sp, \text{aus}}$) (Gleichung 6).

$$\Delta = (\delta_{p, \text{ein}} - \delta_{s, \text{ein}}) - (\delta_{p, \text{aus}} - \delta_{s, \text{aus}}) \quad (6)$$

Für die Änderung der Amplitude (Ψ) bei Reflexion an der Oberfläche gilt der in Gleichung 7 beschriebene Zusammenhang.

$$\Psi = \arctan\left(\frac{|\vec{E}_{p, \text{aus}}|}{|\vec{E}_{p, \text{ein}}|} \cdot \frac{|\vec{E}_{s, \text{ein}}|}{|\vec{E}_{s, \text{aus}}|}\right) \quad (7)$$

Zusätzlich hat die Reflexion von s- oder p-polarisiertem Licht an einer Metalloberfläche unterschiedliche Auswirkungen auf die Verschiebung des Elektronengases im Metall. Wird eine Oberfläche mit p-polarisiertem Licht bestrahlt, kommt es in dem Material zu einer gleichen Ausrichtung der Bildladungen parallel zur Oberflächennormalen, was das Feld an der Oberfläche verstärkt. Wird eine Oberfläche mit s-polarisiertem Licht bestrahlt, kommt es zu einer entgegengesetzten Ausrichtung von Bildladungen senkrecht

zur Oberflächennormalen, was zu einer Auslöschung des Feldes an der Oberfläche führt (siehe Abbildung 14).

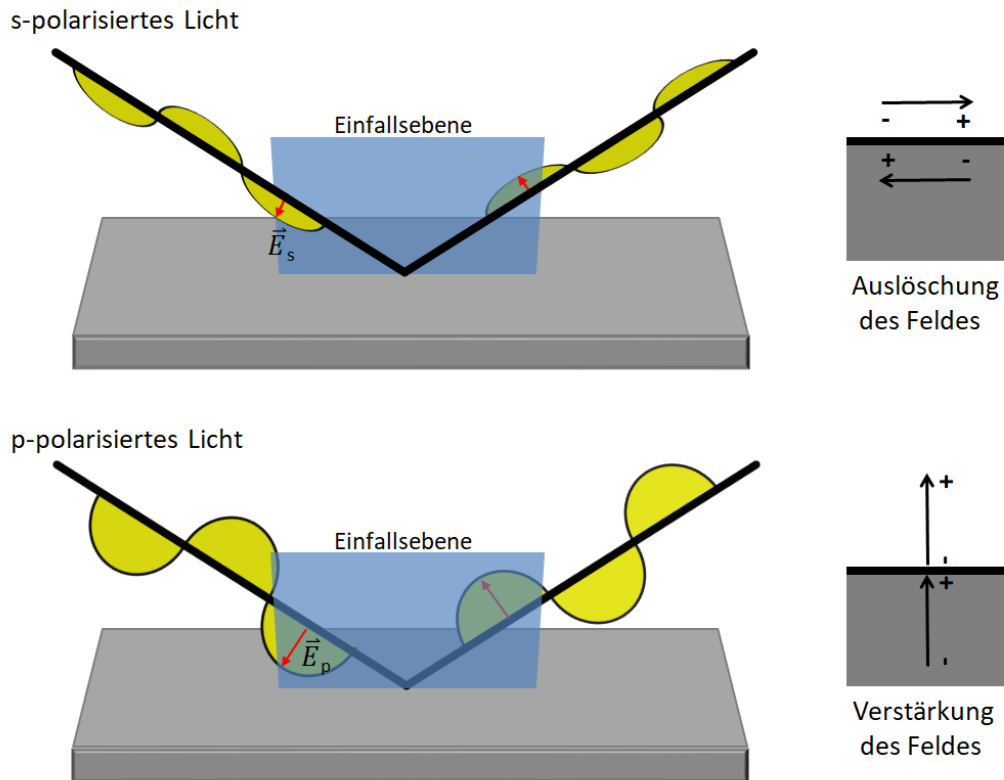


Abbildung 14: Senkrechte (\vec{E}_s , links oben) und parallele (\vec{E}_p , links unten) Komponente des elektrischen Feldvektors. Auswirkung der s- bzw. p-Polarisation des eingestrahnten Lichts auf das resultierende Feld an der Oberfläche. Bei s-polarisiertem Licht hebt sich das Feld an der Oberfläche auf, wohingegen es sich bei p-polarisiertem Licht verstärkt (rechts).

1.8.2. Grundlagen: Reflexion und Transmission in Mehrschichtsystemen

Trifft ein Lichtstrahl auf eine Oberfläche, wird ein Teil des Lichtstrahls gebrochen, ein anderer reflektiert. Außerdem kann ein Teil des Lichtes von der Oberfläche absorbiert werden. Die Brechung und Absorption werden durch den komplexen Brechungsindex (\tilde{n}) beschrieben (Gleichung 8). Dieser setzt sich aus dem Brechungsindex (n) und einem Imaginärteil (k) zusammen, welcher die Absorption berücksichtigt.

$$\tilde{n} = n - i k \quad (8)$$

Das Snelliussche Brechungsgesetz beschreibt den Winkel θ_2 , in welchem der einfallende Strahl an der Grenzfläche gebrochen wird. Das Brechungsgesetz hängt von den Brechungsindices der beiden Schichten und dem Einfallswinkel (θ_1) ab (siehe Abbildung 15).⁹⁵

$$\tilde{n}_1 \sin(\theta_1) = \tilde{n}_2 \sin(\theta_2) \quad (9)$$

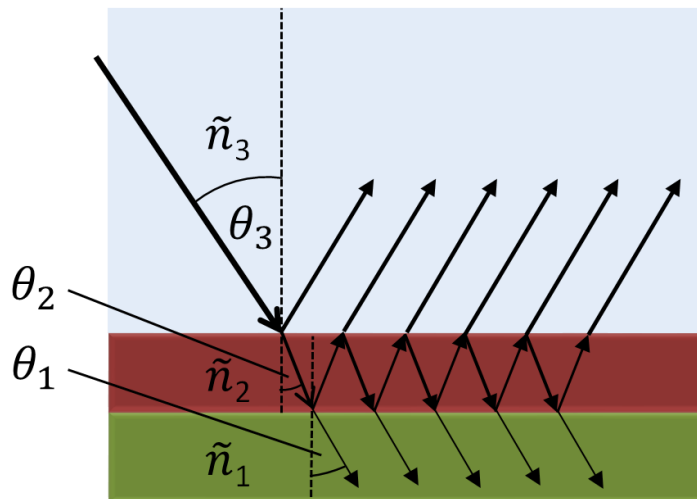


Abbildung 15: Brechung und Reflexion von Licht an einem Mehrschichtsystem mit den komplexen Brechungsindices \tilde{n}_1 , \tilde{n}_2 , \tilde{n}_3 : An jeder Phasengrenze wird ein Teil des Lichtstrahl reflektiert, ein anderer gebrochen. Die reflektierten Strahlen interferieren miteinander zu dem Austrittsstrahl. Eingezeichnet ist der Einfallswinkel (θ_3) sowie die Winkel der gebrochenen Teilstrahlen (θ_2 und θ_1).

Bei Mehrschichtsystemen können diese Phänomene an allen Phasengrenzen beobachtet werden (siehe Abbildung 15).

Je flacher der Einfallswinkel θ_3 des Lichtstrahls auf die Oberfläche ist, umso größer wird der Anteil des reflektierten Lichts. Unterschreitet dieser Winkel den Grenzwert der Totalreflexion (θ_{tot}), wird die gesamte elektromagnetische Strahlung reflektiert. Der Winkel, ab welchem die Totalreflexion auftritt, ist von den Brechungsindices der beteiligten Medien abhängig:^{94,95}

$$\theta_{tot} = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (10)$$

Die Reflexion und Transmission an den Grenzflächen werden durch die Fresnelschen Formeln beschrieben. Der theoretische Zusammenhang zwischen dem komplexen Brechungsindex \tilde{n} , der Schichtdicke d und den Fresnelschen Koeffizienten soll weiterhin

anhand des Falls eines mit einer dünnen Beschichtung überzogenen Substrates gezeigt werden.⁹⁵

Hierfür wird folgendes Dreischichtensystem betrachtet: Ein unter dem Winkel θ_3 einfallender Strahl wird an der ersten Grenzfläche von dem Medium 3 (\tilde{n}_3) zu Medium 2 (\tilde{n}_2) (z.B. Substrat/Beschichtung) unter dem Winkel θ_2 gebrochen. Der gebrochene Strahl wiederum trifft auf die zweite Grenzfläche zu Medium 1 (\tilde{n}_1) (z.B. Beschichtung/Luft) und wird an dieser erneut unter dem Winkel θ_1 gebrochen (siehe Abbildung 15).

Bei den Fresnelschen Reflexionskoeffizienten handelt es sich um stoffspezifische Größen, welche die polarisationsabhängige Reflexion beschreiben und von der Schichtdicke und dem komplexen Brechungsindex abhängen. Die Fresnelschen Reflexionskoeffizienten für s- und p-polarisiertes Licht für die Brechung an der ersten Grenzfläche (Medium 3/Medium 2) sind gegeben durch:

$$r_{p,3/2} = \frac{\tilde{n}_2 \cos(\theta_3) - \tilde{n}_3 \cos(\theta_2)}{\tilde{n}_2 \cos(\theta_3) + \tilde{n}_3 \cos(\theta_2)} = \frac{\tan(\theta_2 - \theta_3)}{\tan(\theta_2 + \theta_3)} \quad (11)$$

$$r_{s,3/2} = \frac{\tilde{n}_3 \cos(\theta_3) - \tilde{n}_2 \cos(\theta_2)}{\tilde{n}_3 \cos(\theta_3) + \tilde{n}_2 \cos(\theta_2)} = \frac{\sin(\theta_2 - \theta_3)}{\sin(\theta_2 + \theta_3)} \quad (12)$$

Die Fresnelschen Transmissionskoeffizienten für s- und p-polarisiertes Licht für die erste Grenzfläche (Medium 3/Medium 2) sind gegeben durch:

$$t_{p,3/2} = \frac{2 \sin(\theta_2) \cos(\theta_3)}{\sin(\theta_3 + \theta_2) \cos(\theta_2 - \theta_3)} \quad (13)$$

$$t_{s,3/2} = \frac{2 \sin(\theta_2) \cos(\theta_3)}{\sin(\theta_3 + \theta_2)} \quad (14)$$

Über das Snelliussche Brechungsgesetz (Gleichung 9) stehen θ_3 und θ_2 im Zusammenhang, wodurch die Reflexionskoeffizienten nur durch den Einfallswinkel θ_3 ausgedrückt werden können.

Gleichermaßen können die Gleichungen für die Koeffizienten $r_{p,2/1}$, $r_{s,2/1}$, $t_{p,2/1}$ und $t_{s,2/1}$ für die zweite Grenzfläche (Medium 2/Medium 1) aufgestellt werden.

Das gesamte reflektierte Licht ist eine Überlagerung der an den Grenzschichten Medium 3/Medium 2 und Medium 2/Medium 1 reflektierten Teilstrahlen. Die

Koeffizienten für s- und p-polarisiertes Licht für das gesamte reflektierte Licht im Dreischichtensystem werden beschrieben durch:

$$R_p = \frac{r_{p,3/2} + r_{p,2/1} e^{-i2b}}{1 + r_{p,2/1} r_{p,3/2} e^{-i2b}} \quad (15)$$

$$R_s = \frac{r_{s,3/2} + r_{s,2/1} e^{-i2b}}{1 + r_{s,2/1} r_{s,3/2} e^{-i2b}} \quad (16)$$

Dabei ist b die Phasenverschiebung zwischen zwei benachbarten reflektierten Teilstrahlen und wird durch Gleichung 17 beschrieben.

$$b = \frac{2\pi d_2 \tilde{n}_2}{\lambda} \sqrt{1 - \frac{\tilde{n}_3}{\tilde{n}_2} \sin^2(\theta_3)} \quad (17)$$

Die Phasenverschiebung b ist abhängig von der bekannten Wellenlänge des einfallenden Lichtstrahles (λ), der komplexen Brechungsindices (\tilde{n}) und der Dicke der Beschichtung (d_2).

1.8.3. Ellipsometrie

Ellipsometrie ist eine optische Methode zur Bestimmung von Schichtdicken und Brechungsindizes dünner Filme auf reflektiven Oberflächen. Das Verfahren ist sehr sensitiv, so können Schichten im Ångström-Bereich untersucht werden. Vorteilhaft ist, dass die Methode zerstörungsfrei ist. Veränderungen der Probe während der Messung durch chemische Reaktionen wie bei der Elektronenmikroskopie sind weitgehend ausgeschlossen.

Das Prinzip der Ellipsometrie beruht auf der Änderung des Polarisationszustandes von polarisiertem Licht durch Wechselwirkung mit der Materie in Mehrschichtsystemen. Während der Messung wird ein Strahl linear polarisierten Lichts bekannter Wellenlänge auf die Probe gesendet und von dieser reflektiert. Bei der Reflexion an der Oberfläche wird die lineare Polarisation in eine elliptische umgewandelt (siehe Abbildung 16). Die daraus resultierende Änderung der Phasenverschiebung Δ und der Amplitude Ψ wird

bestimmt und verglichen. Hieraus lassen sich die Schichtdicken, Brechungsindizes und optische Konstanten berechnen.^{96,97}

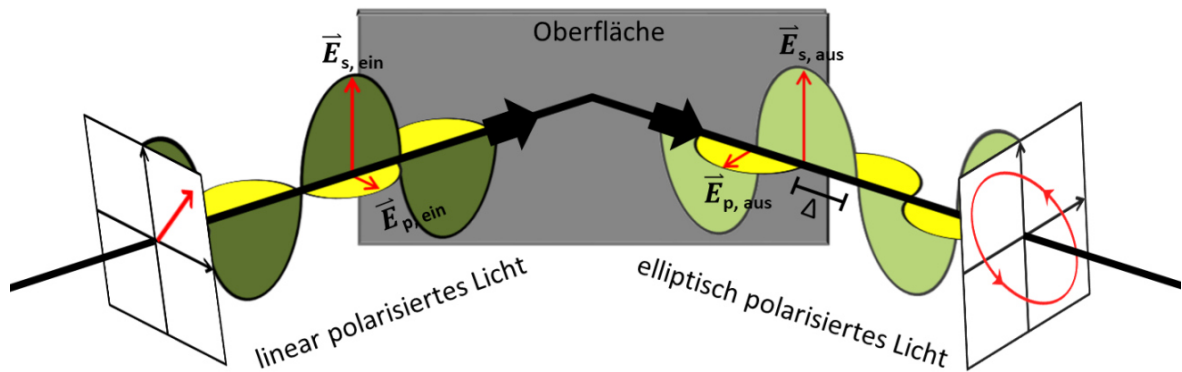


Abbildung 16: Schematische Darstellung einer Ellipsometrie-Messung; gezeigt sind s- und p-polarisierte Anteile der elektromagnetischen Welle (\vec{E}_s und \vec{E}_p), sowie die Phasendifferenz (Δ) nach der Reflexion an einer Oberfläche.⁹⁴

1.8.3.1. Bestimmung des Brechungsindex und der Schichtdicke

Bei einem Mehrschichtsystem kommt es immer wieder zur Reflexion und Brechung der an der vorherigen Grenzfläche gebrochenen Strahlen an der nächsten Grenzfläche. Dies ist immer wieder verbunden mit einer Änderung der Amplitude und der Phase der reflektierten Strahlen. Am Ende wird die Phase und Amplitude der Interferenz von allen reflektierten Strahlen detektiert, welche demnach abhängig von dem Reflexions- und Brechungsverhalten der jeweiligen Schichten ist. Da die Phase und Amplitude des einfallenden Lichtstrahls bekannt ist, können deren Änderung Ψ und Δ berechnet werden. Aus Ψ und Δ können \tilde{n} (n , k) und d berechnet werden. Hierfür werden die Fresnelschen Reflexionskoeffizienten für s- und p-polarisiertes Licht R_s und R_p benötigt. Deren Relation zu Ψ und Δ wird durch Gleichung 18 beschrieben.

$$\frac{R_p}{R_s} = \tan(\Psi) e^{i\Delta} \quad (18)$$

R_p und R_s stehen über Gleichung 15 und 16 in Zusammenhang mit b , welches nach Gleichung 17 wiederum von \tilde{n} und d abhängt. Somit ist die Berechnung von \tilde{n} und d der Beschichtung aus Ψ und Δ möglich.

Bei sehr kleinen Schichtdicken muss die Näherung von Drude angewendet werden, welche berücksichtigt, dass sich Ψ für sehr dünne Schichten nur geringfügig ändert und ausschließlich die Phasenverschiebung Δ zur Berechnung verwendet werden kann.^{94,95}

Allerdings ist die parallele Bestimmung des Brechungsindex und der Schichtdicke einer Probe nur durch mehrere Messungen bei Veränderung des Einfallswinkels möglich. Die dadurch gewonnenen zusätzlichen Informationen können zur Lösung des Gleichungssystems mit mehreren Unbekannten verwendet werden und \tilde{n} und d bestimmt werden.⁹⁸

1.8.4. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie^{99,100}

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. *surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR-Spektroskopie) ermöglicht die Untersuchung der Adsorption oder Desorption von Molekülen an Oberflächen in Echtzeit. Die Methode basiert auf der Anregung von Oberflächenplasmonen in einem Metall.

Wie später erläutert wird, kann in der SPR-Spektroskopie nur p-polarisiertes Licht verwendet werden. Deshalb wird weiterhin nur der Fall für p-polarisiertes Licht betrachtet und die Lichtwelle liegt zweidimensional in der x-z-Ebene. Somit kann die Brechung des Lichtes an der Grenzfläche durch die Wellenvektoren k_1 und k_2 (mit den Anteilen in x- und z-Richtung, k_x und k_z), den Einfallswinkel θ_1 und den Brechungswinkel θ_2 beschrieben werden (siehe Abbildung 17).

In der SPR-Spektroskopie trifft ein Lichtstrahl aus einem optisch dichteren Medium 1 (n_1, ε_1) auf die Grenzfläche zu einem optisch dünneren Medium 2 (n_2, ε_2). Ein Teil des Lichtstrahles wird dabei reflektiert, ein anderer dringt in das Medium ein.

Nach dem Snelliusschen Brechungsgesetz ergeben sich die durch Gleichung 9 und 19 beschriebenen Zusammenhänge. Der unter dem Winkel θ_1 einfallende Strahl wird an der Grenzfläche von \tilde{n}_1 zu \tilde{n}_2 in dem Winkel θ_2 gebrochen, wobei sich die parallel zur Grenzfläche gerichteten Komponenten der Wellenvektoren bei der Brechung nicht ändern (siehe Kapitel 1.8.2.).

$$k_{1x} = k_{2x} \equiv k_x \quad (19)$$

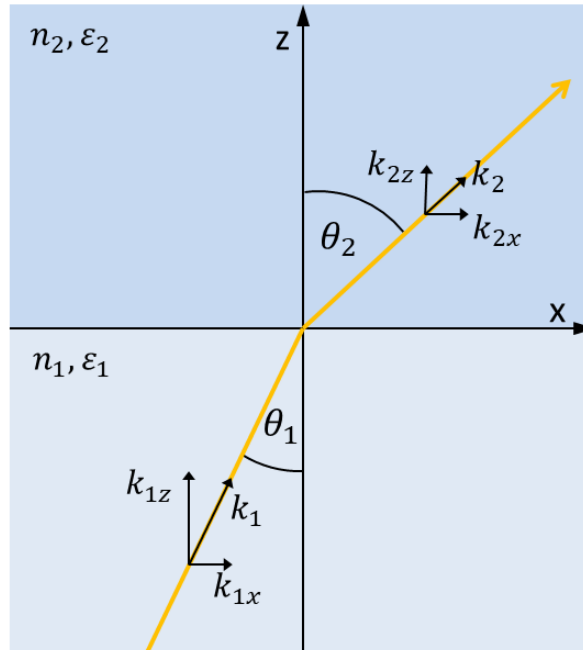


Abbildung 17: Brechung eines p-polarisierten Lichtstrahls an der Grenzfläche von Medium 1 (n_1) zu Medium 2 (n_2). Der Strahl trifft mit einem Winkel θ_1 auf die Grenzfläche und wird in einem Winkel θ_2 gebrochen. Der Wellenvektor k und seine Anteile in der x und z -Richtung sind dargestellt.

Für den Fall der Totalreflexion ($\theta_1 \geq \theta_{tot}$) kommt es zu einer Ausbreitung eines elektromagnetischen Feldes parallel zur Oberfläche, welches in dem Medium 2 exponentiell abnimmt. Man spricht hierbei von einem evaneszenten Feld.⁹⁹

Der Reflexionsgrad R_p für p-polarisiertes, einfallendes Licht an der Grenzfläche zwischen dem Medium 1 und Medium 2 wird durch die Fresnel-Gleichungen mit dem komplexen Reflexionskoeffizienten r_p ausgedrückt (siehe Kapitel 1.8.2.):

$$R_p = |r_p|^2 \quad (20)$$

$$r_p = |r_p| e^{-ib} = \left| \frac{\tan(\theta_1 - \theta_2)}{\tan(\theta_1 + \theta_2)} \right| e^{-ib} \quad (21)$$

Aus der Gleichung 21 ist ersichtlich, dass zwei Sonderfälle eintreten können. Zum einen kann $\theta_1 + \theta_2 = \frac{\pi}{2}$ sein, wodurch R_p null wird und kein Licht reflektiert wird (Brewster-Winkel). Zum anderen kann $\theta_1 - \theta_2 = \frac{\pi}{2}$ sein, wodurch R_p unendlich groß wird. Der

letzte Fall entspricht der Resonanz. Für den Resonanzfall können die Komponenten der Wellenvektoren durch die Gleichungen 22 und 23 ausgedrückt werden. Gleichungen 22 und 23 werden auch als SPR Dispersionsgleichungen bezeichnet.

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \quad (22)$$

$$k_{jz} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_j^2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \text{ mit } j = 1, 2 \quad (23)$$

Betrachtet man den Fall, dass das Medium 2 eine Metallschicht ist, welche eine große Anzahl an freien Elektronen aufweist, kann die dielektrische Funktion $\varepsilon_2(\omega)$ des Metalls, welche durch Gleichung 24 gegeben ist, bei einer Kreisfrequenz $\omega < \omega_p$ negativ werden.

$$\varepsilon_2(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (24)$$

ω_p wird als die Plasmafrequenz des Metalls bezeichnet. Unter der Voraussetzung, dass $\varepsilon_2 > -\varepsilon_1$, führt die negative Dielektrizitätskonstante des Metalls (ε_2) dazu, dass k_{jz} imaginär wird, wobei k_x real bleibt. Das bedeutet, dass eine elektromagnetische Welle parallel zur Oberfläche existiert, das Oberflächenplasmon. Das durch das Oberflächenplasmon erzeugte Feld erstreckt sich exponentiell abfallend in beide Medien und nimmt im Metall schneller ab als in dem dahinterliegenden Dielektrikum (Medium 2).

Die resonante Kopplung der eingestrahnten Lichtwelle mit einem Oberflächenplasmon wird als Oberflächenplasmonenresonanz bezeichnet. In diesem Fall wird die Energie des Lichtstrahls auf das Plasmon übertragen, wodurch die Intensität des Lichtstrahls ausgelöscht wird. Für die Oberflächenplasmonenresonanz müssen bestimmte Bedingungen erfüllt sein. Hierzu werden die Dispersionskurven, also die Abhängigkeit der Kreisfrequenz (ω) von dem Wellenvektor (k) der jeweiligen Wellen, betrachtet. Die Beträge der Wellenvektoren k werden gegen die Kreisfrequenz ω aufgetragen und so die Dispersionskurven erhalten. Die Dispersionskurven des Lichtstrahls und des Oberflächenplasmons müssen sich für eine resonante Kopplung schneiden.

Betrachtet man die Dispersionskurven für Licht und das Oberflächenplasmon (siehe Abbildung 18), fällt auf, dass sich die beiden Kurven nicht schneiden. Dies bedeutet, dass bei dieser Geometrie der benötigte Wellenvektor und die Kreisfrequenz nicht gleichzeitig

eingestellt werden können, um ein Oberflächenplasmon anzuregen. Eine Möglichkeit, dennoch ein Oberflächenplasmon zu erzeugen, ist, eine weitere Grenzfläche einzubringen. Hierfür wird die Metallschicht zwischen ein hochbrechendes Material (z.B. hochbrechendes Prisma) und dem Medium (z.B. Wasser, Puffer) eingebracht. Die Dispersionskurve des durch das hochbrechende Material einfallenden Lichtstrahls schneidet hierdurch die Dispersionskurve des Oberflächenplasmons.

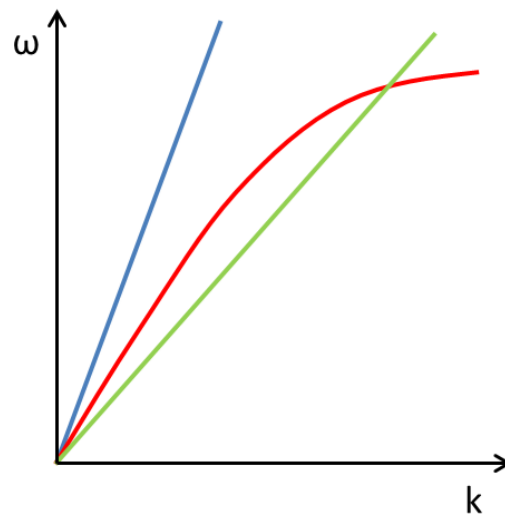


Abbildung 18: Dispersionskurven eines einfallenden Lichtstrahls ohne Verwendung eines Prismas (blau), mit Prisma (grün) und eines Oberflächenplasmons (rot). Nur bei Verwendung eines Prismas tritt eine Wechselwirkung der beiden Wellen auf und die Energie des Lichtstrahls kann auf das Plasmon übertragen werden, da sich in diesem Fall die rote und grüne Kurve schneiden.

Experimentell wird der einfallende Wellenvektor k_x durch Variation des Einfallswinkels angepasst (siehe Gleichung 25).

$$k_x = k_1 n_1 \sin(\theta_1) \quad (25)$$

Außerdem kann eine resonante Kopplung zwischen Licht und Plasmon nur erfolgen, wenn die einfallende Lichtwelle p-polarisiert ist, da aufgrund der sich parallel zur Oberfläche ausbreitenden Oberflächenplasmonwellen nur dann die Wellenvektoren der Plasmawelle und des Lichtstrahles überlagern können.

Die Dielektrizitätskonstante des Metalls und des dahinterliegenden Dielektrikums beeinflussen die resultierende Feldstärke des Oberflächenplasmons. Zwischen der

Dielektrizitätskonstanten und dem komplexen Brechungsindex (\tilde{n}) kann die in Gleichung 26 dargestellte Beziehung hergestellt werden.

$$\varepsilon = \tilde{n}^2 \quad (26)$$

Demnach führt eine Änderung des Brechungsindex in dem Medium zu einer Änderung der Feldstärke des Plasmons. Hierdurch verändert sich der Einfallswinkel, welcher für die Erzeugung der Oberflächenplasmonenresonanz nötig ist.

1.8.4.1. Aufbau eines SPR-Spektrometers

Die am weitesten verbreitete Umsetzung ist die sogenannte Kretschmann Konfiguration. Ein SPR-Spektrometer besteht aus einem Laser, einem Prisma, der Metalloberfläche auf einem Glassubstrat, einer Flusszelle und einem Detektor (siehe Abbildung 19).

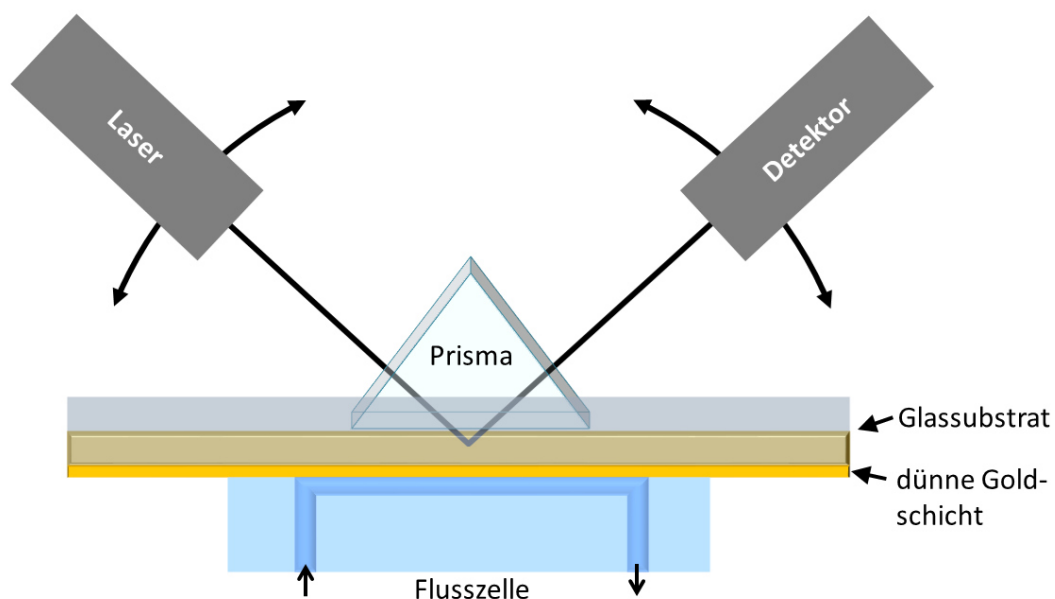


Abbildung 19: Schematischer Aufbau eines SPR-Spektrometers bestehend aus einem Laser, einem Prisma, welches auf einem goldbeschichteten Glassubstrat steht, und einem Detektor. Mithilfe der Flusszelle können verschiedene Flüssigkeiten über die Goldoberfläche geleitet und Veränderungen an dieser untersucht werden.

Der Laser erzeugt polarisiertes Licht, das auf das Prisma gestrahlt wird, welches auf die Metalloberfläche gesetzt wird. Das Prisma ist notwendig, um den Brechungsindex des Dielektrikums zu erhöhen, damit eine Resonanz auftreten kann. Als Metalloberflächen kommen häufig Silber oder Gold zum Einsatz. Die Intensität des an der Metalloberfläche reflektierten Lichtstrahls wird von dem Detektor analysiert. Die Flusszelle wird auf die Metalloberfläche gesetzt und ermöglicht, verschiedene zu untersuchende Medien an dieser vorbeizuspülen. Die Adsorption von Molekülen an der Rückseite der Metalloberfläche, auf welche eingestrahlt wird, führt zu einer Verschiebung des Plasmons, welches detektiert wird.¹⁰¹

Es gibt verschiedene Möglichkeiten eine SPR Messung darzustellen. Zum einen kann die zeitliche Veränderung des Winkels bei dem Minimum, bei welchem die Oberflächenplasmonresonanz auftritt, dargestellt werden. Zum anderen kann die reflektierte, relative Intensität gegen den Einfallswinkel aufgetragen werden. Die Kurve weist ein Minimum bei dem Einfallswinkel auf, bei welchem die Oberflächenplasmonenresonanz auftritt. Alternativ kann der zeitliche Verlauf der Intensität bei konstantem Winkel gemessen werden (siehe Abbildung 20).

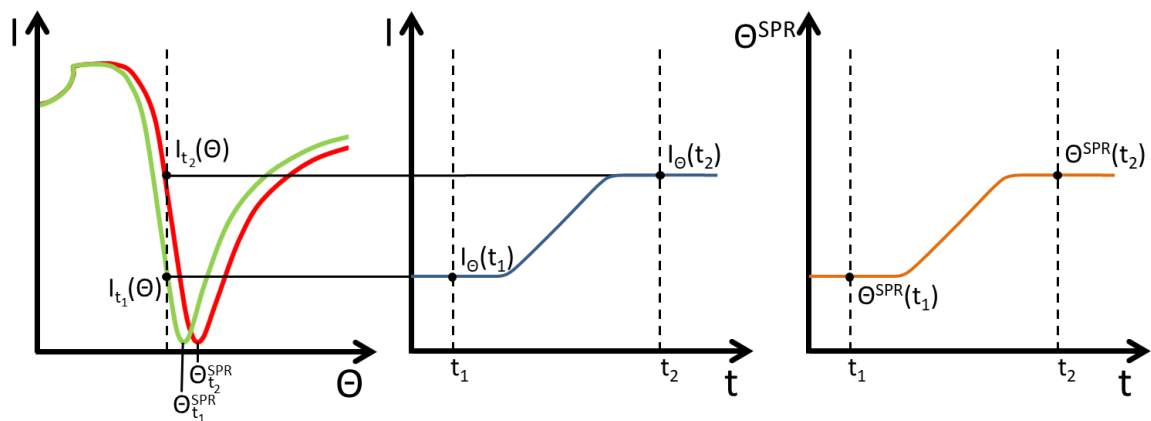


Abbildung 20: Möglichkeiten zur Auftragung von SPR-Messungen: Es kann entweder die reflektierte Intensität (I) gegen den Einfallswinkel (Θ) (linkes Diagramm) oder der zeitliche Verlauf (t) der Intensität (I) bei konstantem Winkel gemessen werden (mittleres Diagramm). Alternativ kann die zeitliche Veränderung des Winkels dargestellt werden, bei dem Minimum, bei welchem die Oberflächenplasmonresonanz auftritt (rechtes Diagramm).

1.8.5. Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie

Die Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) ist eine Variation der Infrarot(IR)-Spektroskopie und wird für die zerstörungsfreie Untersuchung von dünnen Schichten auf reflektierenden Oberflächen verwendet. Wie bei der herkömmlichen IR-Spektroskopie basiert das Messprinzip auf der Anregung von Molekülschwingungen durch die Absorption von Infrarot-Strahlung.^{102,103}

Der Aufbau eines IRRA-Spektrometers ist ähnlich dem eines IR-Spektrometers, jedoch wird der Strahl nicht durch die Probe geleitet, sondern an dieser reflektiert. In einem IRRA-Spektrometer wird IR-Strahlung auf die Probe gelenkt und an dieser reflektiert, wobei ein Teil der Strahlung von den Molekülen auf der Oberfläche absorbiert wird. Die reflektierte Strahlung wird abschließend detektiert.

Das Absorptionsspektrum der Beschichtung auf einem Substrat wird erhalten, indem in einer weiteren Messung analog zu dem beschichteten Substrat eine geeignete Oberfläche, welche möglichst dem unbeschichteten Substrat entspricht, vermessen wird (sog. *Background*-Messung). Aus der Differenz der beiden Messungen lässt sich das IR-Spektrum der Beschichtung berechnen. Zur Detektion kommen für dünne Schichten auf Oberflächen Halbleiterdetektoren, wie ein Mercury-Cadmium-Tellurid (MCT)-Detektor, zum Einsatz. Diese besitzen die benötigte Empfindlichkeit, um die kleinen Änderungen, welche durch die wenige Nanometer dünnen Schichten hervorgerufen werden, aufzulösen. Außerdem wird in einem flachen Einfallswinkel von 65 - 85° auf die Probe eingestrahlt, um die größtmögliche Sensitivität zu erreichen.^{103,104}

Eine Besonderheit ist die Auswahlregel für die IR-Spektroskopie an Metalloberflächen. Da bei IRRAS nur mit p-polarisiertem Licht angeregt werden kann, da sich bei Bestrahlung mit s-polarisiertem Licht das resultierende Feld an der Oberfläche aufhebt (vgl. Kapitel 1.8.1.), können nur Schwingungen mit anteilig senkrechter Ausrichtung des Übergangsdipolmoments zur Oberfläche angeregt werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, Orientierungen von Molekülen auf Oberflächen zu bestimmen.^{102,103}

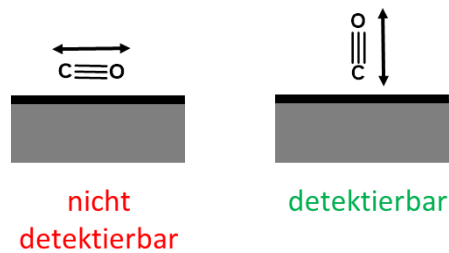


Abbildung 21: Anregbare Molekülschwingungen in der IRRAS: Es können nur Molekülschwingungen mit anteilig senkrechten Übergangsdipolmomenten angeregt werden. Dargestellt sind Molekülschwingungen von Kohlenmonoxid, parallel (links) und senkrecht (rechts) zur Oberfläche.

1.8.6. Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. *X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS) ist eine oberflächensensitive Methode, mit welcher Informationen über die elementare Zusammensetzung sowie die elektronische Struktur der Elemente von Oberflächen erhalten werden. Es handelt sich um keine zerstörungsfreie Methode, d.h. chemische Veränderungen der Probe während bzw. nach der Messung sind möglich.

Die Methode basiert auf dem äußeren photoelektrischen Effekt: Bei der XPS werden Elektronen durch Bestrahlung der Probe mit Röntgenstrahlung angeregt und ein Spektrum der Energien der emittierten Photoelektronen aufgenommen. Die kinetische Energie (E_{kin}), welche das emittierte Elektron nach der Freisetzung aus einem Orbital besitzt, hängt von der Energie der eingestrahlenen Röntgenstrahlung ($h\nu$) und der Bindungsenergie des Elektrons (E_B) ab und wird durch Gleichung 27 beschrieben.

$$E_{kin} = h\nu - E_B - \Phi \quad (27)$$

Die Konstante Φ ist die gerätespezifische Austrittsarbeit des Spektrometers. Zusätzlich gibt es für jede Probe noch eine probenspezifische Austrittsarbeit, welche allerdings für die direkte Messung nicht von Bedeutung ist. Die Normierung der Energie erfolgt durch Vergleich der Messwerte und Literaturwerte bekannter Signale. Auf diese Weise erhält man die Bindungsenergie des Elektrons (chemische Verschiebung), wodurch Rückschlüsse auf die Bindungssituation des jeweiligen Elements gezogen werden können.

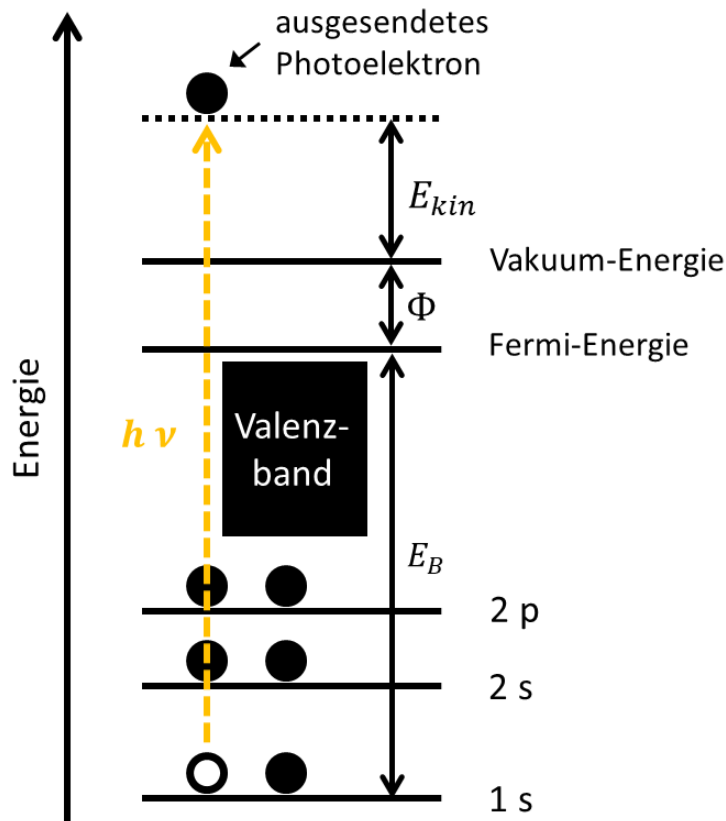


Abbildung 22: Energiediagramm zur Aussendung eines Photoelektrons: Durch das Einstrahlen mit Röntgenstrahlung ($h\nu$) wird ein Elektron aus dem 1s-Orbital angeregt. E_{kin} : kinetische Energie des Photoelektrons, E_B : Bindungsenergie des Elektrons, Φ : Austrittsarbeit.

Ein Elektron, welches aus dem Kohlenstoffatom einer Carbonylgruppe (durch eine Doppelbindung zu einem Sauerstoffatom gebundenes Kohlenstoffatom) emittiert wird, besitzt beispielweise eine andere Energie als jenes, welches aus einem einfach zu einem Sauerstoffatom gebundenen Kohlenstoffatom (z.B. Ether) emittiert wird.

Neben der Emission eines Photoelektrons können auch weitere Prozesse stattfinden. So kann das durch das emittierte Elektron entstandene Loch zu einer Relaxation eines höher gelegenen Elektrons führen. Die gewonnene Energie wird in Form von Licht (Röntgenfluoreszenz) oder durch die Entfernung eines höher gelegenen Elektrons (Auger-Elektron) freigesetzt. Auf diesen Phänomenen beruhen die Röntgenfluoreszenz- und Augerelektronenspektroskopie.¹⁰⁵

2. Die bearbeiteten Themen im übergeordneten Zusammenhang

Veränderungen biologischer Abläufe im menschlichen Körper können zur Erkrankung des Organismus führen. Die Erforschung biologischer Prozesse ist entscheidend, um die Entstehung von Krankheiten verstehen, verhindern oder therapieren zu können. Hierfür sind die Kenntnis der Struktur der beteiligten Biomoleküle und ein Verständnis für die Wechselwirkung der Biomoleküle untereinander von großer Bedeutung.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung innovativer Nanomaterialien zur Untersuchung von Biomolekülen, insbesondere Proteinen. Mehrere Projekte befassten sich mit der Optimierung der Strukturbestimmung von Biomolekülen mittels Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM). Darüber hinaus wurden biomimetische Materialien erforscht, welche ein Biomolekül oder ein Ensemble von Biomolekülen nachahmen und die Untersuchung der Wechselwirkung mit anderen Biomolekülen ermöglichen (siehe Abbildung 23)

Die Kryo-TEM ermöglicht die Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von Biomolekülen. Hierfür wird eine Probe des Biomoleküls mit Elektronen durchstrahlt. Anschließend kann aus den erhaltenen Daten die Struktur berechnet werden. Die Biomoleküle müssen zur Mikroskopie homogen verteilt auf einem möglichst dünnen Trägermaterial angebunden oder in den Löchern eines löchrigen Trägermaterials in einer dünnen Schicht aus amorphem Eis ausgefroren werden. Häufig stellt jedoch die Präparation einer Probe mit einer gleichmäßigen Verteilung der Biomoleküle ein großes Problem dar. Zur Verbesserung der Probenpräparation wurde eine Methode entwickelt, um konventionelle, löchrige Trägermaterialien proteinabweisend zu funktionalisieren. Außerdem wurden netzartige Membranen zur Stabilisierung der dünnen Eisschicht und kontinuierliche Membranen zur gezielten Anbindung von Biomolekülen zu entwickelt. Alle Entwicklungen führen zu einer homogenen Verteilung der Biomoleküle in der Mikroskopieprobe, jedoch mit unterschiedlichen Vorteilen. Als Trägermaterialien wurden sowohl Nanomembranen hergestellt als auch kommerzielle amorphe Kohlenstofffilme funktionalisiert. Generell ist eine unspezifische Adsorption von Biomolekülen an den Trägermaterialien unerwünscht, da sie zu einer inhomogenen Verteilung der Biomoleküle führen kann. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Nanomembranen entweder mit einem biorepulsiven Hydrogel beschichtet oder direkt aus diesem hergestellt. So konnten

einerseits wenige Nanometer dicke, netzartige und kontinuierliche Membranen aus polymeren Hydrogelen durch chemische Quervernetzung erhalten werden. Andererseits wurden Kohlenstoffnanomembranen durch die Bestrahlung einer selbstanordnenden Monolage (SAM) mit Elektronen hergestellt und weiter modifiziert. Für kommerziell erhältliche Trägermaterialien wie amorphe Kohlenstofffilme konnte eine Methode zur biorepulsiven Funktionalisierung durch die nicht-kovalente Beschichtung mit einem Hydrogel gefunden werden. Die entwickelten Membranen oder Beschichtungen erlauben die Präparation qualitativ hochwertiger Proben mit homogen verteilten Biomolekülen, welche sich besonders für die Kryo-TEM-Mikroskopie eignen.

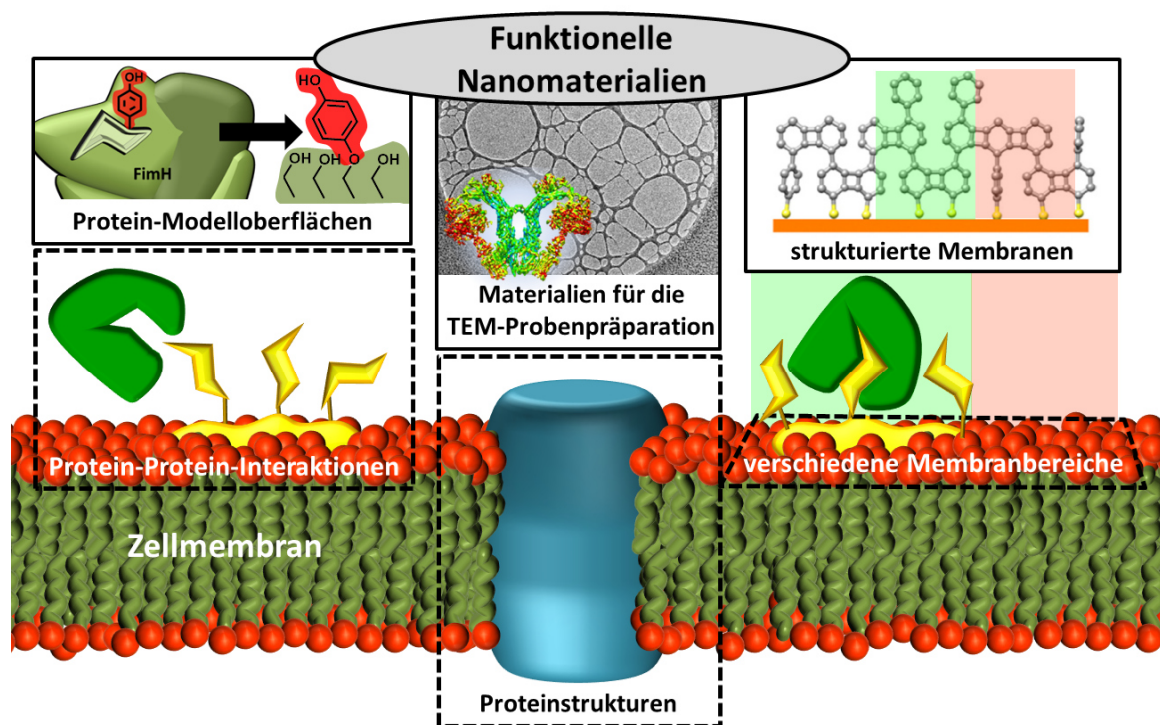


Abbildung 23: Funktionelle Nanomaterialien ermöglichen die Untersuchung biologischer Systeme, wie Zellmembranen. Diese bestehen aus Phospholipid-Doppelschichten (olivgrün/orange), welche eine Vielzahl verschieden strukturierter Bereiche aufweisen. Proteine können die Membranen durchdringen (blau, Transmembranprotein), oder in diese integriert (gelb, Glykoprotein) sein und sind dort in verschiedene biologische Prozesse (z.B. Protein-Protein-Interaktionen) involviert. Nanomaterialien können in verschiedenen Bereichen dazu beitragen, derartige biologische Systeme zu untersuchen. Nanomaterialien können die Probenpräparation von Membranproteinen zur Strukturbestimmung mittels Kryo-TEM erleichtern. Außerdem können Oberflächenbeschichtungen im Nanometerbereich hergestellt werden, welche die Peripherie eines Proteins nachbilden und als Protein-Modelloberfläche dienen können. Strukturierte Nanomembranen können verschiedene Bereiche biologischer Membranen nachbilden und als Modell für diese verwendet werden.

Zur gezielten Anbindung eines markierten Biomoleküls konnte eine biorepulsive Membran mit spezifischen Erkennungsstellen versehen werden. Die Minimierung der

unspezifischen Adsorption durch die biorepulsive Hydrogel-Beschichtung des Trägermaterials ermöglicht hierbei erst die spezifische Anbindung von markierten Biomolekülen. Im Rahmen dieses Projektteils wurde eine Nanomembran entwickelt, welche mit einem Nitrilotriessigsäure(NTA)-Derivat funktionalisiert wurde. Die NTA-Funktionalisierung ermöglichte die spezifische Anbindung von His-Tag markierten Biomolekülen aus einer Mischung verschiedener Biomoleküle. Das angebundene Biomolekül kann anschließend mittels TEM strukturell analysiert werden.

Neben der dreidimensionalen Struktur einzelner Biomoleküle ist auch deren Zusammenspiel in biologischen Prozessen von Interesse. Wenn eine Untersuchung des realen Systems nicht oder nur schwer durchführbar ist, kann es von Vorteil sein, auf ein Modellsystem auszuweichen, um die daraus erhaltenen Informationen auf das biologische System zu übertragen. Aus diesem Grund wurden auch Nanomaterialien untersucht, welche die Peripherie einzelner Biomoleküle oder deren Ensembles abbilden.

Zur Darstellung der Peripherie einzelner Biomoleküle wurde ein Modellsystem für die Umgebung einer Mannose-Bindungstasche des Proteins FimH entwickelt. Die Seitenkette einer speziellen Aminosäure im Protein, welche sich in der Nähe der Mannose-Bindungstasche befindet, sollte mit einer photoschaltbaren Einheit modifiziert werden. Diese sollte das lichtinduzierte Öffnen und Schließen der Tasche ermöglichen. Zum Aufbau eines Modellsystems wurde eine Oberflächenbeschichtung entworfen, welche die chemische Umgebung der Bindungstasche dieses Proteins nachahmt. Hierfür wurde wieder eine biorepulsive Hydrogel-Matrix verwendet, in welcher die Aminosäure-Seitenkette eingebaut wurde. Die Wertigkeit der von der Arbeitsgruppe Lindhorst (Universität Kiel) vorgeschlagenen Ligationsstrategie zur Modifizierung der Aminosäureseitenkette im Protein konnte anhand der Modelloberfläche mithilfe eines Bakterienadhäsionstests bestimmt werden.

Eine Zellmembran ist ein Ensemble von verschiedenen Biomolekülen. Zum Verständnis der Wechselwirkung verschiedener Biomoleküle miteinander ist es interessant, einfache biologische Systeme nachzustellen und bestimmte Wechselwirkungen zu betrachten. Hierfür wurde eine Methode zur Herstellung mehrfach strukturierter Membranen erforscht, welche vereinfacht versucht, die Oberfläche einer Biomembran nachzuahmen. Derartige Biomembranen sind aus einer Vielzahl von Biomolekülen aufgebaut und weisen mannigfaltige Funktionalitäten auf. Die biomimetischen Membranen wurden in

Anlehnung an Herstellungsverfahren von in früheren Projekten verwendeten Trägermaterialien durch Quervernetzung einer strukturierten SAM mit einem Elektronenstrahl erhalten. Durch die Laserstrukturierung einer Monolage und anschließendem Austausch der bestrahlten Bereiche gelang die Herstellung einer SAM, welche aus unterschiedlichen SAM-bildenden Molekülen aufgebaut ist. Die Wahl der unterschiedlichen SAM-bildenden Moleküle in den diversen Bereichen führt später zu den verschiedenen Funktionalitäten der Membranoberfläche. Die Laserstrukturierung ermöglicht die Herstellung biologisch relevanter Strukturen im Mikrometerbereich. Nach Quervernetzung dieser strukturierten SAM durch Bestrahlung mit Elektronen können freistehende Membranen erhalten werden. Die Methode dient als Grundlage für die zukünftige Entwicklung einfacher Modellmembranen für biologische Systeme.

Zusammenfassend tragen die Nanomaterialien, welche in dieser Arbeit entwickelt wurden, zum Verständnis biologischer Prozesse bei, indem sie die Möglichkeiten zur Strukturbestimmung mittels TEM für bestimmte Proteine erweitern und als Modellsystem die Untersuchung von biologischen Prozessen an einem Biomolekül oder einem Ensemble von Biomolekülen ermöglichen.

3. Bearbeitete Projekte: Innovative Trägermaterialien für die Kryoelektronenmikroskopie

3.1. Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie von Membranproteinen

In den letzten Jahren hat das Interesse an der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM), unter anderem durch die Vergabe des Chemie-Nobelpreises, stark zugenommen.¹⁰⁶ Die Kryo-TEM ermöglicht die dreidimensionale Strukturbestimmung von Biomolekülen in einer nahezu natürlichen Umgebung. Die Kenntnis der nativen Struktur eines Biomoleküls ist von großer Bedeutung, um biologische Systeme verstehen zu können. Insbesondere seit 2013 hat die Entwicklung auf dem Gebiet der Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie stark zugenommen, was insbesondere auf die Entwicklung einer neuen Generation von Elektronendetektoren zurückzuführen ist, welche die Aufnahme von Daten erlauben, die nahezu atomare Auflösung möglich machen.^{5,107}

Trotz des Fortschrittes, welcher durch die Entwicklung neuer Detektoren erreicht werden konnte, ist die Mikroskopie vieler Biomoleküle schwierig. Die Präparation einer qualitativ hochwertigen Probe, die Aufnahmen mit einer guten Auflösung zulässt, stellt ein großes Problem dar. Die Biomoleküle müssen für die Mikroskopie in einer wenige Nanometer dicken Schicht aus amorphem Eis in den Mikrometer großen Löchern eines amorphen Kohlenstofffilms ausgefrozen werden (siehe Kapitel 1.2.1.). Insbesondere bei Membranproteinen ist dies problematisch. Membranproteine treten nativ innerhalb einer hydrophoben Membran auf und weisen deshalb große hydrophobe Bereiche auf. Diese neigen bei gelösten Proteinen zur Aggregation. Um dies zu verhindern, setzt man dem Puffermedium Detergenzien zu, welche sich an die hydrophoben Bereiche anlagern, sodass eine hydrophile Oberfläche in das wässrige Medium präsentiert wird. Eine Aggregation wird somit verhindert.

Die Detergenzien führen allerdings zu einer Reduktion der Oberflächenspannung, was zu einer Ausdünnung des Wasserfilms und einer Verdrängung der Proteine an die Ränder der Löcher des Kohlenstofffilms führt. Dort neigen die Proteine aufgrund ihrer

hydrophoben Bereiche dazu, an dem hydrophoben Kohlenstofffilm zu adsorbieren. Als Resultat befinden sich keine Proteine, die mikroskopiert werden können, in der amorphen Eisschicht, welche die Löcher des Kohlenstofffilms überspannt.

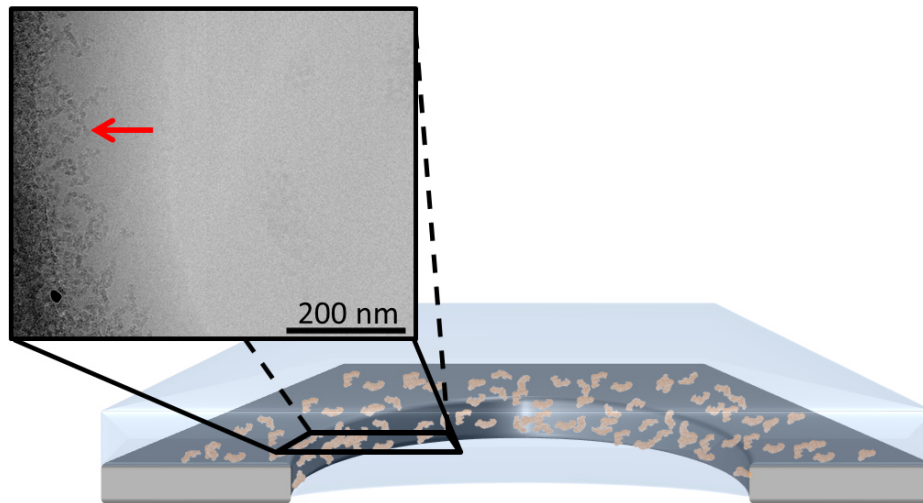


Abbildung 24. Akkumulation und Adsorption von Membranproteinen an dem amorphem Kohlenstofffilm eines TEM-Netzes. Es befinden sich keine Membranproteine mehr in der Mitte der Löcher, welche mikroskopiert werden können. Die TEM-Aufnahme zeigt den Komplex I aus *Yarrowia lipolytica*, welcher mithilfe eines kommerziellen Kohlenstofflochsfilms nach einem Standardprotokoll präpariert wurde.³⁵

Die Adsorption von Membranproteinen an dem amorphem Kohlenstofffilm kann durch eine biorepulsive Beschichtung des TEM-Netzes verhindert werden. Eine Möglichkeit hierfür ist das Überziehen des Kohlenstofffilms mit einer wenige Nanometer dicken Schicht aus Gold. Auf dieser wird anschließend ein Oligoethylenglykol-SAM abgeschieden, welcher die Goldoberfläche biorepulsiv funktionalisiert.¹⁰⁸ Eine Hydrophilisierung des Kohlenstofffilms durch eine Behandlung im Gasentladungsplasma, wie es häufig durchgeführt wird, um wässrige Proben auf TEM-Netzen applizieren zu können, ist nicht ausreichend, um die Anhaftung zu verhindern.²⁵

Nanomembranen mit biorepulsiven Eigenschaften und spezifischen Erkennungsstellen sind interessante Trägermaterialien für die Kryo-TEM, da sie die Anbindung gewünschter, markierter Biomoleküle aus einer Mischung verschiedener Biomoleküle ermöglichen (vergleiche Kapitel 1.7. und 3.5.). Zur Fabrikation einer biorepulsiven Nanomembran kann entweder eine bereits bestehende Nanomembran biorepulsiv funktionalisiert werden oder eine Nanomembran direkt aus einem biorepulsiven Material

hergestellt werden. Sowohl Methoden zur direkten Herstellung einer Membran aus einem Hydrogel (Kapitel 3.2. und 3.3.) als auch die nachträgliche Funktionalisierung (Kapitel 3.4. und 3.5.) wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt.

Zur Herstellung einer Nanomembran direkt aus einem biorepulsiven Material bietet sich die Bildung eines polymeren Hydrogels an, da die Quervernetzung polymerer Hydrogele bereits vielfach untersucht wurde und in unterschiedlichsten Bereichen Anwendung findet.^{57,109,110} Meyerbröker *et al.* zeigten bereits, dass es möglich ist, aus PEG-Derivaten freistehende Nanomembranen herzustellen, welche sich für die TEM eignen.²² Idealerweise jedoch weist das Hydrogel nach der Quervernetzung reaktive Gruppen auf, welche eine weitere Funktionalisierung ermöglichen. Es wurden zwei Arten von Quervernetzern untersucht, welche zu verschiedenartigen Membranstrukturen führen. Die Verwendung des Polymerisationsquervernetzers Ethylenglykoldiglycidylether (EGDGE) führt zu kontinuierlichen Hydrogel-Nanomembranen mit einstellbarer Dicke (Kapitel 3.2.). Dahingegen führt die Quervernetzung mit 1,11-Di(mesyloxy)-3,6,9-trioxaundecan ($M_{s_2}TEG$) zu freistehenden, selbst-perforierenden Hydrogel-Nanomembranen (self-perforated hydrogel-nanomembranes, SPHyNs), welche eine Netzstruktur aufweisen (Kapitel 3.3.).

Zur nachträglichen Funktionalisierung wurden zum einen Kohlenstoffoberflächen mit Pyren-haltigen Hydrogelen nicht-kovalent biorepulsiv beschichtet (Kapitel 3.4.). Hierbei erfolgt die Anbindung des Hydrogels über die Wechselwirkung der Pyren-Einheit mit der Kohlenstoffoberfläche. Zum anderen wurden Kohlenstoffnanomembranen durch die kovalente Anbindung eines Hydrogels biorepulsiv funktionalisiert. Auf den erhaltenen biorepulsiven Nanomembranen konnten außerdem spezifische Erkennungsstellen für die gezielte Anbindung von Biomolekülen angebracht werden (Kapitel 3.5.).

3.2. Aufbau kontinuierlicher Hydrogel-Nanomembranen durch Quervernetzung

In diesem Projekt wurde die Herstellung einer kontinuierlichen Hydrogel-Nanomembran und deren Eignung als Trägermaterial für die Kryo-TEM untersucht. Es wurden biorepulsive, Nanometer dicke, freistehende Membranen aus quervernetztem Polyglycerol (PG) erhalten, die erfolgreich auf TEM-Netze mit Kohlenstofflochfilm transferiert werden konnten. Außerdem wurde gezeigt, dass sich diese Membranen als Trägermaterial für die TEM eignen.

3.2.1. Herstellung von Hydrogel-Nanomembranen durch Quervernetzung von Polyglycerol mit EGDGE und deren Charakterisierung

Zunächst wurde untersucht, wie eine nur wenige Nanometer dicke Membran aus einem biorepulsiven Material erhalten werden kann. Als biorepulsives Material fiel die Wahl auf Polyglycerol (PG), ein Polymer, welches in Kontakt mit einem wässrigen Medium ein Hydrogel ausbildet, was dafür bekannt ist, die Adsorption von Biomolekülen zu unterdrücken. PG kann leicht durch die Polymerisation von Glycidol hergestellt werden (siehe Kapitel 1.6.1.). Außerdem weisen die einzelnen PG-Dendrimere eine Vielzahl an Hydroxy-Gruppen auf, welche sich sehr gut für eine Quervernetzung eignen. Durch die Quervernetzung sollen die Eigenschaft des PG, ein biorepulsives Hydrogel auszubilden, möglichst erhalten bleiben. Außerdem soll die Nanomembran funktionelle Gruppen aufweisen, welche sich für eine Funktionalisierung eignen. Ethylenglykoldiglycidylether (EGDGE) eignet sich für die Quervernetzung von Hydrogelen.¹¹¹⁻¹¹³ EGDGE besteht aus zwei Glycidoleinheiten, welche über eine Ethylenbrücke miteinander verbunden sind. Bei der Quervernetzung werden quasi Glycerin- und Ethylenglykol-Einheiten in das Polymer eingebaut, weswegen keine Änderung der biorepulsiven Eigenschaften zu erwarten ist. Zusätzlich hat eine Quervernetzung von PG mit EGDGE den Vorteil, dass die Anzahl der Hydroxygruppen vor und nach der Quervernetzung gleich bleiben (siehe Abbildung 25). Diese stehen für eine spätere Funktionalisierung zur Verfügung. Außerdem können die

neu gebildeten Hydroxygruppen mit einem weiteren EGDGE-Molekül reagieren, wodurch der Hydrogelfilm unter Quervernetzung weiter aufgebaut wird.

Ab einer bestimmten Dicke sollten ausreichend vernetzte Filme erhalten werden, um freistehende, kontinuierliche Membranen aus diesen herzustellen zu können, ohne dass diese kollabieren.

Zur Herstellung der Hydrogel-Nanomembranen wurde ein Disulfid-funktionalisiertes Polyglycerol-Derivat durch die Polymerisation von Glycerol mit Cystamin als Initiator synthetisiert.

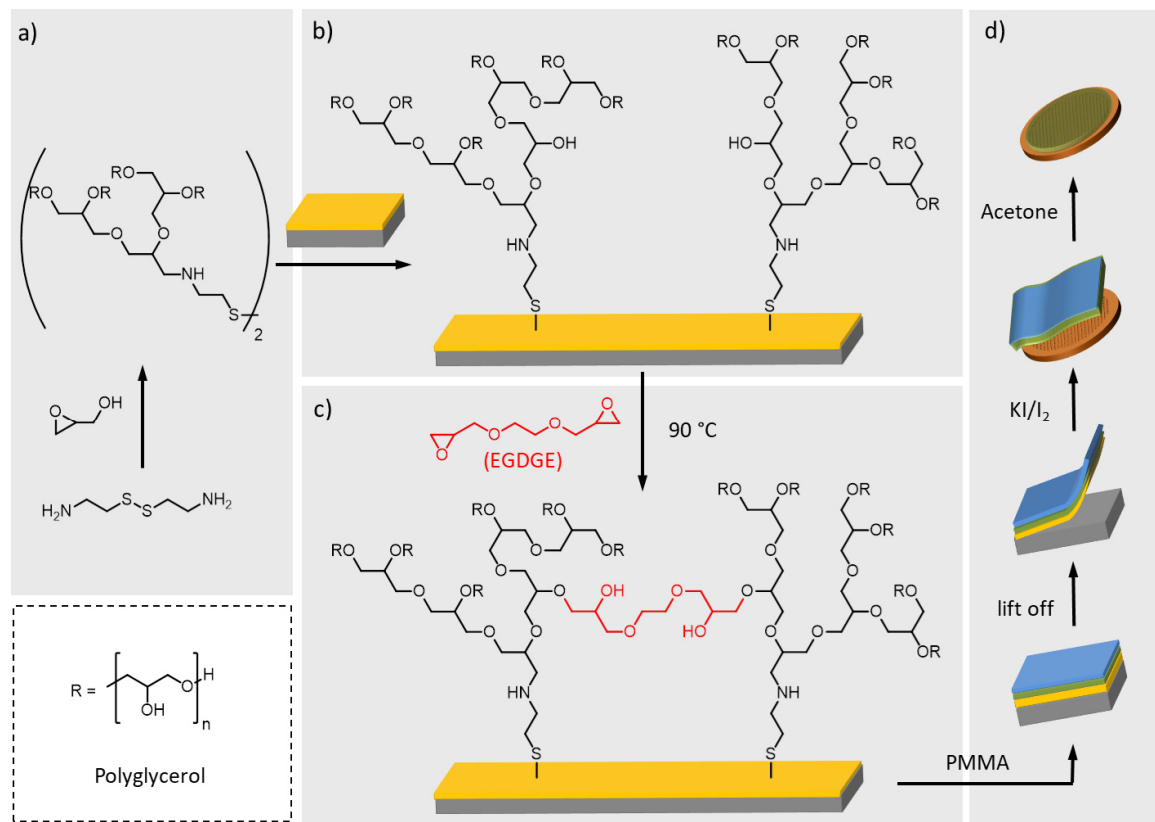


Abbildung 25: Quervernetzung zweier PG-Dendrimere mit EGDGE (rot): a) Synthese des Disulfid-funktionalisierten Polyglycerolderivates. b) Abscheidung auf einer Goldoberfläche. c) Durch die Reaktion mit EGDGE wird das PG quervernetzt, wobei die Anzahl an Hydroxygruppen im Polymer erhalten bleibt. Hierdurch kann die Schicht durch eine weitere Reaktion der Hydroxygruppen mit EGDGE-Molekülen zusätzlich verstärkt werden. d) Transfer der Membran auf ein TEM-Netz.

Nach der Abscheidung des Moleküls auf einer Goldoberfläche aus einer 5 µM ethanolischen Lösung konnten PG-Schichten mit einer ellipsometrischen Schichtdicke

von 3.4 ± 0.5 nm erhalten werden. Die Quervernetzung des PG-Films mit EGDGE erfolgte durch Erhitzen der Substrate in frisch destilliertem EGDGE. Abschließend wurden die Membran von dem Gold abgelöst und auf TEM-Netze transferiert (siehe Abbildung 25).

Die Untersuchungen des Einflusses der Temperatur auf die Quervernetzung zeigten, dass die Quervernetzung erst ab einer Temperatur von 90 °C zufriedenstellend abläuft. Bei 80 °C wurde nach 21 Stunden lediglich ein Schichtdickenzuwachs von 0.8 ± 0.4 nm gemessen. Generell führte die Verwendung höherer Temperaturen ($110 - 150\text{ °C}$) zu starken Schwankungen in den erhaltenen Schichtdicken verschiedener Chargen, was auf die Desorption der SAMs zurückzuführen ist.¹¹⁴⁻¹¹⁷

Zur Untersuchung der Desorption wurden nicht quervernetzte PG-Schichten in Tetraethylglykol erhitzt, da dieses EGDGE ähnlich ist, aber nicht zum Schichtaufbau beitragen kann. Das Erhitzen einer PG-Oberfläche für 6 Stunden auf 120 °C führte dazu, dass diese zu 95 % abgebaut wurde. Bei 90 °C wurde die Schicht deutlich langsamer abgebaut (etwa 65 % Schichtabbau nach 18 Stunden).

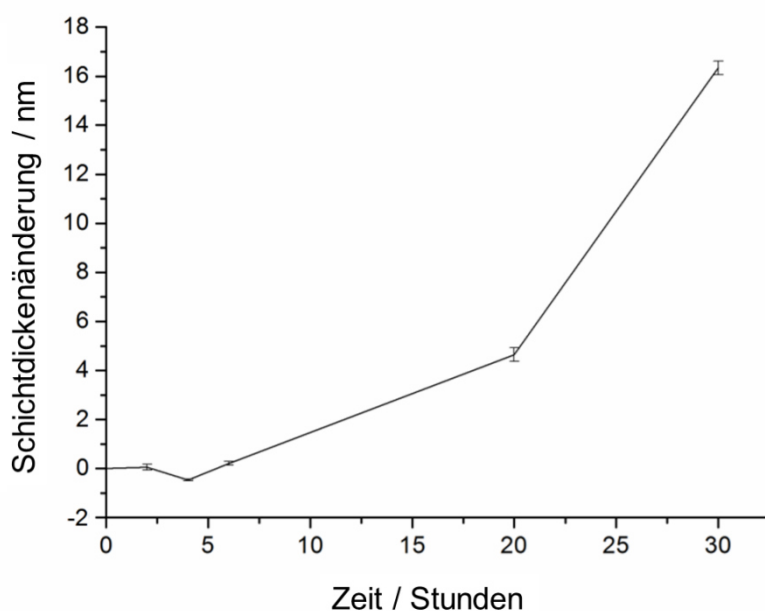


Abbildung 26: Schichtdickenänderung für die Polymerisationsquervernetzung einer PG-Monolage mit EGDGE bei 90 °C : Zunächst kommt es zu einer leichten Abnahme der zu Beginn etwa 3.5 nm dicken PG-Schicht. Anschließend findet jedoch ein Schichtaufbau unter Quervernetzung der Schicht statt.

Die Quervernetzung wurde weiterhin bei 90 °C untersucht, da davon ausgegangen wurde, dass unter diesen Bedingungen eine bestmögliche Kontrolle des Schichtwachstums möglich ist. Für kurze Quervernetzungszeiten bei 90 °C (wenige Stunden) wird zunächst eine Abnahme der Schichtdicke beobachtet. Dies ist auf die thermische Desorption der SAMs zurückzuführen. Nachdem mehrere PG-Dendrimere auf der Oberfläche quervernetzt sind, kommt es vermutlich zu einem kooperativen Effekt, der die Schicht stabilisiert. Es findet dann keine Desorption mehr statt und die Schichtdicke wächst an (siehe Abbildung 26).

Da homogene Membranen erhalten werden sollen, deren Schichtdicke durch die Polymerisationszeit weitestgehend kontrolliert werden kann, soll der Schichtabbau möglichst minimiert werden. Aus diesem Grund wurde die Polymerisation bei 90 °C als optimal gefunden. Jedoch wurden auch bei 90 °C Schwankungen zwischen verschiedenen Chargen im Bereich von ein bis zwei Nanometern festgestellt.

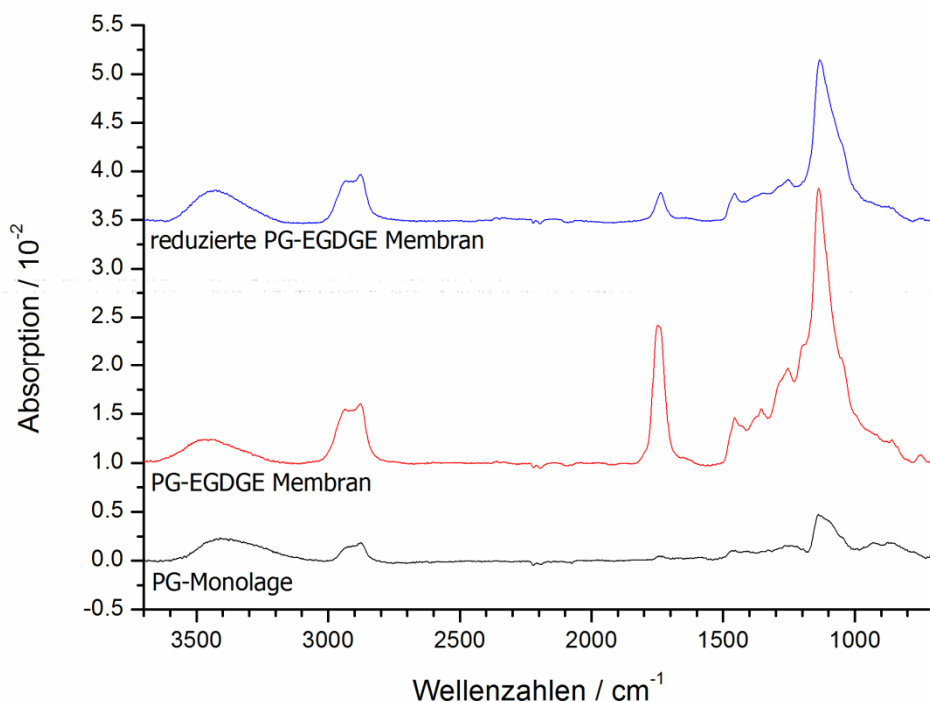


Abbildung 27: IRRA-Spektren vor (schwarz) und nach (rot) der Quervernetzung einer PG-Monolage mit EGDGE, sowie das IRRA-Spektrum nach der Reduktion einer quervernetzten PG-EGDGE-Membran mit Natriumborhydrid (blau): Nach der Quervernetzung ist ein deutlicher Zuwachs der Intensität der Banden zu verzeichnen. Die zusätzliche Bande bei 1740 cm⁻¹ ist auf eine Oxidation des Polymers zurückzuführen. Aufgrund der Ähnlichkeit der Einheiten, welche in die PG-Schicht eingebaut werden, treten keine weiteren neuen Banden auf. Durch die Reduktion der quervernetzten Oberfläche mit Natriumborhydrid kann der Carbonylpeak verkleinert werden, es kommt jedoch auch zu einem leichten Abbau der Schicht.

Die Charakterisierung der vernetzten Membranen mittels IRRAS (siehe Abbildung 27) zeigte die für PG typischen Banden. Zu diesen gehören die Streckschwingungen der Hydroxygruppen im Bereich von 3200 bis 3600 cm^{-1} , die symmetrische und asymmetrische Methylen-Streckschwingung (2920 und 2880 cm^{-1}) und die symmetrische und asymmetrische Ether-Streckschwingung (900 und 1180 cm^{-1}). Die Bande bei 1740 cm^{-1} ist auf eine teilweise Oxidation des Hydrogels zurückzuführen. Diese fiel bei verschiedenen Substraten, welche unter gleichen Bedingungen quervernetzt wurden, unterschiedlich stark aus (siehe Abbildung 27, rot).

Eine Oxidation des Hydrogels ist unerwünscht, da sie zu einer Änderung der biorepulsiven Eigenschaften führen kann. Durch Einlegen der Substrate in eine 3 %ige Natriumborhydrid-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur konnte die Oxidationsbande für viele Substrate stark reduziert und nur ein geringer Abbau der Membran beobachtet werden (siehe Abbildung 27, blau). Die notwendige Reaktionszeit muss jedoch an die jeweilige Stärke der Oxidationsbande des jeweiligen Substrates und Schichtdicke angepasst werden, sodass hier keine generelle Aussage möglich ist.

3.2.2. TEM-Untersuchungen der Hydrogel-Nanomembranen

Die auf Goldoberflächen hergestellten Hydrogel-Nanomembranen wurden hinsichtlich ihrer Stabilität im TEM untersucht. Hierfür wurden die Membranen von der Goldoberfläche mit einer etablierten Transfermethode (siehe Kapitel 3.3.1.) auf TEM-Netze mit Kohlenstofflochfilm übertragen. Anschließend wurden die Membranen im TEM verschiedenen Elektronendosen ausgesetzt, wie sie für die Bio-TEM üblich sind. Ziel war es, eine möglichst dünne Membran herzustellen, welche eine ausreichende Stabilität aufweist.

Hier stellte sich heraus, dass die Hydrogel-Nanomembranen ab einer Dicke von etwa 5 nm genügend stabil sind, um sie für mehrere hundert Millisekunden dem Elektronenstrahl auszusetzen. Außerdem wurde das Experiment ohne Aufbringen einer Probe und bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch die tiefen Temperaturen während des Kryo-Experiments und dem zusätzlichen amorphen Eisfilm sollten die Membranen weiter stabilisiert werden.

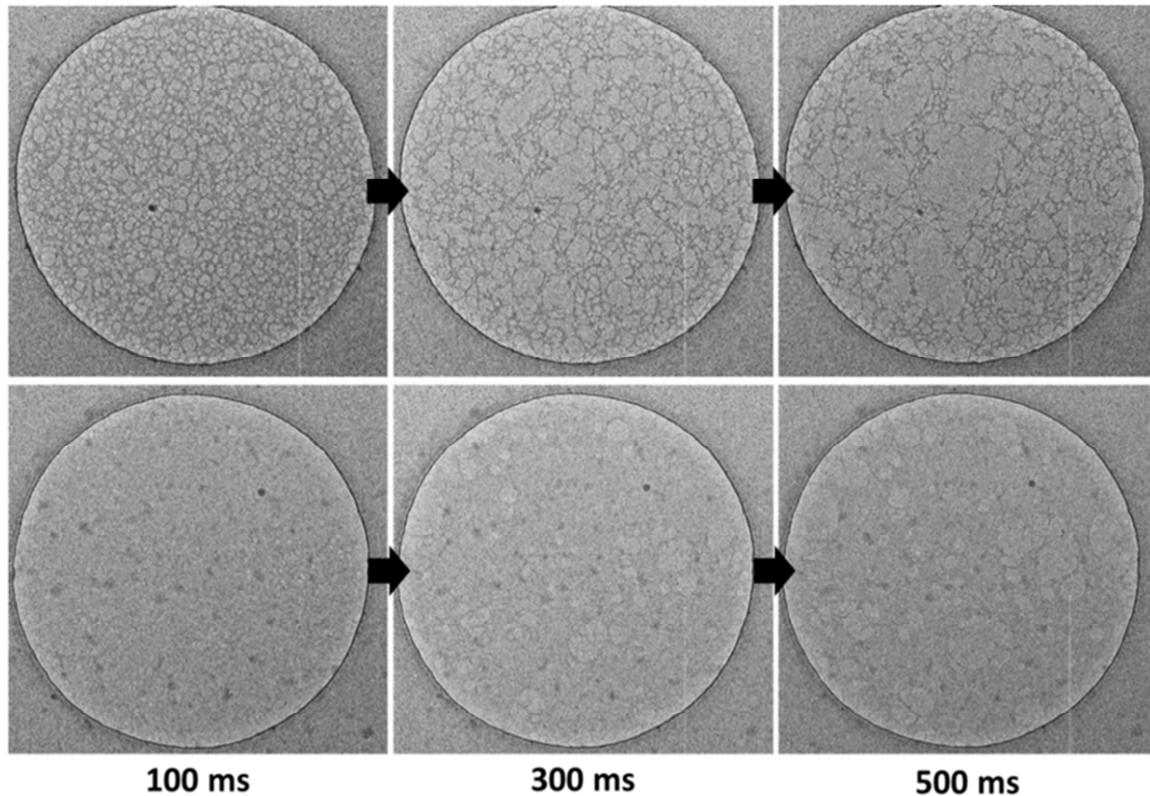


Abbildung 28: Bestrahlung einer Hydrogel-Membran bei 120 kV und Raumtemperatur im TEM: Eine etwa 2 nm dicke Membran perforiert bereits bei einer geringen Elektronendosis (obere Reihe). Eine etwa 5 nm dicke Membran zeigt erst ab einer Bestrahlungsdosis von 300 ms erste Löcher. Bei 500 ms ist immer noch ein Großteil der Membran erhalten (untere Reihe).

3.2.3. Schlussfolgerungen

Polyglyceroldendrimere, welche mit einer Disulfid-Einheit funktionalisiert werden, eignen sich zur Herstellung Nanometer dicker Filme auf Goldoberflächen. Die Quervernetzung mit dem Polymerisationsquervernetzer EGDGE ermöglicht zum einen die Quervernetzung der Polyglycerolfilme, zum anderen können die Hydrogel-Schichten durch die Polymerisation von EGDGE weiter aufgebaut werden. Die Quervernetzung bei 90 °C hat sich bewährt, da bei höheren Temperaturen ein stärkerer Abbau des PG-SAMs festgestellt wurde, welcher zu nicht reproduzierbaren Schichtdicken der resultierenden Filme führt. Die quervernetzten Hydrogel-Filme können als freistehende, kontinuierliche Membran auf TEM-Netze transferiert werden. Ab einer Dicke von 5 nm weisen die Membranen, unter den für Bio-TEM-Experimente üblichen Bedingungen, eine ausreichende Stabilität auf.

3.2.4. Experimentelles

Materialien

Silicium(100)-Wafer (Wacker Chemie AG) wurden mit 200 nm Gold bedampft (Aufdampftrate 1.0 – 2.0 Å/s; Pfeiffer Vacuum Classic 50). Ethylenglykoldiglycidylether (EGDGE) des Reinheitsgrades „technisch“ wurde kommerziell erworben (TCI Deutschland GmbH) und direkt vor der Verwendung destilliert.

Transfer der Hydrogel-Membranen

Der Transfer der Hydrogel-Membranen erfolgte analog zu dem Transfer von SPHyNs, welcher in der Veröffentlichung 35 beschrieben ist.

Herstellung von PG-Schichten auf Gold

Die Synthese des Disulfid-haltigen PG-Derivates und dessen Abscheidung auf Goldoberflächen ist in Quelle 35 veröffentlicht.

Quervernetzung mit EGDGE

Ein Glasgefäß mit flachem Boden (ca. 25 x 15mm), einer Höhe von 20 mm, Glas-Schraubgewinde (GL32), Schraubdeckel (GL32, Polyphenylensulfid und Silikon/PTFE-Dichtung) und seitlichem Schlenkhahn wurde im Vakuum ausgeheizt. Unter Schutzgasatmosphäre wurden die PG-beschichteten Gold-Substrate in das Gefäß gegeben. Das frisch destillierte EGDGE wurde auf das Substrat gegeben, sodass dieses komplett bedeckt war. Die Lösung wurde für 10 Minuten im Vakuum entgast. Anschließend wurde das Gefäß im Ölbad für die gewünschte Zeit auf die gewünschte Temperatur erhitzt. Nach Ende der Reaktionszeit wurde das Gefäß auf Raumtemperatur gekühlt. Abschließend wurde das Substrat mit destilliertem Wasser und Ethanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet.

Ellipsometrie

Zur Bestimmung von Schichtdicken sowie Substratparametern von Gold wurden Ellipsometrie-Messungen an einem Sentech Ellipsometer (SE400) durchgeführt. Der Laserstrahl mit der Wellenlänge 632.8 nm fiel unter einem Winkel von 70° auf die Probe.

Für die Bestimmung der Schichtdicken wurden für die Hydrogel-Schichten folgende Parameter verwendet: $n = 1.450$, $k = 0.000$.

IRRAS

IRRAS-Messungen wurden an einem Nicolet 6700 FT-IR-Spektrometer aufgenommen. Es wurde ein MCT-Detektor verwendet. Der Innenraum des Spektrometers wurde mit trockener und CO₂-freier Luft gespült. Für jedes abgebildete Spektrum wurden jeweils 256 Scans aufgenommen.

TEM

Die Membranen wurden bei Raumtemperatur an einem FEI Tecnai Spirit TEM mit einer Gatan CCD Kamera (Auflösung 4k x 4k) bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV aufgenommen.

3.3. Selbst-perforierende Hydrogel-Nanomembranen zur Verbesserung der Proteinverteilung auf TEM-Netzen

Um die Oberfläche eines TEM-Netzes biorepulsiv zu funktionalisieren, ist es denkbar, den Kohlenstofffilm mit einer kontinuierlichen Membran abzudecken. Im Rahmen dieses Projektes entwickelten wir selbst-perforierende Hydrogel-Nanomembranen (self-perforated hydrogel-nanomembranes, SPHyNs), welche die Probenpräparation von Membranproteinen signifikant verbessern. Zum einen bedecken SPHyNs den amorphen Kohlenstofffilm mit einer Schicht aus biorepulsivem Hydrogel, zum anderen bilden sie in den Löchern des amorphen Kohlenstofffilms ein feines Hydrogelnetzwerk, welches den Wasserfilm während der Probenpräparation stabilisiert (siehe Abbildung 29).

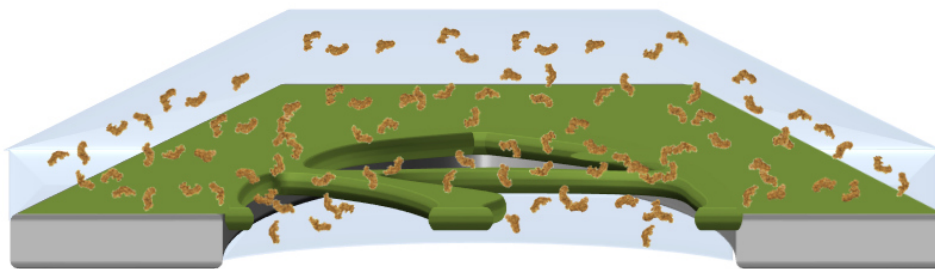


Abbildung 29: Darstellung eines Lochs in einem amorphen Kohlenstofflochfilm, welches mit einer SPHyN bedeckt ist. Der kontinuierliche Kohlenstofffilm wird biorepulsiv mit einem Hydrogel bedeckt. In den Löchern stabilisiert ein feines Netzwerk aus Hydrogel den dünnen Wasserfilm. Dies führt zu einer gleichmäßigen Verteilung der Proteine.³⁵

Die biorepulsive Hydrogel-Nanomembran soll analog zu dem Aufbau kontinuierlicher Hydrogel-Nanomembranen (siehe Kapitel 3.2.) durch die Quervernetzung einer PG-Schicht hergestellt werden. Um die biorepulsiven Eigenschaften des PG zu erhalten, sollte der verwendete Quervernetzer idealerweise selbst ebenfalls ein Hydrogel ausbilden und ebenfalls biorepulsive Eigenschaften aufweisen.

3.3.1. Herstellung und Charakterisierung selbst-perforierender Hydrogel-Nanomembranen

Die Herstellung der SPHyNs ist in Abbildung 31 dargestellt. Zur Herstellung von Nanomembranen sollte ein PG-Film chemisch quervernetzt werden. Analog zu der Quervernetzung mit EGDGE (siehe Kapitel 3.2.) wurde eine wenige Nanometer dicke Schicht von Polyglycerol durch Abscheidung eines Disulfid-funktionalisierten Polyglycerol-Derivates auf einer Goldoberfläche hergestellt. Die Quervernetzung der PG-Schicht erfolgte mit reaktiven Tetraethylglykol-Derivaten, welche im Gegensatz zu EGDGE nicht zu einem Schichtaufbau durch Polymerisation führen können.

Zunächst wurden Derivate von Tetraethylglykol (TEG) mit unterschiedlich reaktiven Abgangsgruppen (Chlorid (Cl₂-TEG), Bromid (Br₂-TEG), Iodid (I₂-TEG), Tosylat (Ts₂-TEG), Mesylat (Mes₂-TEG)) synthetisiert und hinsichtlich ihrer Eignung zur Quervernetzung des PG untersucht.¹¹⁸

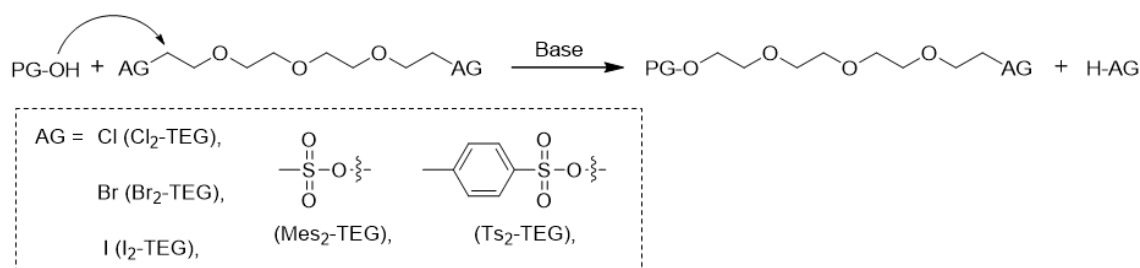


Abbildung 30: Reaktion einer Hydroxygruppe der PG-Schicht mit einem reaktiven Tetraethylglykol-Derivat unter basischen Bedingungen. Die Abgangsgruppe (AG) ermöglicht einen nukleophilen Angriff durch die Hydroxygruppen des PG, wodurch Tetraethylglykol in die PG-Schicht eingebaut und diese hierdurch vernetzt werden kann. Fünf verschiedene Derivate (Cl₂-TEG, Br₂-TEG, I₂-TEG, Ts₂-TEG, Mes₂-TEG) wurden im Hinblick auf die Quervernetzung der PG-Schicht untersucht.

Die Abgangsgruppen ermöglichen einen nukleophilen Angriff durch die Hydroxygruppen des PG, wodurch Tetraethylglykol in die PG-Schicht eingebaut und diese hierdurch quervernetzt wird (siehe Abbildung 30).

Die PG-Schichten wurden zur Quervernetzung in 10 mM Lösungen des jeweiligen Quervernetzers in absolutem DMF gelegt, denen entweder ein Überschuss der Hilfsbase

Triethylamin (≈ 40 mMol) oder Pyridin (≈ 60 mMol) zugesetzt wurde. In der jeweiligen Lösung wurden die SAMs zur Reaktion bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (17 h), $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (17 h) oder $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 h) inkubiert.

Ohne die Zugabe einer Hilfbase wurde eine vollständige Entfernung der SAM von der Goldoberfläche beobachtet. Außerdem zeigte sich, dass es bei der Verwendung von Triethylamin zu einem stärkeren Schichtabbau verglichen mit Pyridin kommt. Bei höheren Temperaturen wurde ebenfalls ein stärkerer Abbau der Schicht festgestellt, weswegen die Quervernetzung bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 17 h durchgeführt werden sollte. Bei der Behandlung der PG-Schichten mit den verschiedenen Quervernetzern wurde allgemein eine Abnahme der Schichtdicke beobachtet. Der größte Abbau der Schicht wurde für die Halogenide $\text{Cl}_2\text{-TEG}$ und $\text{I}_2\text{-TEG}$ festgestellt, weswegen sich diese nicht zur Quervernetzung eignen. Die Verwendung von $\text{Ts}_2\text{-TEG}$ führte zur Bildung eines unlöslichen Salzes auf der Oberfläche, welches nicht mehr entfernt werden konnte, weswegen dieser Ansatz ebenfalls nicht weiter verfolgt wurde. Es gelang, die Schichtdickenabnahme für die Kombination aus $\text{Me}_2\text{-TEG}$ und Pyridin als Hilfbase bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 17 h auf ein Minimum von 1.5 ± 0.5 nm zu reduzieren. Somit wurde diese Kombination für die Herstellung der Membranen verwendet. Im Anschluss an die Quervernetzung wurden die Schichten entweder auf ein kontinuierliches Substrat (Siliziumwafer) oder ein TEM-Netz mit Kohlenstofflochfilm mithilfe einer etablierten Methode¹¹⁹ transferiert.

Für den Transfer der Membranen wurde eine Schutzschicht aus Polymethylmethacrylat (PMMA) aufgebracht. Diese stabilisiert die nur wenige Nanometer dicke Schicht während des Transferprozesses. Nach dem Aufbringen der Schutzschicht wurden die Substrate wenn nötig in kleinere Stücke gebrochen. Zur Abscheidung wurden Siliziumsubstrate ohne Haftvermittler mit Gold beschichtet. Dies ermöglicht, anschließend die Goldoberfläche von dem Substrat mit abzuheben. Mit einer Iod-Ätzlösung wurde die Goldschicht entfernt und die Membran nach weiteren Waschschritten auf das Zielsubstrat übertragen. Abschließend wurde das PMMA durch Einlegen in Aceton entfernt. Wenn die Membranen auf TEM-Netze transferiert wurden, erfolgte die abschließende Entfernung des Lösungsmittels möglichst schonend mittels überkritischer Trocknung (Kritisch-Punkt Trocknung, KPT). Ein einfaches Verdampfen des Acetons an Luft führte dazu, dass keine freistehenden Membranen erhalten werden konnten.

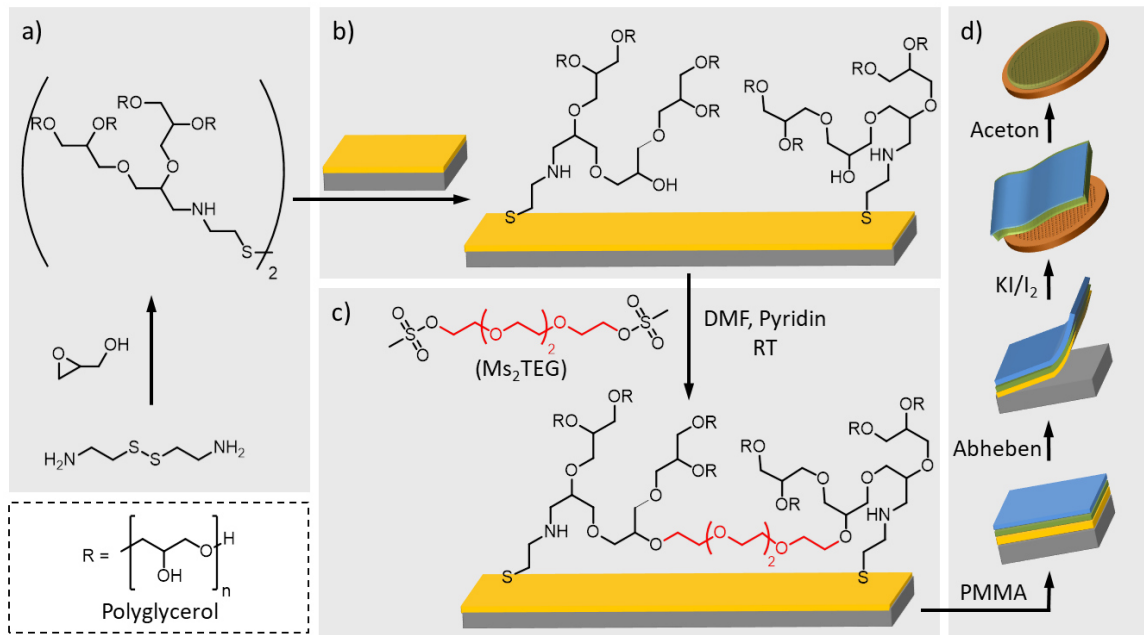


Abbildung 31: Herstellung der selbst-perforierenden Hydrogel-Nanomembranen: a) Synthese des Disulfid-funktionalisierten Polyglycerolderivates. b) Abscheidung auf einer Goldoberfläche. c) Quervernetzung mit Mes_2TEG . d) Transfer der Membran auf ein TEM-Netz.³⁵

Es wurden verschiedene Konzentrationen von Mes_2TEG in einem Bereich von 3 bis 100 mM verwendet und der Einfluss auf das Verhalten der erhaltenen Membranen untersucht. Es zeigte sich, dass der Transfer auf Siliziumwafer unabhängig von der verwendeten Quervernetzerkonzentration kontinuierliche Membranen liefert, für die eine Schichtdicke von ungefähr 2 nm mittels AFM bestimmt wurde.

Im Gegensatz dazu konnte für Membranen, welche auf TEM-Netze transferiert wurden, ein Aufreißen der Membranen (Selbstperforation) über den Löchern des Kohlenstofflochfilms unter Ausbildung einer Netzstruktur beobachtet werden (siehe Abbildung 32). Es bildeten sich hierbei Löcher im Bereich von 50 - 500 nm aus. TEM oder REM-Aufnahmen der hergestellten Netze zeigten keine Perforation auf dem kontinuierlichen Kohlenstofffilm, was mit den Ergebnissen zum Transfer auf Siliziumsubstrate übereinstimmt.

Eine derartige Netzstruktur eignet sich, um den dünnen Wasserfilm in den Löchern des Kohlenstofflochfilms vor dem Frieren der Probe zu stabilisieren (siehe Kapitel 3.3.2). Es wurde weiterhin untersucht, inwiefern die Porosität der Membran durch die Konzentration an Quervernetzer kontrolliert werden kann.

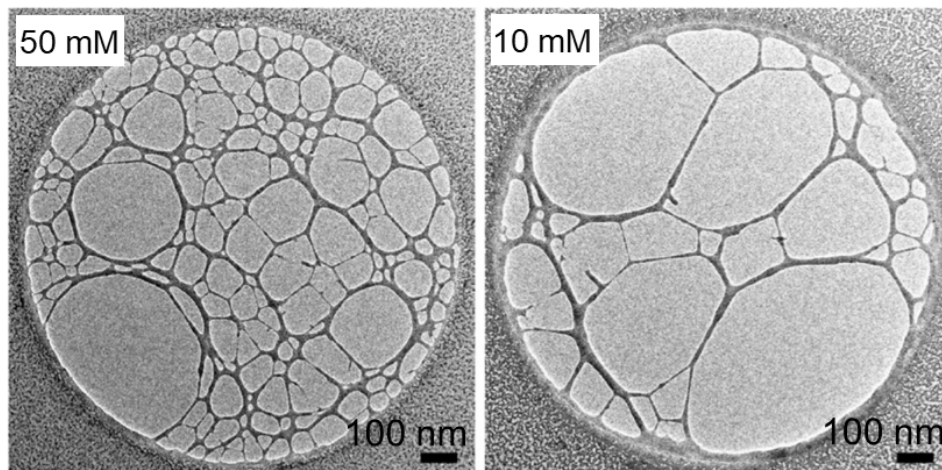


Abbildung 32: TEM-Aufnahme quervernetzter PG-Membranen nach dem Transfer auf TEM-Netze mit Kohlenstofflochfilm. Die Membranen reißen über den Löchern auf. In Abhängigkeit von der verwendeten Quervernetzerkonzentration (hier 50 und 10 mM) wird ein eng- bzw. grobmaschigeres Netz erhalten.³⁵

Um die Abhängigkeit der Porosität der Netzstruktur von der Konzentration an Mes₂TEG zu quantifizieren, wurde der von der Membran bedeckte Bereich des Loches im Kohlenstofflochfilm bestimmt (siehe Abbildung 33). Hierfür wurden mehrere Chargen von Membranen, ausgehend von der Abscheidung einer PG-Schicht und deren Quervernetzung, hergestellt und verglichen. Hierbei wurde beobachtet, dass die Löchrigkeit bei gleicher Quervernetzerkonzentration innerhalb einer Charge nur wenig variierte, es jedoch größere Unterschiede zwischen den verschiedenen Chargen gab. Dies ist wahrscheinlich auf die Kräfte zurückzuführen, welche während der KPT auf die sensiblen Membranen wirken.

Für kleine Quervernetzerkonzentrationen ist die Porosität insbesondere aufgrund der Kräfte während des KPT nur schwer zu kontrollieren, sodass Membranen mit einer Bedeckung im Bereich von etwa 15 - 50 % erhalten werden. Für eine 100 mM Mes₂TEG Konzentration können Membranen mit einer Bedeckung von etwa 73 ± 7 % erhalten werden. Somit führt eine höhere Quervernetzerkonzentration zu einer erhöhten Stabilisierung der Membran, jedoch ist dieser Effekt bei kleinen Konzentrationen (< 20 mM) nicht erkennbar, da vermutlich die Kräfte des KPT eine größere Variation hervorrufen.

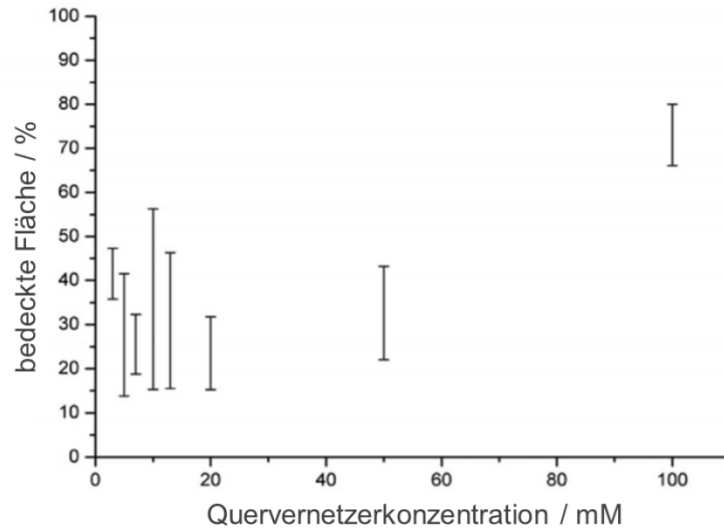


Abbildung 33: Quantitative Bestimmung der Löchrigkeit der quervernetzten PG-Membranen. Die durch die Membran bedeckte Fläche der Löcher in einem Kohlenstofflochfilm, welche bei einer bestimmten Quervernetzerkonzentration erhalten wurde, ist dargestellt.³⁵

Eine andere Möglichkeit, die Porosität anzupassen, besteht darin, die Membranen nachträglich zu verändern. Durch Plasmabehandlung ist eine gezielte Schädigung der Membran möglich, sodass das Netzwerk weiter in sich kollabiert und die Porosität nachträglich erhöht werden kann. Eine 45 Sekunden-Behandlung der Membran in einem Glimmentladungsplasma verringert die Bedeckung von $39 \pm 3 \%$ auf $10 \pm 3 \%$.

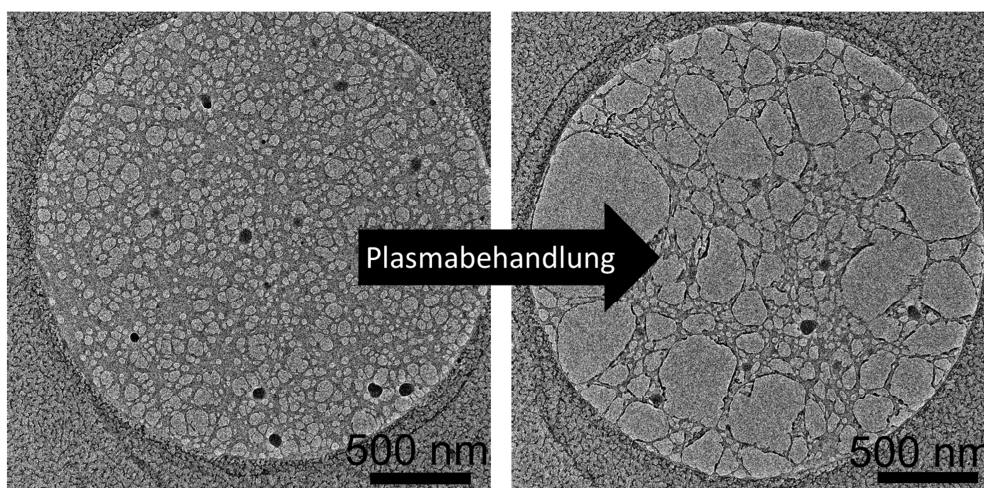


Abbildung 34: Plasmabehandlung einer SPHyN mit hoher Bedeckung: Eine 45 Sekunden-Behandlung der Membran in einem Glimmentladungsplasma reduziert die Bedeckung des Loches durch die Membran deutlich.³⁵

Die Hydrogel-Membran wurde außerdem auf einen Kohlenstofflochfilm transferiert, welcher keine regelmäßige, runde Lochstruktur, sondern eine Variation an kleinen oder großen Löchern und Ellipsen aufweist (sog. C-flat® Multihole grids). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Art der Löcher im Kohlenstofflochfilm keinen Einfluss auf die Form der entstehenden Löcher in der PG-Membran zu haben scheint (siehe Abbildung 35).

Durch die Herstellung quervernetzter Hydrogelmembranen und deren Transfer auf TEM-Netze wurden neuartige TEM Netze (SPHyNs) erhalten, deren amorpher Kohlenstofffilm durch ein biorepulsives Hydrogel abgedeckt ist und dessen Löcher durch ein feines Hydrogelnetzwerk überspannt sind. Vorteilhaft ist, dass das System auch auf andere TEM-Netze (z.B. Goldfilme¹²⁰, Graphen^{121,122} oder amorphe Metalle¹²³) transferiert werden kann und somit unabhängig vom Trägermaterial des Netzes einsetzbar ist.

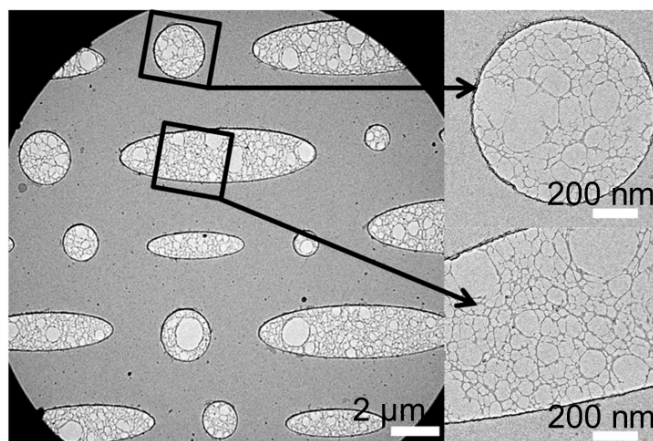


Abbildung 35: TEM-Aufnahme einer quervernetzten PG-Membran auf einem C-flat® Multihole Netz. Hier zeigt sich, dass die Form der Löcher der Hydrogel-Membran unabhängig von der Form der Löcher im Kohlenstofflochfilm ist.³⁵

3.3.2. Untersuchungen der Proteinverteilung mittels Kryo-TEM

Die mit einem Hydrogel bedeckten TEM-Netze wurden im Hinblick auf die Verbesserung der Probenpräparation von Membranproteinen untersucht. Es wurden hierfür zwei Proteine ausgewählt, von welchen bekannt ist, dass die Probenpräparation problematisch ist und nicht ausreichend Partikel im amorphen Eisfilm erhalten werden.

Es handelt es sich um das *Polytomella* ATP Synthase Dimer¹²⁴ und den Komplex I¹²⁵ aus *Yarrowia lipolytica*.

Es zeigte sich, dass Proben des Komplexes I mehr als 60 gleichmäßig verteilte Partikel pro Bild enthielten, welche für die Bestimmung der Struktur verwendet werden konnten. Es konnten durch die Verwendung von SPHyNs insgesamt 7138 Partikel auf 123 Aufnahmen ausgewertet werden, um die Struktur des Proteins mit einer Auflösung von 8.1 Å zu berechnen. Zuvor war es deutlich schwerer, Proben des Proteins für eine Strukturbestimmung zu präparieren. Die gute Auflösung der Struktur zeigt die Sekundärstrukturelemente, sowie die Eisen-Schwefel-Cluster des Proteins (siehe Abbildung 36).

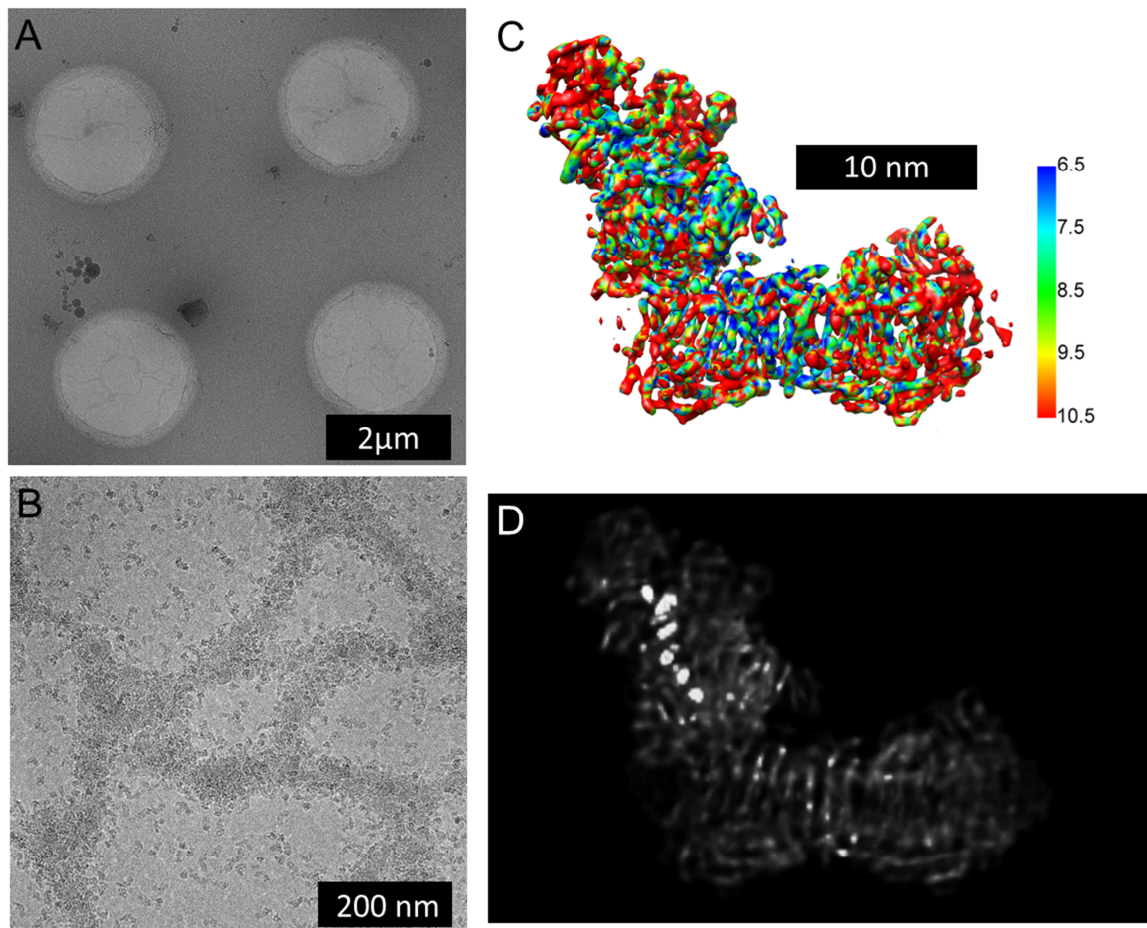


Abbildung 36: Strukturbestimmung des Komplexes I aus *Yarrowia lipolytica*: Kryo-TEM-Aufnahme der gefrorenen Proteinprobe (A). Hochauflösende TEM-Aufnahme der gefrorenen Proteinprobe (B). Struktur des Komplexes I mit einer Auflösung von 8.1 Å. Die lokale Auflösung ist durch den Farbcode gegeben. Die Skala ist in Ångström angegeben. (C) Darstellung der Dichteverteilung, welche die Eisen-Schwefelcluster des Proteins erkennen lässt (D).³⁵

Die Präparation von Kryo-Proben des ATP-Synthase Dimers verlief ebenfalls erfolgreich. Für die Strukturbestimmung wurden insgesamt 23200 Proteinpartikel von 2096 Bildern verwendet, um die Struktur mit einer Auflösung von 6.4 Å zu berechnen. Die Struktur des ATP-Synthase Dimers konnte sehr gut aufgelöst werden, sodass Elemente wie die C₁₀-Ringe der Rotoren gut erkennbar sind (siehe Abbildung 37).

Die Struktur des ATP-Synthase Dimers wurde bereits 2016 mit einer Auflösung von 6.2 Å bestimmt. Bemerkenswert ist, dass hierfür 37238 Partikel ausgewertet wurden. Die Verwendung der SPHyNs führte dazu, dass 14000 Partikel weniger (-38 %) benötigt wurden, um eine Struktur mit nahezu gleicher Auflösung zu erhalten.

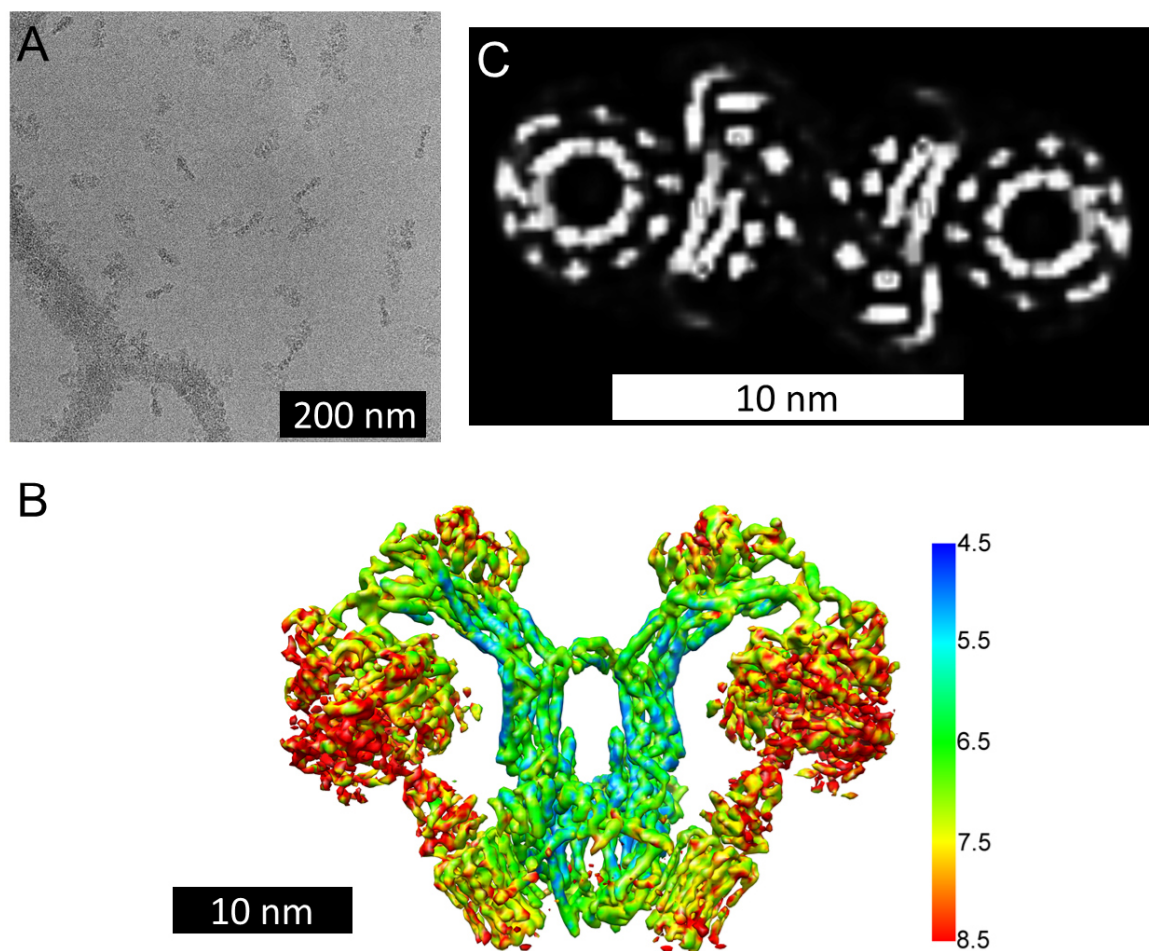


Abbildung 37: Strukturbestimmung des *Polytomella* ATP Synthase Dimers: Hochauflösende TEM-Aufnahme der gefrorenen Proteinprobe (A). Struktur der ATP-Synthase mit einer Auflösung von 6.4 Å. Die lokale Auflösung ist durch den Farbcode gegeben. Die Skala ist in Ångström angegeben (B). Horizontaler Schnitt durch den F₀-Teil der ATP-Synthase, wodurch die C₁₀-Ringe der Rotoren gut zu erkennen sind (C).³⁵

Dies kann durch die Stabilisierung des Wasserfilms durch die feinen Hydrogelfasern erklärt werden. Für die Berechnung der Struktur war es möglich, die Partikel aus Regionen in der Mitte der Löcher zu verwenden. Dort ist der amorphe Eisfilm dünner, wodurch Aufnahmen der Partikel mit einem geringeren Hintergrund erhalten wurden. Die frühere Struktur wurde von Partikeln bestimmt, welche sich in der Nähe des Kohlenstofflochfilms befanden. Dort ist das Eis deutlich dicker, wodurch der Kontrast der Aufnahmen herabgesetzt wird.

Um zu testen, ob die Unregelmäßigkeit der Löcher des Hydrogelnetzwerkes für die homogene Proteinverteilung verantwortlich ist, oder dessen chemische Zusammensetzung, wurden Kryo-Proben mit dem Komplex I und einem speziellen Trägermaterial gefroren, das eine ähnliche Struktur wie die SPHyNs aufweist. Das Trägermaterial bestand aus einem Kohlenstofffilm, welcher ebenfalls unregelmäßige Löcher aufweist (sog. *lacey carbon*). Auch für Proben, die mit dem *lacey carbon* gefroren wurden, zeigte sich die Akkumulation der Proteine an den Kohlenstofffilm (siehe Abbildung 38). Es scheint die biorepulsive Funktionalisierung des Kohlenstofffilms für die gleichmäßige Verteilung des Proteins in den Löchern verantwortlich zu sein.

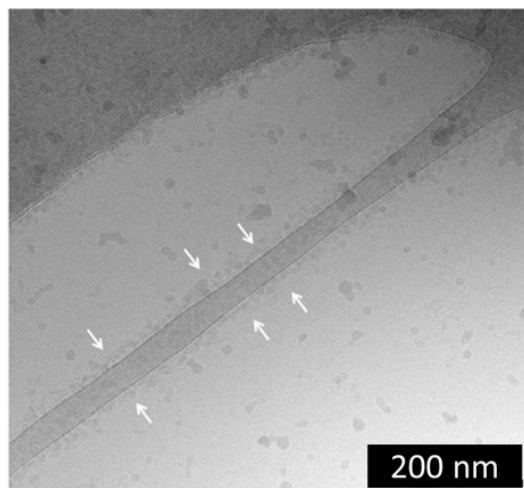


Abbildung 38: Kryo-TEM-Aufnahme von Komplex I aus *Yarrowia lipolytica*, welche mit einem *lacey carbon* Trägerfilm hergestellt wurde. Die Partikel akkumulieren sich in der Nähe des amorphon Kohlenstofffilms oder adsorbieren daran.

3.3.3. Schlussfolgerungen

Mit einer Disulfid-Einheit funktionalisierte Polyglycerol-Derivate, welche als Monolage auf einer Goldoberfläche abgeschieden wurden, können mit reaktiven TEG-Derivaten quervernetzt werden. Die Untersuchung verschiedener TEG-Derivate zeigte, dass sich Mes₂TEG mit Pyridin als Hilfsbase in absolutem DMF bei Raumtemperatur am besten zur Quervernetzung eignet. Die vernetzten Schichten können auf unterschiedlichste Substrate transferiert werden. Durch den Transfer der Membranen auf TEM-Netze mit Kohlenstofflochfilm können SPHyNs hergestellt werden. Die transferierte Membran deckt den amorphen Kohlenstoff mit einer etwa 2 nm dicken, kontinuierlichen, biorepulsiven Hydrogel-Schicht ab. Über den Löchern dagegen reißt die Membran unter Ausbildung einer freistehenden Netzstruktur auf (Selbstperforation). Die Quervernetzerkonzentration und der Transferprozess beeinflussen dabei die Porosität der Netzstruktur. Ein nachträgliches Erhöhen der Porosität ist durch Behandlung der Membranen im Glimmentladungsplasma möglich.

SPHyNs erleichtern die Präparation von Proben für die Kryo-TEM, wie anhand zweier Membranproteine, deren Präparation zuvor nicht oder nur mit großem Aufwand möglich war, gezeigt werden konnte. Durch die Abdeckung des amorphen Kohlenstofffilms mit einem kontinuierlichen, biorepulsiven Hydrogel wird die Adsorption hydrophober Proteine an dem Kohlenstoff unterdrückt. Gleichzeitig stabilisieren die feinen Hydrogelfasern der Netzstruktur den Wasserfilm in den Löchern des Kohlenstofflochfilms. Beides führt zu einer für die Mikroskopie optimalen Verteilung der Proteine in der Probe.

Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieses Projekts wurden veröffentlicht. Weitere Informationen und experimentelle Details können der Veröffentlichung bzw. der zugehörigen *supporting information* entnommen werden:

Self-Perforated Hydrogel Nanomembranes Facilitate Structural Analysis of Proteins by Electron Cryo-Microscopy

Julian Scherr, Kristian Parey, Niklas Klusch, Bonnie J. Murphy, Sebastian Balsler, Alexander Neuhaus, Volker Zickermann, Werner Kühlbrandt, Andreas Terfort, and Daniel Rhinow

ACS Nano **2017**, 11, 6467-6473

DOI: 10.1021/acsnano.7b03099

Reprinted/adapted with permission from

Self-Perforated Hydrogel Nanomembranes Facilitate Structural Analysis of Proteins by Electron Cryo-Microscopy

Julian Scherr, Kristian Parey, Niklas Klusch, Bonnie J. Murphy, Sebastian Balsler, Alexander Neuhaus, Volker Zickermann, Werner Kühlbrandt, Andreas Terfort, and Daniel Rhinow

ACS Nano **2017** 11 (6), 6467-6473

DOI: 10.1021/acsnano.7b03099

Copyright 2017 American Chemical Society.

3.4. Nicht-kovalente Funktionalisierung amorpher Kohlenstofffilme

Die Untersuchungen zu biorepulsiven SPHyNs³⁵ und zu der Beschichtung von Kohlenstofffilmen mit einem Goldfilm und einer biorepulsiven SAM¹⁰⁸ haben gezeigt, dass die biorepulsive Funktionalisierung des Kohlenstofffilms auf dem TEM-Netz entscheidend für eine gute Proteinverteilung ist. Es wäre es vorteilhaft, amorphe Kohlenstofffilme direkt durch Aufbringen eines Moleküls biorepulsiv funktionalisieren zu können.

In diesem Projekt sollte eine einfache Möglichkeit zur biorepulsiven Funktionalisierung amorpher Kohlenstoffsichten entwickelt werden. Als biorepulsives Material sollte PG, welches sich bereits in anderen Projekten bewährt hatte, verwendet werden. Es ist bekannt, dass Amphiphile, bestehend aus einem Hydrogel und einer aromatischen oder aliphatischen Einheit, an sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffoberflächen wie Kohlenstoffnanoröhren oder Graphen adsorbieren.¹²⁶⁻¹³¹ In einer vorangegangenen Arbeit wurden verschiedene PG-Pyren-Derivate zur Funktionalisierung von hochorientiertem pyrolytischem Graphit (engl. *highly oriented pyrolytic graphite*, HOPG) verwendet.¹³² Auch im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst untersucht werden, inwiefern dieses Konzept zur Funktionalisierung von amorphem Kohlenstoffs genutzt werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten PG-Pyren-Derivate ausreichend stark mit amorphen Kohlenstofffilmen wechselwirken, um stabile Oberflächenbeschichtungen zu erhalten. Derartig funktionalisierte Kohlenstofffilme eignen sich für die Probenpräparation von hydrophoben Membranproteinen. Die Funktionalisierung führt zu einer Erhöhung der Dichte an Proteinmolekülen, welche in den Löchern des Kohlenstofffilms gefroren werden.

Weiterhin sollten die mit PG-Pyren-Derivaten funktionalisierten Kohlenstofffilme durch ein weiteres System, welches zwei Vorteile bietet, erweitert werden. Zum einen sollte die Elektronenstrahl-induzierte Bewegung von Partikeln im Eis während des TEM-Experimentes, welche zu einer Unschärfe der Partikel auf den Aufnahmen führt, reduziert werden. Zum anderen sollte der amorphe Eisfilm in den Löchern des Kohlenstofflochfilms stabilisiert werden.

Es ist bekannt, dass ein biorepulsives Netzwerk, welches die Löcher des Kohlenstofffilms überspannt, zur Stabilisierung des amorphen Eisfilms verwendet werden kann.³⁵

Außerdem wurde gezeigt, dass die Elektronenstrahl-induzierte Bewegung durch die Verwendung eines leitfähigen Materials reduziert werden kann.¹²⁰ Einwandige Kohlenstoffnanoröhren (*single-walled carbon nanotubes*, SWCNTs) sind leitfähige Röhren aus Kohlenstoffatomen, welche sich zum Abführen von Ladungen eignen.^{133–136} Außerdem lassen sich SWCNTs durch das bereits zur Funktionalisierung des amorphen Kohlenstofffilms verwendete PG-Pyren-Derivat funktionalisieren.^{126–131}

Es gelang durch den Transfer auf Kohlenstofflochfilme von mit PG-Pyren-Derivaten funktionalisierten SWCNT-Netzwerken, welche die Löcher des Kohlenstofffilms überspannen, ein biorepulsives, leitfähiges Netzwerk zu realisieren. Hierdurch wurden TEM-Netze mit einem Hydrogel-funktionalisierten Netzwerk aus Kohlenstoffnanoröhren (*hydrogel-functionalized carbon nanotube network*, HyCaNet) hergestellt, welche den Wasserfilm in den Löchern des Kohlenstofflochfilms stabilisieren, die Dichte von Partikeln im amorphen Eis erhöhen und gleichzeitig die Elektronenstrahl-induzierte Bewegung dieser Partikel reduzieren.

3.4.1. Synthese Pyren-haltiger Polyglycerolderivate

Pyren-haltige PG-Derivate haben sich bereits zur biorepulsiven Funktionalisierung von Kohlenstoffoberflächen bewährt. In diesem Projekt sollten zwei Moleküle untersucht werden, welche beide eine Pyren-Einheit als Basis enthalten, sich jedoch in der Anzahl der PG-Einheiten unterscheiden. Über die Pyren-Basis soll später eine Bindung der Moleküle an die Kohlenstoffoberfläche erfolgen. Explizit soll 1-(Polyglyceroloxo)pyren (**1**), welches eine PG Einheit besitzt, und 1,6-Bis(polyglyceroloxo)pyren (**2**) mit zwei PG-Einheiten hergestellt werden. Die beiden PG-Derivate sollen in einer Polymerisationsreaktion von Glycidol mit den Polymerisationsinitiatoren 1-Hydroxypyren (**3**) und 1,6-Dihydroxypyren (**4**) gewonnen werden (siehe Abbildung 39).

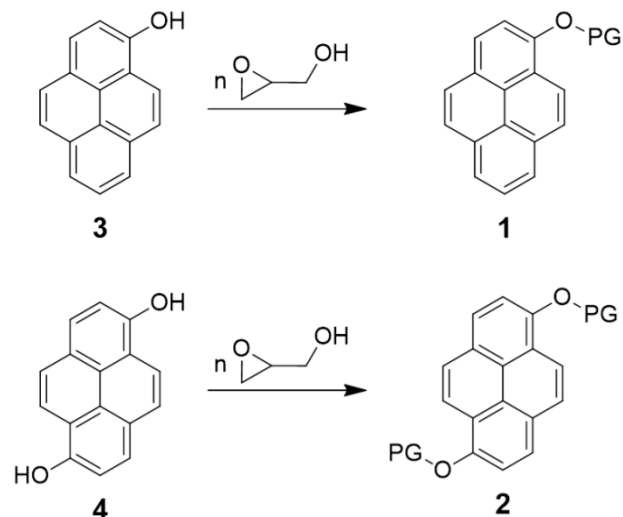


Abbildung 39: Synthese der Pyren-haltigen Polyglycerolderivate **1** und **2**: Die Polymere sollen durch die Polymerisation von Glycidol, mit entweder **3** oder **4** als Initiator, erhalten werden.

Zur Synthese der Initiatoren wurde zunächst nach Literaturvorschrift¹³⁷ Pyren (**5**) bromiert und im Anschluss das Brom-Atom des 1-Brompyrens (**6**) durch eine Bpin (4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolanyl)-Gruppe substituiert¹³⁸ und 1-Bpin-pyren (**7**) erhalten. Als nächstes wurde die Bpin-Gruppe oxidativ in eine Hydroxygruppe umgewandelt,¹³⁹ wodurch der Polymerisationsinitiator **3** erhalten wurde (siehe Abbildung 40).

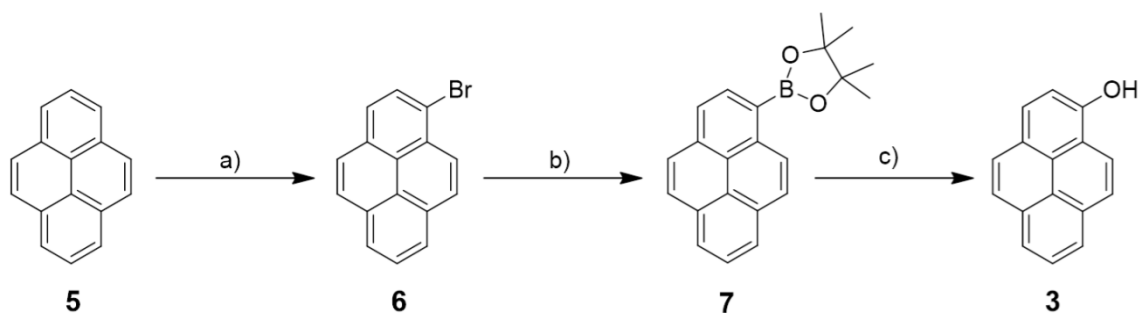


Abbildung 40: Synthese des Polymerisationsinitiators 1-Hydroxypyren (**3**): a) *N*-Bromsuccinimid, Chloroform, RT; b) 1. *n*-BuLi, Tetrahydrofuran, -78 °C; 2. 2-Isopropoxy-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan, -78 °C; c) H₂O₂/NaOH, Tetrahydrofuran/Wasser, RT.

Das Polymer **1** konnte direkt aus dem Initiator **3** durch Deprotonierung mit Natriummethanolat und anschließender Umsetzung mit Glycidol erhalten werden.

Aus Verbindung **3** kann der bifunktionale Polymerisationsinitiator 1,6-Dihydroxypyren gewonnen werden. Mithilfe einer Literatur-bekannt¹⁴⁰ Oxidationsreaktion unter Verwendung des Oxidationsmittels Oxone wurde **3** zum 1,6-Diketopyren (**8**) umgesetzt. Hier wird eine Mischung aus 1,6- und 1,8-Diketopyren erhalten, welche säulenchromatographisch getrennt wurde.

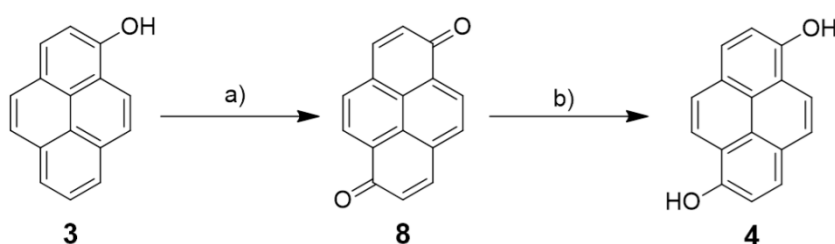


Abbildung 41: Synthese des Polymerisationsinitiators **4**: a) Oxone®, Acetonitril/Wasser, RT; b) Belichtung (440-450 nm), Isopropanol, RT.

Verbindung **8** kann durch eine lichtinduzierte Reduktion mit Isopropanol zu 1,6-Dihydroxypyren umgesetzt werden. Die Vollständigkeit der Reduktion von Verbindung **8** zu Verbindung **4** wurde mittels NMR überprüft. Nach Entfernen des Lösungsmittels konnte das erhaltene 1,6-Dihydroxypyren mit Natriummethanolat deprotoniert und anschließend mit Glycidol umgesetzt werden.¹⁴¹ Da 1,6-Dihydroxypyren (**4**) sehr oxidationsempfindlich ist, wurde das Molekül erst kurz vor der Verwendung aus der stabilen Verbindung **8** synthetisiert und direkt weiter umgesetzt.

Die Polyglycerolderivate wurden mittels Dialyse von kleineren Molekülen und Oligomeren gereinigt. Die mittlere Molekülmasse der Polymere wurde mittels Kryoskopie bestimmt und ergab für Polymer **1** 4300 g/mol und Polymer **2** 7100 g/mol.

Im Folgenden werden der Übersichtlichkeit halber die Polymere **1** und **2** als PG-O-Pyren und (PG-O)₂-Pyren bezeichnet.

3.4.2. Funktionalisierung und Charakterisierung amorpher Kohlenstofffilme mit Polyglycerol

Um die Schichtbildungseigenschaften von PG-O-Pyren und (PG-O)₂-Pyren auf amorphem Kohlenstoff zu untersuchen, wurden Goldoberflächen mit einer etwa 10 nm dicken Schicht aus amorphem Kohlenstoff mittels Kohlefadenbedampfung beschichtet.¹⁴² Die Kohlenstoffoberfläche wurde anschließend in eine 0.1%ige wässrige Lösung des jeweiligen Polymers eingelegt und nach dem Herausnehmen mit Wasser gespült.

Ellipsometrisch konnte nach dem Einlegen in die Polymerlösung eine Schichtdickenzunahme von 1.1 ± 0.1 nm für PG-O-Pyren und 6.7 ± 0.2 nm für (PG-O)₂-Pyren gemessen werden. Intensives Spülen der Oberflächen mit Wasser führte zu keiner signifikanten Änderung der Schichtdicke, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass die Beschichtung fest an der Kohlenstoffschicht haftet. Um die abgeschiedene Schicht weiter zu charakterisieren, wurden IRRA-Spektren aufgenommen. Der Vergleich des IRRA-Spektrums mit einem IR-Spektrum von PG zeigt die für das Polymer charakteristischen Banden (siehe Abbildung 42), welche auch in dem Spektrum der quervernetzten PG-Schichten auftraten (Kapitel 3.2.).

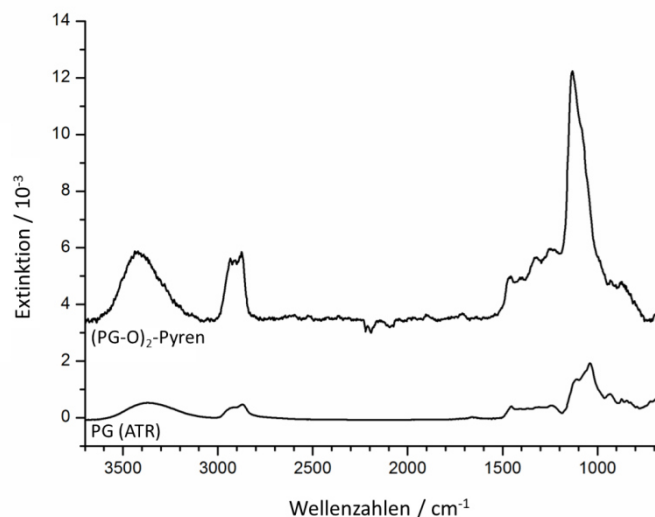


Abbildung 42: IRRA-Spektrum von (PG-O)₂-Pyren adsorbiert auf amorphem Kohlenstoff und ein ATR-IR Spektrum von PG (um den Faktor 200 skaliert). Der Vergleich beider Spektren zeigt, dass eine Schicht PG auf dem amorphem Kohlenstoff adsorbiert ist.¹⁴³

Besonders ausgeprägt ist die breite Bande im Bereich von 3200 bis 3600 cm^{-1} , die der Streckschwingung der Hydroxygruppen zugeordnet werden kann, die symmetrische und asymmetrische Methylen-Streckschwingung (2920 und 2880 cm^{-1}) und die symmetrische und asymmetrische Ether-Streckschwingung (900 und 1180 cm^{-1}).

Eine Oxidation des PG-Polymers wird hier allerdings nicht beobachtet, was auf den Ausschluss von Sauerstoff während der Synthese von (PG-O)₂-Pyren zurückzuführen ist. Anschließend wurden im Gegensatz zu der Quervernetzung von PG-Schichten auf Oberflächen (Kapitel 3.2 und 3.3) keine weiteren Reaktionen durchgeführt, welche zu einer Oxidation führen können.

Die unterschiedlichen ellipsometrischen Schichtdicken lassen darauf schließen, dass eine unterschiedliche Bedeckung der Oberfläche vorliegt. Dies sollte sich ebenfalls auf die Eigenschaften der Oberfläche auswirken. Um die biorepulsiven Eigenschaften der Oberflächenbeschichtung zu testen, wurden Biorepulsivitätstests durchgeführt. Die Oberflächen wurden hierfür einer gepufferten Lösung von Bovinem Serumalbumin (BSA) exponiert und die Schichtdickenzunahme durch unspezifische Adsorption des Proteins bestimmt. Für die mit PG-O-Pyren beschichtete Oberfläche konnte eine Schichtdickenzunahme von 0.7 ± 0.1 nm beobachtet werden, wohingegen die mit (PG-O)₂-Pyren beschichtete Oberfläche nur einen Zuwachs von 0.06 ± 0.06 nm aufwies. Somit ist der mit (PG-O)₂-Pyren funktionalisierte Kohlenstofffilm nahezu vollständig biorepulsiv. Die Beschichtung mit PG-O-Pyren dagegen kann nur als teilweise biorepulsiv bezeichnet werden. Der Unterschied kann mit der Schichtdicke des Polymers auf dem Kohlenstofffilm erklärt werden. PG-O-Pyren bildet deutlich dünnere Schichten aus, weswegen vermutlich freie Stellen auf der Oberfläche verbleiben, an die das Protein adsorbieren kann (siehe Abbildung 43, roter Pfeil).

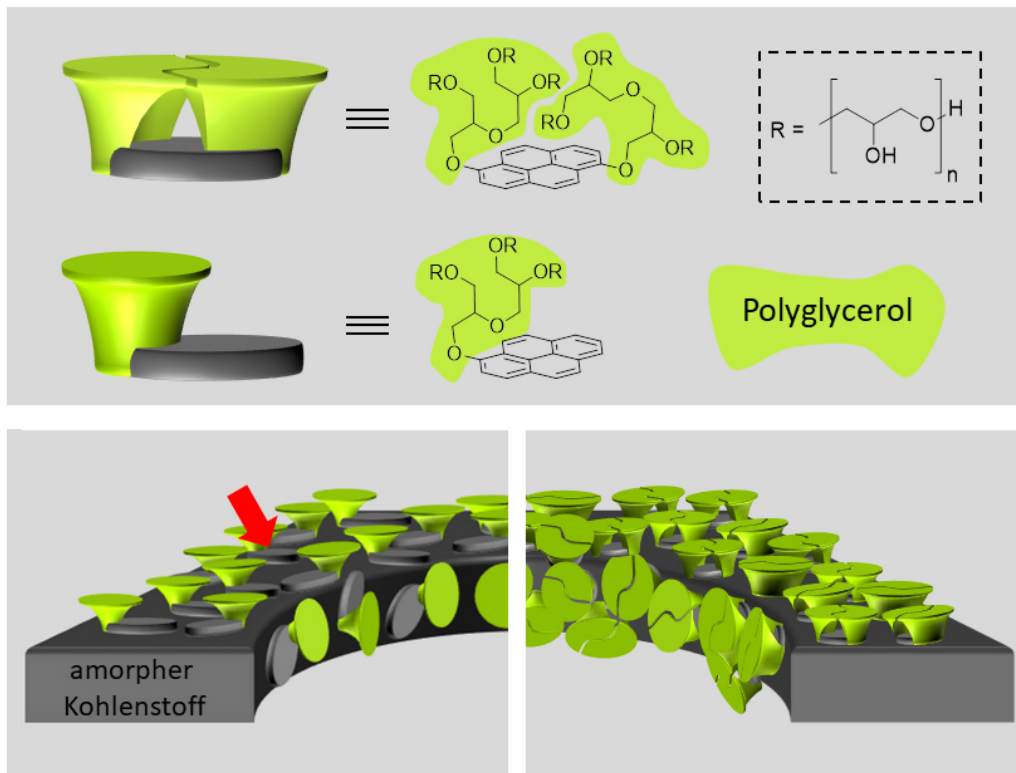


Abbildung 43: Pyren-haltige PG-Derivate zur Funktionalisierung amorpher Kohlenstofffilme: Die PG-Pyren-derivate binden über die Pyren-Einheit an die Kohlenstoffoberfläche. Die resultierende Oberflächendichte an PG ist jedoch für die beiden Verbindungen unterschiedlich. Bei der mit PG-O-Pyren beschichteten Oberfläche sind vermutlich noch Lücken (roter Pfeil) in der PG-Schicht, wodurch die Biorepulsivität vermindert ist.¹⁴³

3.4.3. Untersuchungen der Proteinverteilung mittels Kryo-TEM

Zur Untersuchung der Verteilung der Membranproteine in der amorphen Eisschicht mit den biorepulsiv funktionalisierten amorphen Kohlenstofffilmen wurden Proben mit dem Komplex I¹²⁵ aus *Yarrowia lipolytica* hergestellt. Es wurden sowohl mit PG-O-Pyren als auch mit (PG-O)₂-Pyren beschichtete TEM-Netze sowie ein amorpher Kohlenstofffilm, welcher mittels Glimmentladungsplasma hydrophilisiert wurde, betrachtet. Die TEM-Aufnahmen der verschiedenen funktionalisierten Kohlenstofffilme mit dem Protein sind in Abbildung 44 gezeigt.

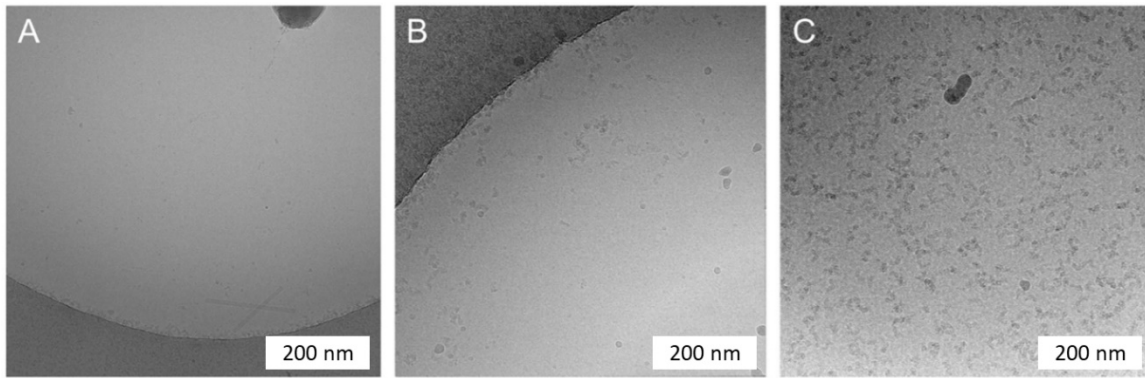


Abbildung 44: Kryo-TEM Aufnahmen des Komplexes I, präpariert auf TEM-Netzen, deren Kohlenstofffilm auf verschiedene Arten funktionalisiert wurde: Die Kohlenstofffilme wurden mit PG-O-Pyren (B), (PG-O)₂-Pyren (C) oder im Glimmentladungsplasma (A) behandelt. Die Veränderung des Kohlenstofffilms im Glimmentladungsplasma führt jedoch zu keinen Partikeln des Komplexes I im amorphen Eisfilm des Kohlenstofflochfilms. Dahingegen sind bei PG-O-Pyren-beschichteten Proben (B) einige Partikel in den Löchern des amorphen Eisfilms zu erkennen. Die Verwendung von (PG-O)₂-Pyren (C) führt zu vielen, deutlich erkennbaren Partikeln.¹⁴³

Wie zu erwarten, weist die Probe, bei der der amorphe Kohlenstofffilm nur mittels Glimmentladungsplasma behandelt wurde, keine Partikel in der amorphen Eisschicht auf. Dies zeigt erneut, wie problematisch die Probenpräparation dieses Proteins ist. Eine reine Hydrophilisierung des Kohlenstoffs ist nicht ausreichend, um eine Verteilung der Partikel in den Löchern zu erhalten. Im Gegensatz hierzu sind bei der Probe, welche mit PG-O-Pyren behandelt wurde, einige Partikel zu erkennen. Die durchschnittliche Anzahl der für eine Strukturberechnung verwendbaren Partikel beträgt 14.5 Partikel pro Aufnahme (61 Aufnahmen mit einer Größe von 679 nm x 679 nm wurden ausgewertet). Deutlich mehr Partikel sind jedoch bei der Probe, welche mit (PG-O)₂-Pyren funktionalisiert wurde zu erkennen. Hier sind durchschnittlich 31.2 Partikel pro Bild verwendbar (42 Aufnahmen mit einer Größe von 679 nm x 679 nm wurden ausgewertet). Hiermit bestätigen die TEM-Experimente die zuvor mittels Ellipsometrie erhaltenen Ergebnisse zur Biorepulsivität der Beschichtungen. (PG-O)₂-Pyren führt zu einer deutlich besseren biorepulsiven Funktionalisierung der Kohlenstoffoberfläche.

Die beiden Beschichtungen mit den PG-Derivaten eröffnen aufgrund ihrer unterschiedlichen Biorepulsivität die Möglichkeit, die Dichte der Partikel im Eis zu kontrollieren. Beispielsweise ist es denkbar, Mischungen der beiden Verbindungen herzustellen und hierdurch die Biorepulsivität der Kohlenstoffschicht auf dem TEM-Netz einzustellen. Dies ist von Interesse, wenn das Verdünnen oder Konzentrieren der Probe nicht möglich ist.

3.4.4. Herstellung eines Hydrogel-funktionalisierten Netzwerkes aus einwandigen Kohlenstoffnanoröhren

Die Elektronenstrahl-induzierte Bewegung von Partikeln im Eis während des TEM-Experimentes führt zu einer Unschärfe der Partikel auf den Aufnahmen. Dies kann teilweise computerunterstützt korrigiert werden,¹⁴⁴ jedoch ist es sinnvoll, die Bewegung durch die Verwendung leitfähiger Substrate von vornherein zu minimieren.¹²⁰ SWCNTs sind Röhren aus sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen und weisen eine hohe Leitfähigkeit auf.^{133–136} Aus diesem Grund sollte untersucht werden, inwiefern ein Netzwerk aus biorepulsiv funktionalisierten SWCNTs verwendet werden kann, um die Aufladungseffekte während des TEM-Experiments zu reduzieren. Insbesondere die biorepulsive Beschichtung der Kohlenstoffnanoröhren könnte die Leitfähigkeit reduzieren oder isolierend wirken. Allerdings kann durch das biorepulsive Netzwerk aus SWCNTs eine Stabilisierung des Wasserfilms während der Probenpräparation vergleichbar zu den Ergebnissen mit SPHyNs erwartet werden (siehe Kapitel 3.3.).

Generell müssen SWCNTs mit Detergenzien in Lösung stabilisiert (solubilisiert) werden, da die hydrophoben Kohlenstoffnanoröhren ansonsten keine stabile Suspension bilden, sondern in dem wässrigen Medium aggregieren. Eine Vielzahl von Amphiphilen wurde in der Literatur für die Solubilisierung von Kohlenstoffnanoröhren untersucht. Unter anderem wurden auch Amphiphile aus einem Hydrogelbildner (PG oder PEG) und einer aromatischen bzw. aliphatischen Einheit (oder beidem) erforscht.^{126–130} Als aromatische Einheit haben ebenfalls Pyren-haltige Derivate Anwendung gefunden.^{126,128–130,145} Der hydrophobe Teil der Moleküle lagert sich an die Kohlenstoffnanoröhren an, sodass der polare Teil in die Lösung ragt und die Oberfläche hierdurch hydrophil erscheint.

Zum Aufbau des Netzwerkes muss eine Methode gefunden werden, um die SWCNTs zu solubilisieren und biorepulsiv zu funktionalisieren. Es ist naheliegend, die für die Funktionalisierung amorpher Kohlenstofffilme verwendeten Pyren-Derivate (PG-O-Pyren und (PG-O)₂-Pyren) im Hinblick auf ihre Solubilisierungseigenschaften und zur gleichzeitigen biorepulsiven Funktionalisierung von SWCNTs zu untersuchen. Es wurden Solubilisierungstests mit den SWCNTs und einer 0.1%igen wässrigen Lösung der jeweiligen PG-Pyren-Derivate durchgeführt. Die Nanoröhren wurden hierfür in der PG-Pyren-Lösung suspendiert und anschließend zentrifugiert. Bei einer ausreichenden

Funktionalisierung der Nanoröhren durch die Detergenzien verbleiben sie nach der Zentrifugation in Lösung. Die Ergebnisse der Pyren-Derivate und anderer Vergleichsdetergenzien, welche häufig zur Solubilisierung von SWCNTs verwendet werden, sind in Abbildung 45 dargestellt. Der Test zeigt, dass (PG-O)₂-Pyren die Nanoröhren deutlich besser solubilisiert als PG-O-Pyren (die Lösung ist aufgrund der höheren Konzentration stärker gefärbt). Die Solubilisierungseffizienz ist vergleichbar zu der von Dodecylmaltosid (DDM).

Eine erfolgreiche Solubilisierung zeigt, dass die Oberfläche der SWCNTs mit einer Schicht des Pyren-Derivates überzogen ist. Inwiefern die Beschichtung ausreicht, um die Nanoröhren ausreichend biorepulsiv zu funktionalisieren, muss jedoch durch ein TEM-Experiment gezeigt werden.

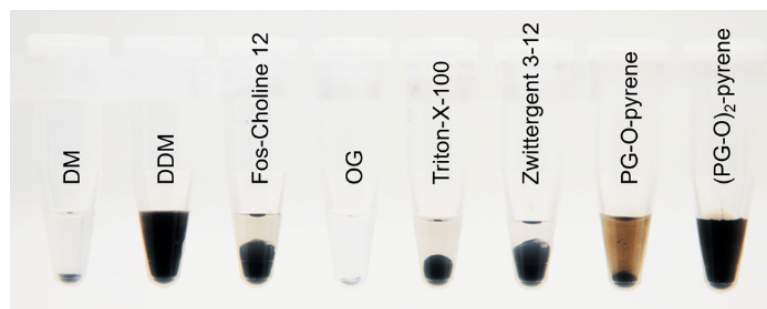


Abbildung 45: Solubilisierungstests von SWCNTs mit PG-O-Pyren und (PG-O)₂-Pyren und weiteren Detergenzien: Suspensionen nach 30 min Zentrifugation bei 15000 rpm. DM: Decylmaltosid, DDM: Dodecylmaltosid, Fos-Choline 12: *n*-Dodecylphosphocholin, OG: Octylglucosid, Triton-X-100: Polyethylenglykol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenylether, Zwittergent 3-12: *n*-Dodecyl-*N,N*-dimethyl-3-ammonium-1-propan-sulfonat.¹⁴³

Für die Deposition eines Netzwerkes aus Nanoröhren auf einen Kohlenstofflochfilm müssen die funktionalisierten Nanoröhren auf diesen Film mit einer bestimmten Dichte aufgebracht werden. Hierfür wurde eine Methode von Wu *et al.*¹⁴⁶ angepasst.

Der Prozess ist in Abbildung 46 a dargestellt. Der Überstand nach dem Abzentrifugieren der Suspension, welcher die solubilisierten SWCNTs enthält, wurde über einen Nitrocellulosefilter filtriert. Das mit den Nanoröhren bedeckte Filterpapier wurde anschließend mit der Oberseite auf ein mit einem amorphen Kohlenstofffilm bedecktes TEM-Netz gelegt und die Nitrocellulose mithilfe von Aceton aufgelöst. Abschließend

wurde das TEM-Netz zur Funktionalisierung der amorphen Kohlenstoffschicht erneut in eine wässrige (PG-O)₂-Pyren-Lösung gelegt.

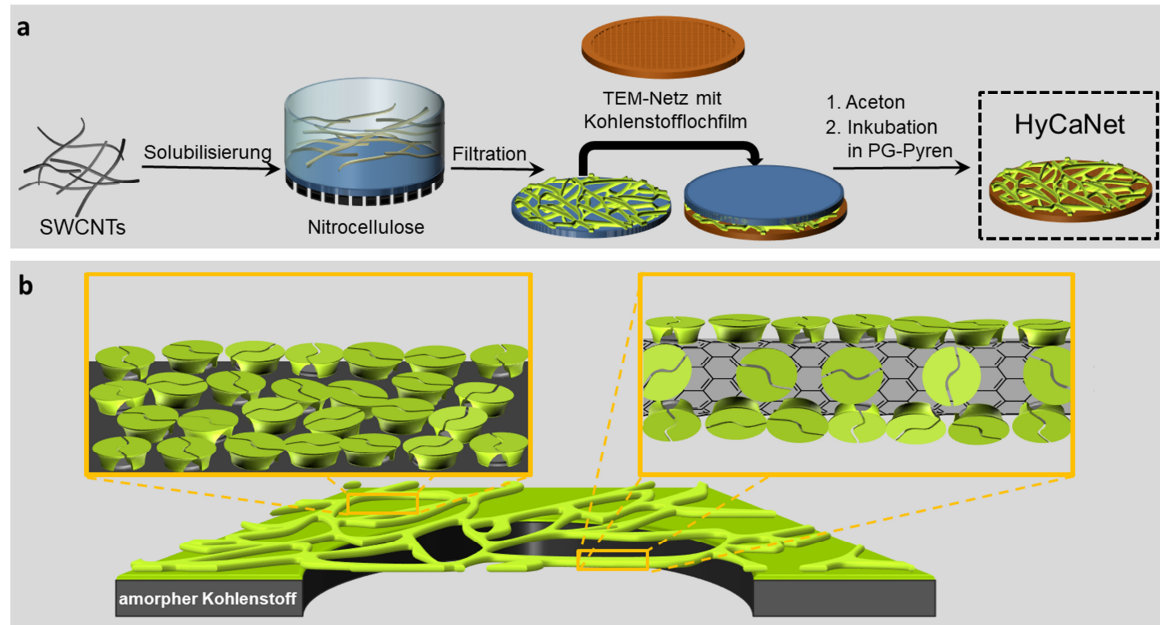


Abbildung 46: Herstellung und Aufbau eines HyCaNet: a) Die SWCNTs werden mit dem PG-Pyren-Derivat solubilisiert und anschließend durch einen Nitrocellulosefilter filtriert. Hierbei legen sich die SWCNTs auf den Filter. Anschließend wird dieser mit der Oberseite zum Kohlenstofffilm hin auf das Netz gelegt. Abschließend wird die Nitrocellulose mit Aceton aufgelöst und der noch unbeschichtete, amorphe Kohlenstoff durch Inkubation in einer PG-Pyren-Lösung mit PG bedeckt. b) Ein HyCaNet besteht aus einem TEM-Netz mit Kohlenstofflochfilm, dessen Löcher mit SWCNTs netzartig überspannt sind. Sowohl die SWCNTs wie auch der amorphe Kohlenstoff sind mit biorepulsivem PG beschichtet.¹⁴³

Die Variation der SWCNT Konzentration ermöglicht bei dem Verfahren, die Dichte der Kohlenstoffnanoröhren auf dem Nitrocellulosefilterpapier anzupassen. In Abbildung 47 ist eine TEM-Aufnahme eines HyCaNets abgebildet. Deutlich ist das Netzwerk aus Bündeln von SWCNTs zu erkennen, welche das Loch eines Kohlenstofflochfilms überspannen. In den Löchern des Netzwerks sollen die Proteine gleichmäßig verteilt in der Eisschicht vorkommen.

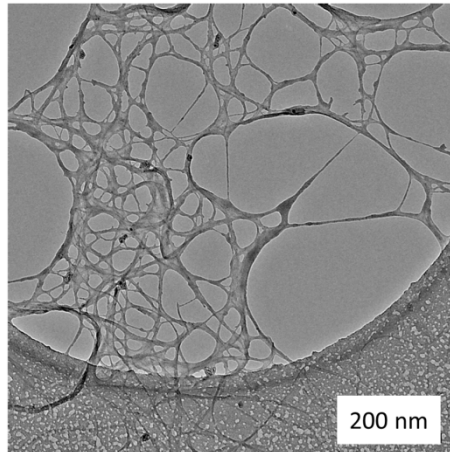


Abbildung 47: TEM-Aufnahme eines HyCaNets: Die Bündel von SWCNTs, welche das Loch eines Kohlenstofflochfilms überspannen, sind zu erkennen.¹⁴³

3.4.5. Untersuchungen eines Hydrogel-funktionalisierten Kohlenstoffnanoröhren-Netzwerkes hinsichtlich der Reduktion der Elektronenstrahl-induzierten Bewegung von Partikeln

Bevor die Reduktion der Elektronenstrahl-induzierten Bewegung von Partikeln im amorphen Eis evaluiert wurde, sollte die Biorepulsivität der HyCaNets untersucht werden. Hierfür wurden erneut Proben mit dem Komplex I bzw. der ATP-Synthase und HyCaNets, welche mit $(\text{PG-O})_2$ -Pyren oder PG-O-Pyren hergestellt wurden, präpariert. Repräsentative TEM-Aufnahmen sind in Abbildung 48 dargestellt.

Für beide Proteine konnte eine gleichmäßige Verteilung der Partikel in den Eisfilmen erhalten werden. Im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen führte eine Funktionalisierung der HyCaNets mit $(\text{PG-O})_2$ -Pyren zu mehr Partikeln im Eis. Für den Komplex I wurde die durchschnittliche Anzahl an Partikeln pro Aufnahme ($679 \text{ nm} \times 679 \text{ nm}$) bestimmt. Mit PG-O-Pyren hergestellte HyCaNets zeigten 12.6 Partikel pro Aufnahme (44 Aufnahmen wurden ausgewertet), wohingegen mit $(\text{PG-O})_2$ -Pyren funktionalisierte durchschnittlich 25.6 Partikel (48 Aufnahmen wurden ausgewertet) aufwiesen.

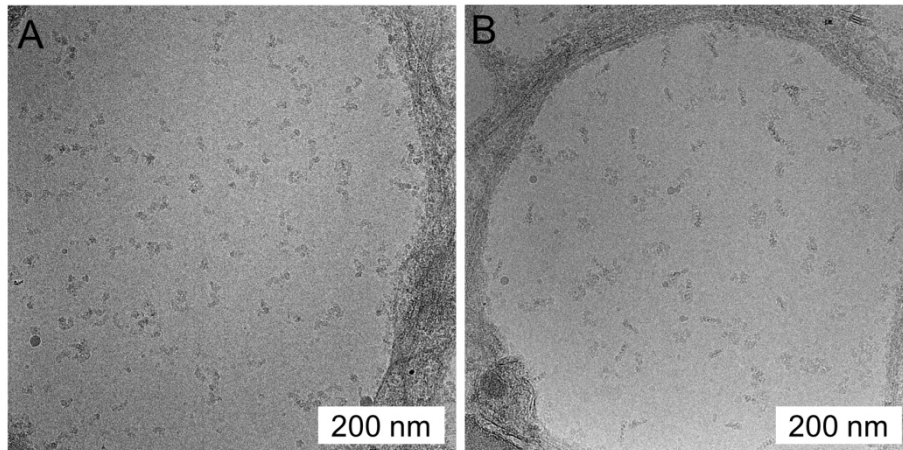


Abbildung 48: Untersuchungen der Proteinverteilung mit HyCaNets: Kryo-Proben des Komplexes I aus *Y. lipolytica* (A) und der *Polytomella* ATP Synthase (B), welche mit HyCaNets präpariert wurden. Die Verwendung von HyCaNets führt bei beiden Proteinen zu einer gleichmäßigen Verteilung der Partikel in der Eisschicht.¹⁴³

Die Anzahl an Partikeln pro Aufnahme bei der Verwendung von HyCaNets ist geringer, verglichen mit der Anzahl an Partikeln, welche für die nur mit den Pyren-Derivaten funktionalisierten Kohlenstofflochfilme bestimmt wurde. Dies ist auf die Fläche, die von den SWCNTs eingenommen wird, zurückzuführen. Aufgrund des Raumes, welchen die SWCNTs in den Löchern einnehmen, verringert sich die Fläche des freistehenden amorphen Eisfilms, sodass auf einer Aufnahme ein kleinerer Bereich des Eises ausgewertet werden kann.

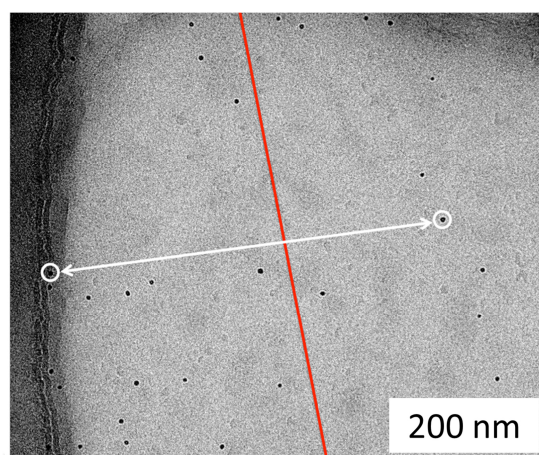


Abbildung 49: Analyse des Abstandes zweier Gold-Nanopartikel, von denen einer auf dem amorphen Kohlenstofffilm fixiert ist und der andere im amorphen Eis liegt (weißer Pfeil). Während der Datenaufnahme ist das TEM-Netz um 45° gekippt, um ebenfalls senkrecht zur Netzebene sensitiv zu sein. Die rote Linie zeigt die Achse der Kippung des TEM-Netzes.¹⁴³

Die Aufnahmen zeigen außerdem, dass die Proteine nicht an den SWCNTs akkumuliert sind, was auf eine ausreichende biorepulsive Funktionalisierung schließen lässt. Die erhaltenen Daten erlaubten die Berechnung der 3D Struktur des Komplexes I mit 25 Å Auflösung aus nur 1463 Partikeln.

Um zu überprüfen, ob das Nanoröhren-Netzwerk tatsächlich die Elektronenstrahl-induzierte Bewegung von Partikeln im Eis reduziert, wurde die Bewegung von Gold-Nanopartikeln im amorphen Eis quantifiziert.¹²⁰ Hierfür wurde der Abstand zweier Partikel bestimmt, von denen einer auf dem Kohlenstofffilm fixiert und der andere im amorphen Eis liegt. Während der Datenaufnahme wird die relative Bewegung dieser Partikel zueinander bestimmt. Um nicht nur innerhalb der Ebene des TEM-Netzes sensitiv zu sein, wurde dieses um 45° gekippt.

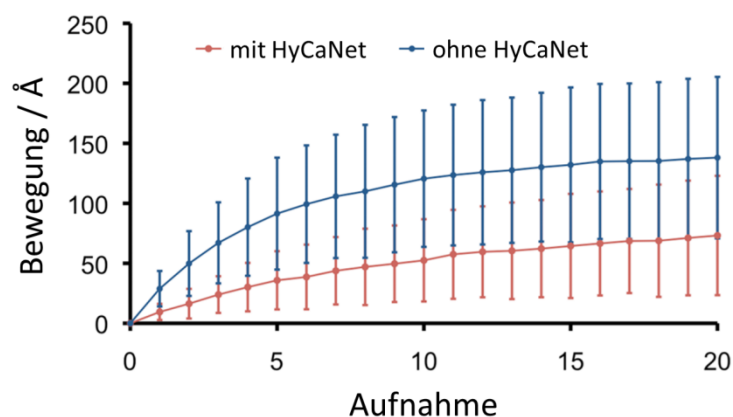


Abbildung 50: Vergleich der Bewegung von Gold-Nanopartikeln, welche mit HyCaNets oder Kohlenstofflochfilmen, die mittels Glimmentladungsplasma behandelt wurden, präpariert wurden: Als Referenz wurde das HyCaNet (rot, mit HyCaNet) mit einem vergleichbaren, mittels Glimmentladungsplasma behandelten Kohlenstofflochfilm (blau, ohne HyCaNet) verglichen. Für jede Aufnahme wurde eine Dosis von 2 Elektronen pro Pixel verwendet, und die Bewegung eines Partikels im amorphen Eis relativ zu einem auf dem Kohlenstofffilm fixierten bestimmt. Für die Berechnung der Werte wurden 21 Bildstapel mit HyCaNets und 20 Bildstapel ohne HyCaNets verwendet.¹⁴³

Die erhaltenen Messwerte sind in Abbildung 50 dargestellt. Diese zeigen, dass die Bewegung des Gold-Nanopartikels im Eis um 50 % reduziert wurde. In den ersten Aufnahmen, welche wichtig sind, da Kryo-TEM-Experimente in der Regel mit geringer Elektronendosis durchgeführt werden, beträgt die Reduktion sogar 70 %. Für die Verwendung von HyCaNets mit Biomolekülen ist somit eine deutliche Verbesserung der Bildqualität zu erwarten.

3.4.6. Schlussfolgerungen

Mit Pyren-funktionalisierte PG-Derivate ermöglichen die nicht-kovalente Funktionalisierung von amorphen Kohlenstoffoberflächen und SWCNTs mit einem Hydrogel durch die Wechselwirkung der Pyren-Einheit mit der Kohlenstoffoberfläche. Der Vergleich zweier Pyren-funktionalisierter PG-Derivate mit einem bzw. zwei PG-Dendrimern (PG-O-Pyren und (PG-O)₂-Pyren) zeigte, dass das Derivat mit zwei PG-Dendrimern zu einer besseren Bedeckung der Oberfläche und damit verbunden einer erhöhten Biorepulsivität führt. Die hergestellten PG-Pyren-Derivate eignen sich zudem zur Solubilisierung von SWCNTs.

Die Verwendung von PG-Pyren-Derivaten gemeinsam mit SWCNTs ermöglicht die Herstellung von HyCaNets auf TEM-Netzen mit amorphem Kohlenstofflochfilm. Hierbei werden die Löcher des amorphen Kohlenstofflochfilms mit einem Netzwerk aus SWCNTs überspannt. Sowohl der Kohlenstofffilm als auch die SWCNTs sind mit einer biorepulsiven Schicht aus PG-Hydrogel beschichtet. Die nicht-kovalente Funktionalisierung amorpher Kohlenstofffilme durch PG-Pyren-Derivate führt zu einer Verbesserung der Proteinverteilung hydrophober Proteine, die ansonsten zur Adsorption an Kohlenstofffilmen neigen. Die Solubilisierung der SWCNTs mit den PG-Pyren-Derivaten führt ebenfalls zu einer Bedeckung der Nanoröhren mit einem PG-Hydrogel, wodurch die Adsorption von Proteinen ebenfalls unterdrückt wird. Zusätzlich wird durch das SWCNT-Netzwerk der Wasserfilm stabilisiert und die Elektronenstrahl-induzierte Bewegung von Partikeln im amorphen Eis reduziert. Die Verwendung der entwickelten HyCaNets erleichtert die Präparation von Proben für die Kryo-TEM, da sie zu einer für die Mikroskopie guten Verteilung der Proteine in der Probe führen. Außerdem verbessert die Reduktion der Elektronenstrahl-induzierten Bewegung die Bildqualität der TEM-Aufnahmen.

Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieses Projekts wurden veröffentlicht. Weitere Informationen und experimentelle Details können der Veröffentlichung bzw. der *supporting information* entnommen werden:

Noncovalent Functionalization of Carbon Substrates with Hydrogels Improves Structural Analysis of Vitrified Proteins by Electron Cryo-Microscopy

Julian Scherr, Alexander Neuhaus, Kristian Parey, Niklas Klusch, Bonny J. Murphy, Volker Zickermann, Werner Kühlbrandt, Andreas Terfort, Daniel Rhinow

ACS Nano **2019** (akzeptiert zur Veröffentlichung)

DOI: 10.1021/acsnano.9b02651

Reprinted/adapted with permission from

Noncovalent Functionalization of Carbon Substrates with Hydrogels Improves Structural Analysis of Vitrified Proteins by Electron Cryo-Microscopy

Julian Scherr, Alexander Neuhaus, Kristian Parey, Niklas Klusch, Bonnie J. Murphy, Volker Zickermann, Werner Kühlbrandt, Andreas Terfort, and Daniel Rhinow

ACS Nano **2019 Article ASAP**

DOI: 10.1021/acsnano.9b02651

Copyright 2019 American Chemical Society.

3.5. Funktionalisierte Kohlenstoffnanomembranen mit spezifischen Anbindungsstellen

Für die Berechnung der dreidimensionalen Struktur von Biomolekülen werden TEM-Aufnahmen von Proben gemacht, in welchen die Biomoleküle homogen in einer dünnen Schicht aus amorphem Eis präpariert sind.

Eine Methode, eine gleichmäßig verteilte Probe von Biomolekülen zu erhalten, ist, diese an ein möglichst dünnes, kontinuierliches Trägermaterial zu binden. Hier finden beispielsweise wenige Nanometer dicke, kontinuierliche Kohlenstofffilme Anwendung. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch der reduzierte Kontrast der Aufnahme aufgrund der Streuung an dem Kohlenstofffilm.¹⁴⁷ Dünnere, leitfähige Materialien wie Graphen^{121,148–150} oder ähnliche kohlenstoffbasierte Materialien^{151–153} wurden im Hinblick auf die Reduktion des Kontrastverlustes durch das Trägermaterial untersucht. Allerdings kann eine Vorzugsorientierung der Proteine an den Filmen resultieren, da die Proteine mit ihren hydrophoben Seiten an diesen adsorbieren.³⁵ Überdies besteht die Möglichkeit einer Konformationsänderung des Proteins aufgrund der Adsorption.¹⁵⁴

Ein weiteres Problem in der Probenpräparation besteht darin, dass es oftmals nicht oder nur unter großem Aufwand möglich ist, sehr reine Lösungen von Proteinen zu erhalten oder diese anzureichern.¹⁵⁵ Inhomogenitäten in der präparierten Probe, wie Verunreinigungen durch andere Biomoleküle oder Partikel, können allerdings zu Problemen bei der Strukturbestimmung führen, weswegen diese möglichst vermieden werden müssen.

Interessant im Hinblick auf die Lösung der genannten Probleme ist die Anbindung von Biomolekülen über spezifische Erkennungsstellen (sog. Affinitäts-Tags, siehe Kapitel 1.7.) an ein dünnes, kontinuierliches Trägermaterial. Durch die gleichzeitige Verwendung eines biorepulsiven Trägerfilms mit spezifischen Erkennungsstellen kann selektiv das gewünschte Biomolekül angebunden werden, was einen weiteren Reinigungsschritt darstellt. Zusätzlich führt eine regelmäßige Verteilung der Erkennungsstellen zu einer gleichmäßigen Verteilung der Partikel auf dem Trägermaterial.¹⁵⁶ Werden die Erkennungsstellen ausreichend flexibel an das Trägermaterial angebunden, kann zudem eine Vorzugsorientierung vermieden werden.¹⁵⁷

Sogenannte *affinity-grids* wurden bereits hergestellt und für die Strukturbestimmung eingesetzt.^{157–160} Zur Anbindung der Makromoleküle wurden beispielsweise der His-Tag^{157,159–161}, Antikörper¹⁶² sowie die Streptavidin-Biotin-Affinität^{163–165} oder Kombinationen²³ verwendet. Problematisch für die Anwendung in der TEM ist bisher jedoch die große Dicke der hergestellten Systeme (stärkerer Hintergrund führt zu einem schlechteren Kontrast) oder die unspezifische Bindung ungewünschter Biomoleküle an dem Trägermaterial.

Im Rahmen dieses Projektes wurde ein *affinity-grid* entwickelt, welches auf einer aminoterminierten Kohlenstoffnanomembran (CNM) basiert, die biorepulsiv funktionalisiert und mit einem Komplexbildner zur spezifischen Anbindung His-Tag markierter Proteinen versehen wurde. Bei der Entwicklung des *affinity-grid* wurde besonderer Wert auf eine einfache Herstellung gelegt, was ermöglichen soll, die hier entwickelten TEM-Netze zu einem attraktiven Preis kommerziell anbieten zu können. Die Verwendung von CNMs bringt den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer geringe Dicke bei gleichzeitig hoher mechanischer Stabilität nur zu einem geringen Kontrastverlust führen. Außerdem erlaubt die Amino-Terminierung der eingesetzten CNMs eine einfache Funktionalisierung. Mit dem entwickelten *affinity-grid* können vorzugsweise mit einem His-Tag-markierte Proteine aus einer Mischung mit anderen Biomolekülen an das TEM-Netz gebunden werden.

3.5.1. Biorepulsive Funktionalisierung von Kohlenstoffnanomembranen mit Polyglycerol

Um einen kontinuierlichen, biorepulsiven Trägerfilm für die spezifische Anbindung von His-Tag-markierten Proteinen zu erhalten, sollten CNMs mit PG beschichtet werden. Die verwendeten CNMs wurde durch die Quervernetzung von 4-Nitro-1,1'-biphenylthiol(NBPT)-SAMs hergestellt. Durch den Elektronenbeschuss während der Quervernetzung wird die Nitrogruppe der SAM zu einer Aminogruppe reduziert,²⁷ welche für die Polymerisation des Glycidols genutzt werden kann.

Aluminiumoberflächen, welche mit mehreren Nanometern PG beschichtet sind, bieten sich als einfach herzustellendes, preiswertes Modellsystem für PG-beschichtete CNMs

an. Ab einer Dicke von einigen Nanometern exponieren beide Substrate eine geschlossene PG-Oberfläche, weswegen kein Unterschied in den Eigenschaften der Oberflächen zu erwarten ist. Aluminiumoberflächen lassen sich in einer 10%igen Lösung von Glycidol in absolutem NMP mit PG beschichten.⁶⁶

Zur Beschichtung wurde anfangs nicht unmittelbar frisch destilliertes Glycidol verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, dass hierdurch die Kontrolle der PG-Polymerisation schwieriger ist und die zu erwartende PG-Schichtdicke nicht oder nur teilweise vorhersehbar ist. Allerdings wurde bei der Verwendung von altem Glycidol allgemein ein deutlich stärkeres Schichtwachstum festgestellt als bei der Verwendung von frisch destilliertem.

Um die *affinity-grids* industriell produzieren zu können, ist es notwendig, diese reproduzierbar mit definierten PG-Schichtdicken anfertigen zu können. In Anlehnung an die Beschichtung oxidischer Oberflächen sollte die PG-Beschichtung der Amino-CNM in einer 10%igen Lösung von Glycidol in absolutem *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) erfolgen und eine Schichtdicke von mindestens 6 nm aufgebracht werden, da diese für eine vollständige Biorepulsivität notwendig ist.⁶⁶

Um eine Beschichtung der CNM mit hoher Reproduzierbarkeit zu ermöglichen, wurde die PG-Funktionalisierung der Amino-CNM in einer 10%igen Lösung von frisch destilliertem Glycidol in NMP bei 140 °C untersucht. Der Verlauf der ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken in Abhängigkeit von der Polymerisationszeit ist in Abbildung 52 dargestellt. Es zeigte sich, dass das Polymer anfangs nur sehr langsam auf der CNM aufwuchs. So wurde nach etwa 8 Stunden eine nur etwa 2.7 nm dicke Schicht erhalten. Für längere Reaktionszeiten wurde eine größere Schichtdickenzunahme beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine Alterung der Glycidol-Lösung bei erhöhten Temperaturen. Mehrere Monomere können miteinander reagieren, wodurch größere, aber noch reaktive Oligomere gebildet werden, welche in die Schicht eingebaut werden.¹⁶⁶ Hierdurch würde das Schichtwachstum beschleunigt werden.

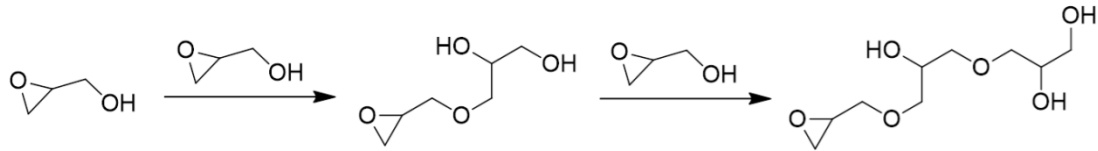


Abbildung 51: Autopolymerisation von Glycidol zu größeren Oligomeren. Die Oligomere besitzen immer noch eine Epoxideinheit, wodurch sie in die PG-Schicht eingebaut werden können.¹⁶⁶

Außerdem führten lange Reaktionszeiten zu einer stärkeren, ungewünschten Oxidation der PG-Schicht und zu starken Schwankungen der erhaltenen PG-Schichtdicken.

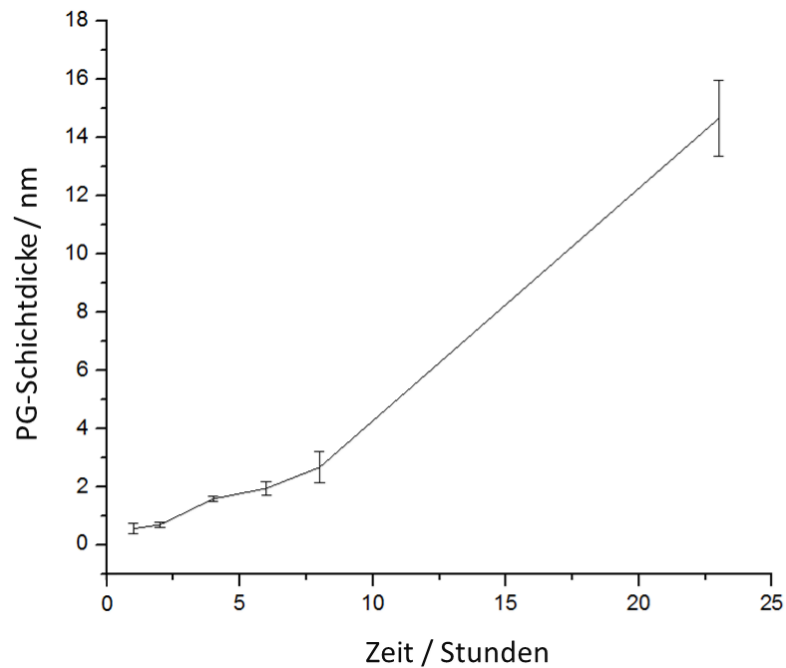


Abbildung 52: Beschichtung einer CNM mit einer 10%igen Lösung von Glycidol in absolutem NMP: Die CNM wurde für verschiedene Reaktionszeiten in der Glycidol-NMP-Lösung bei 140 °C beschichtet. Anschließend erfolgte die Schichtdickenbestimmung ellipsometrisch.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Beschichtung in reinem Glycidol bei 140 °C in kurzen Reaktionszeiten von wenigen Stunden zu reproduzierbaren Schichtdicken von 6 ± 1 nm (2 Stunden) bzw. 11 ± 1 nm (3 Stunden) führt. Die beschichteten Membranen konnten ebenfalls erfolgreich auf Siliziumwafer transferiert und die Dicke der Membranen an den Rändern mittels AFM gemessen werden (siehe Abbildung 53). Hier

wurden Schichtdicken von 9 und 13 nm für die gesamte mit PG-beschichtete CNM bestimmt. Da die CNM eine Dicke von etwa 1 bis 2 nm aufweist, stimmen die über die verschiedenen Methoden erhaltenen Werte gut überein.

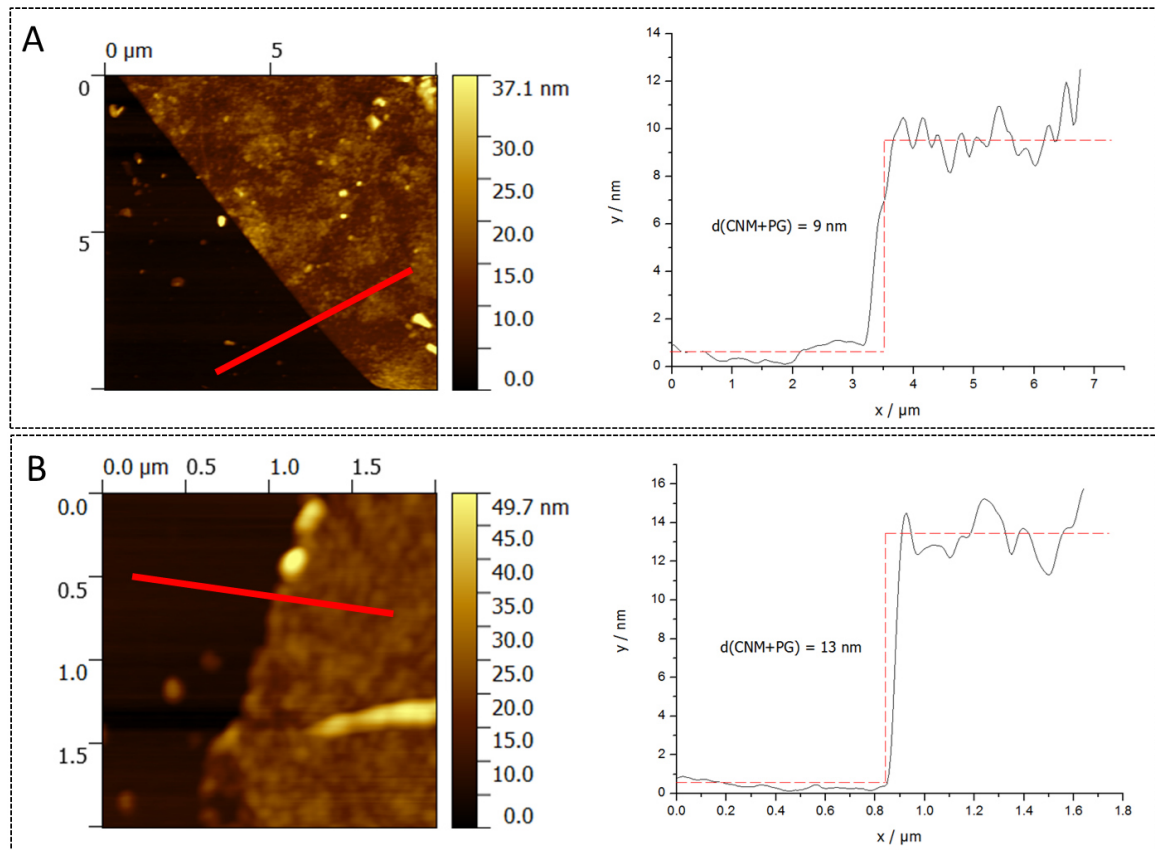


Abbildung 53: AFM-Aufnahmen von auf Siliziumwafer transferierten, mit PG beschichteten CNMs. Die CNMs wurden für 2 (A) und 3 Stunden (B) in reinem Glycidol bei 140 °C beschichtet. Aus dem Höhenprofil entlang der roten Linie kann die Dicke der Membran abgeschätzt werden.

Die erhaltene PG-Schicht wurde ebenfalls mittels IRRAS untersucht. Hier wurden die für PG charakteristischen Banden beobachtet, welche auch im IRRA-Spektrum der quervernetzten PG-Schichten auftraten (siehe Kapitel 3.2.1. und 3.4.2.). Charakteristische Banden für PG sind die Streckschwingungen der Hydroxygruppen im Bereich von 3200 bis 3600 cm^{-1} , die symmetrische und asymmetrische Methylen-Streckschwingung (2920 und 2880 cm^{-1}) und die symmetrische und asymmetrische Ether-Streckschwingung (900 und 1180 cm^{-1}). Die Bande bei 1740 cm^{-1} ist auf eine Oxidation des PG zurückzuführen.

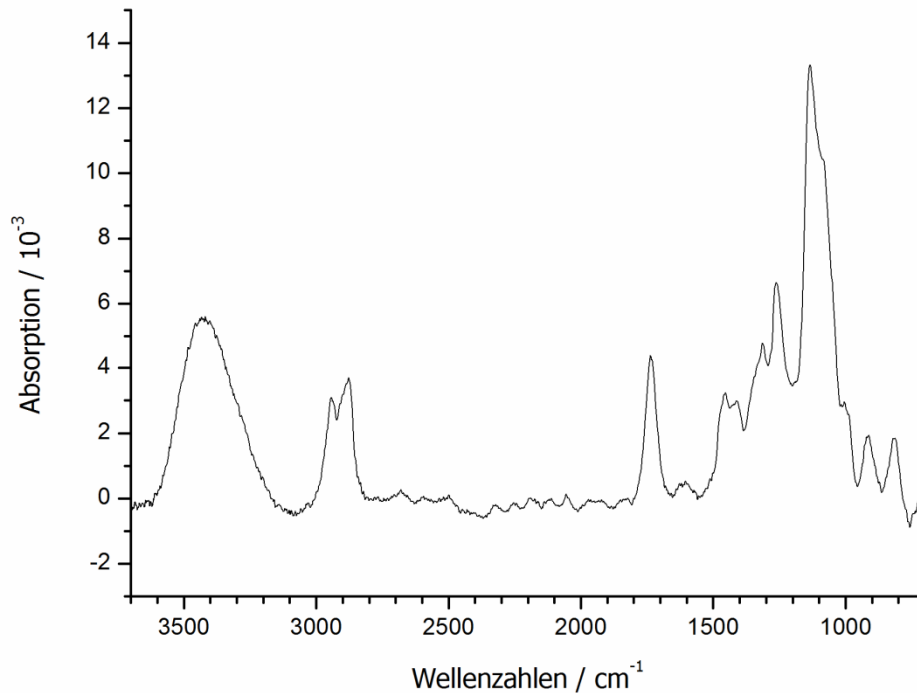


Abbildung 54: IRRA-Spektrum nach der erfolgreichen Polymerisation von PG auf eine CNM: Es sind verschiedene für PG charakteristische Banden bei 3200 bis 3600 cm^{-1} , 2920 und 2880 cm^{-1} und 900 und 1180 cm^{-1} zu erkennen. Die Bande bei 1740 cm^{-1} ist auf eine teilweise Oxidation des PG zurückzuführen

3.5.2. Untersuchungen zur spezifischen Anbindung von Proteinen über Ethylendiamintetraessigsäure

Die spezifische Anbindung der Proteine an das biorepulsive Trägermaterial sollte über einen His-Tag erfolgen. His-Tag markierte Proteine binden mit hoher Affinität an auf einer Oberfläche immobilisierte Nickelionen (siehe Kapitel 1.7.). Die in diesem Projekt entwickelten *affinity-grids* sollten kostengünstig produziert werden können, um sie zu einem attraktiven Preis anbieten zu können. Aus diesem Grund sollte eine möglichst einfache Methode zur Funktionalisierung der biorepulsiven PG-Oberfläche mit einem Chelat-Komplexbildner gefunden werden. In diesem Kontext erschien die Immobilisierung von Nickelionen auf der PG-Schicht mittels Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als eine interessante Möglichkeit, da EDTA kommerziell preiswert erhältlich ist und durch Aktivierung einer Carbonsäure-Gruppe leicht an die Hydroxy-Gruppen der PG-Schicht angebunden werden kann. Infolgedessen sollte die

Methode unter Verwendung von EDTA, zur Anbindung von His-Tag markierten Proteinen an eine PG-Oberfläche, untersucht werden.

3.5.2.1. Funktionalisierung von PG-Oberflächen mit EDTA

EDTA sollte über eine der Carbonsäure-Gruppen an die PG-Oberfläche angebunden werden. Hierfür muss zunächst eine der Carbonsäure-Gruppen aktiviert werden. Zu diesem Zweck wurde EDTA-Monoanhydrid (EDTA-MA), ein aktiviertes EDTA-Derivat, nach Literatur¹⁶⁷ hergestellt. EDTA-MA kann mit den Hydroxygruppen der PG-Schicht reagieren, wobei EDTA über eine der Säuregruppen an das Polymer angebunden wird. Nach der Anbindung stehen drei Säuregruppen und zwei Aminogruppen des EDTA-Moleküls für eine Koordination des Nickelions zur Verfügung (siehe Abbildung 55).

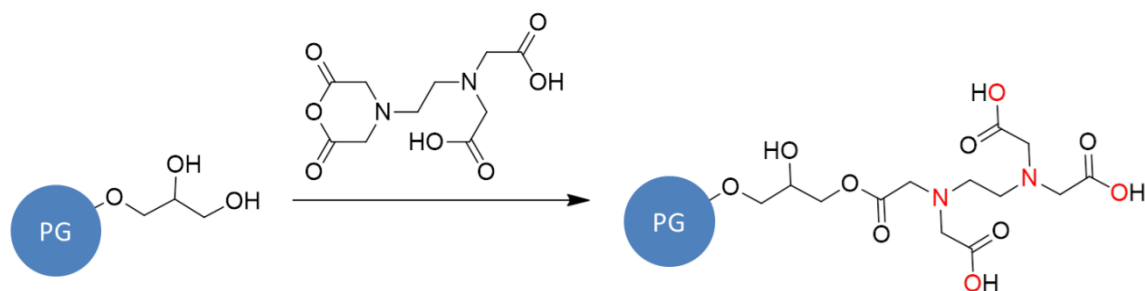


Abbildung 55: Reaktion von EDTA-MA mit PG: Eine Hydroxygruppe aus dem Polymer kann nukleophil das Anhydrid öffnen. Hierdurch wird EDTA über eine Säuregruppe an das Polymer gebunden. Die Atome, welche für eine Koordination des Nickelions zur Verfügung stehen, sind rot markiert.

Die Untersuchungen zur Anbindung der EDTA erfolgte an PG-Schichten, welche in einer 10%igen Lösung von Glycidol (nicht frisch destilliert) in absolutem NMP bei 140 °C an Aluminiumoberflächen abgeschieden wurden (10 ± 1 nm PG). Die Beschichtung der Aluminiumoberflächen erfolgte nach dem älteren Verfahren,⁶⁶ da zu dem Zeitpunkt der Experimente das optimierte Beschichtungsverfahren, unter Verwendung von reinem Glycidol, noch nicht entwickelt war. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Eigenschaften der PG-Filme, welche in einer verdünnten Lösung von NMP hergestellt wurden, vergleichbar mit denen sind, welche in reinem Glycidol polymerisiert wurden.

Für die Funktionalisierung der Oberfläche wurden verschiedene EDTA-MA-Konzentrationen in einem Bereich von 0.0005 bis 1 % in absolutem *N,N*-Dimethylformamid (DMF) untersucht. Zur Funktionalisierung wurden die Oberflächen für eine Stunde in der jeweiligen Lösung auf 90 °C erhitzt.

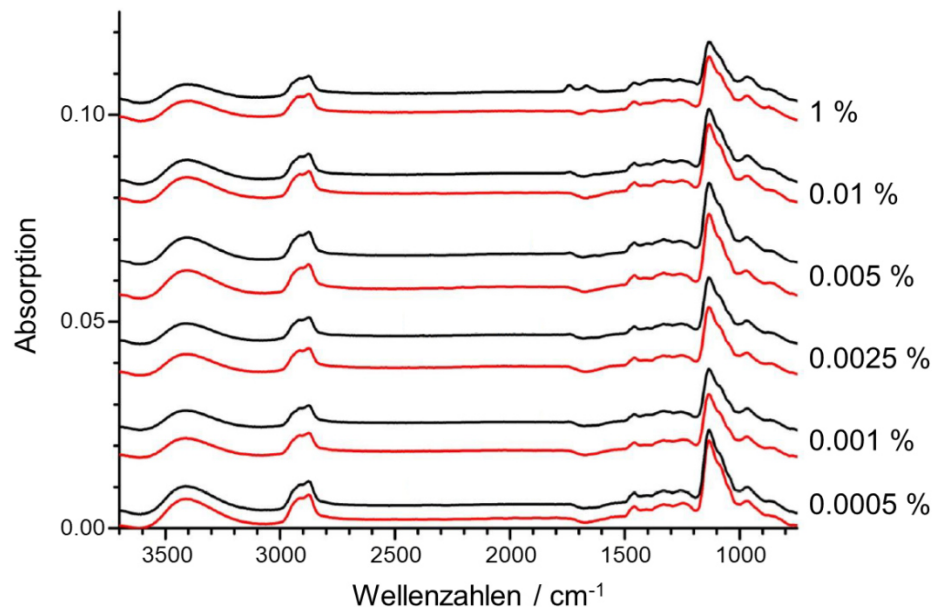


Abbildung 56: IRRA-Spektren von PG-Oberflächen vor (rot) und nach (schwarz) der Funktionalisierung mit verschiedenen Konzentrationen von EDTA-MA (0.0005 bis 1 Gew.-%). Für eine 1%ige EDTA-MA Konzentration zeigen die Banden bei 1620 und 1735 cm⁻¹ eine erfolgreiche Anbindung von EDTA an die Oberfläche.

Die Oberflächen wurden vor und nach der Umsetzung mit EDTA-MA mittels IRRAS untersucht (siehe Abbildung 56). Neben den Banden des PG (siehe Kapitel 3.5.1.) sind nach der Umsetzung mit EDTA-MA zwei neue Signale bei 1735 und 1620 cm⁻¹ in dem Spektrum der PG-Oberflächen, welche mit der 1%igen Lösung behandelt wurden, zu erkennen. Die Bande 1735 cm⁻¹ entspricht der Carbonyl-Streckschwingung des Esters, der aus der Reaktion des EDTA-MA mit einer Hydroxygruppe des PG resultiert. Die zweite Bande kann den Carbonyl-Streckschwingungen der verbleibenden drei Carbonsäuregruppen des EDTA zugeordnet werden.

Durch Subtraktion des Spektrums der PG-Schicht von dem Spektrum nach der Funktionalisierung derselben PG-Schicht werden die Banden auch bei kleineren Konzentrationen erkennbar (siehe Abbildung 57). Bei der Verwendung einer

0.0005%igen Lösung von EDTA-MA kann mittels IRRAS keine Anbindung von EDTA detektiert werden. Für die höheren Konzentrationen sind die beiden Banden jedoch gut sichtbar. Verschiedene Konzentrationen an EDTA sind interessant, da sich hierdurch die Oberflächendichte an durch Nickelionen aktivierte Bindungsstellen einstellen lässt. Dies würde eine Kontrolle der Dichte an spezifisch gebundenen His-Tag-markierten Proteinen erlauben.

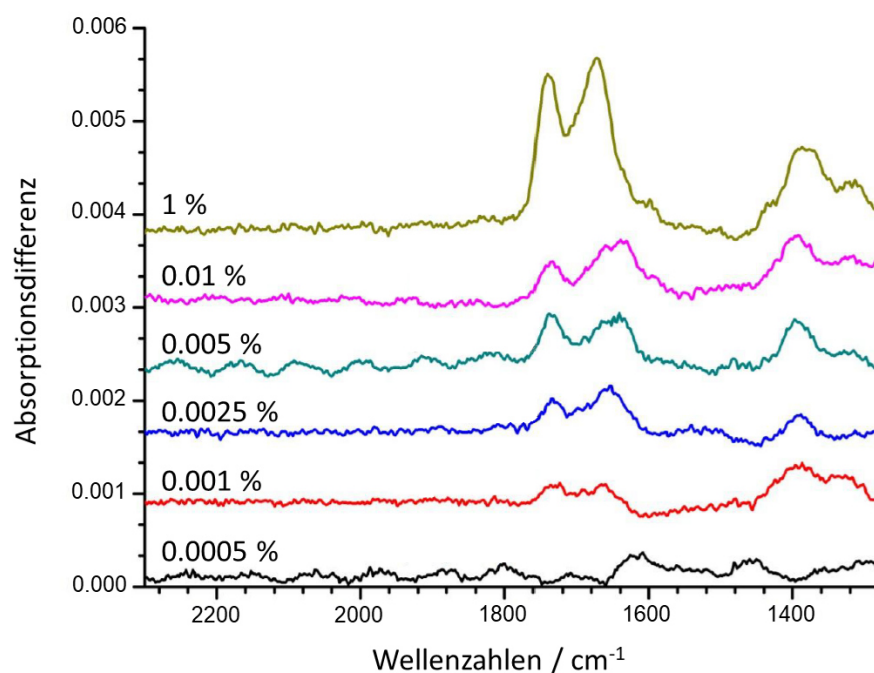


Abbildung 57: IRRAS-Differenzspektren von PG-Oberflächen, welche mit verschiedenen Konzentrationen von EDTA-MA funktionalisiert wurden (siehe Abbildung 56). Das Spektrum der PG-Oberfläche wurde von dem gemessenen Spektrum nach der Behandlung mit EDTA-MA abgezogen. Die Carbonyl-Streckschwingung bei 1620 und 1735 cm⁻¹ zeigt die erfolgreiche Anbindung von EDTA an die Oberflächen.

Weiterhin wurde die Anbindung von Nickelionen über die auf der PG-Oberfläche immobilisierten EDTA-Einheiten mittels Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TXRF) untersucht. Hierfür wurden mit Aluminium bedampfte Quarz-Träger mit PG-beschichtet und mit verschiedenen EDTA-MA-Konzentrationen funktionalisiert. In Abbildung 58 ist der Verlauf des Nickel-Peaks des $K\alpha$ -Übergangs bei 7.47 keV mit variierender EDTA-MA-Konzentration aufgetragen. Die Zunahme des Nickel Signals bei steigender EDTA-Konzentration auf der Oberfläche ist gut zu erkennen. Zusätzlich wurden die Oberflächen für 20 Minuten im Ultraschallbad mit Wasser behandelt. Die

anschließende Messung zeigt, dass das Signal nur geringfügig durch die Behandlung abnimmt. Die Nickelatome sind demnach fest an die Oberfläche gebunden. Die IRRAS- und TXRF-Messungen zeigen, dass durch die Variation der EDTA-MA-Konzentration die Menge an EDTA und Nickelionen, welche an die PG-Oberfläche gebunden wird, kontrolliert werden kann.

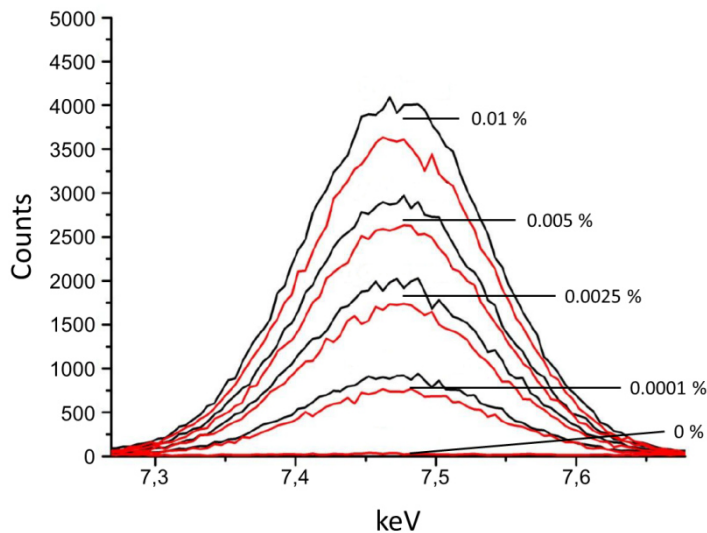


Abbildung 58: Nickel-Signal in den TXRF-Spektren nach Modifizierung der PG-Oberflächen mit verschiedenen EDTA-Monoanhydrid-Konzentrationen: Mit steigender EDTA-Konzentration auf der Oberfläche steigt auch die Menge an Nickel, welche gebunden wird (schwarz). Nach Behandlung im Ultraschallbad hat sich die Menge an Nickel auf der Oberfläche nur geringfügig geändert (rot), weswegen davon ausgegangen werden kann, dass das Nickelion fest an die Oberfläche gebunden ist.

3.5.2.2. Proteinanbindung an die mit EDTA-funktionalisierten PG-Oberflächen

Die verschiedenen mit EDTA-funktionalisierten Oberflächen sollten weiterhin hinsichtlich der unspezifischen und spezifischen Anbindung von Proteinen untersucht werden.

Hierfür wurden die Oberflächen zunächst in Phosphat gepufferten Salzlösungen (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) (1 mg/mL) von Bovinem Serumalbumin (BSA) und γ -Globulin inkubiert, um die unspezifische Adsorption dieser Proteine zu untersuchen. Es wurden sowohl Oberflächen mit und ohne Nickel-Aktivierung (Inkubation der Oberfläche

in einer 0.1%igen Nickelsulfat-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur) betrachtet. Im Anschluss wurde die durch die unspezifische Adsorption der Proteine an der Beschichtung hervorgerufene Schichtdickenänderung ellipsometrisch bestimmt (siehe Abbildung 59).

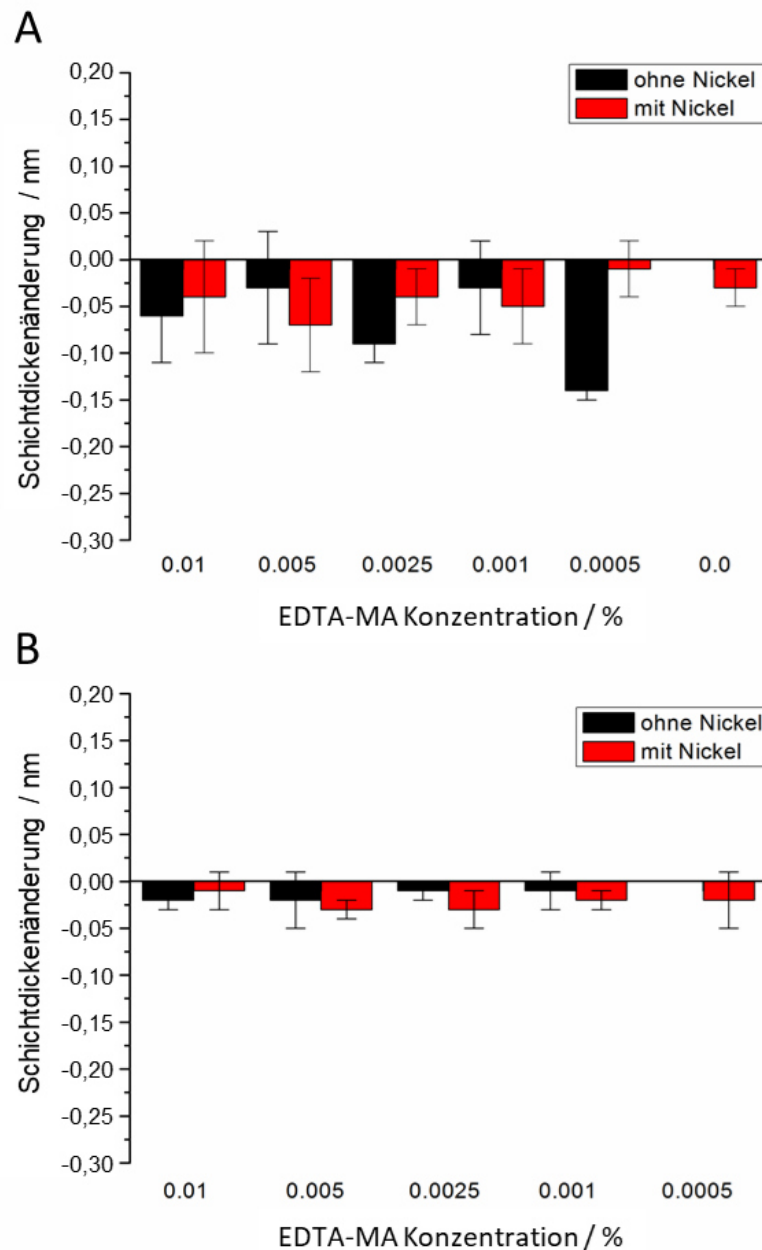


Abbildung 59: Biorepulsivitäts-Test von PG-EDTA Oberflächen, welche mit verschiedenen Konzentrationen an EDTA-MA funktionalisiert wurden. Es wurde zum Testen der Biorepulsivität BSA (A) und γ -Globulin (B) verwendet. Die Biorepulsivität der Oberfläche wurde mit und ohne Beladung mit Nickel getestet. Alle Oberflächen zeigen eine vollständige Biorepulsivität.

Als Resultat wurde für alle Konzentrationen eine leichte Abnahme ($< 1 \text{ \AA}$) der Schichtdicke gefunden, welche durch das Spülen der Oberflächen nach dem Herausnehmen aus den Proteinlösungen erklärt werden kann. Alle Oberflächen weisen gute biorepulsive Eigenschaften unabhängig von der Aktivierung mit Nickel oder der Menge an gebundenem EDTA auf.

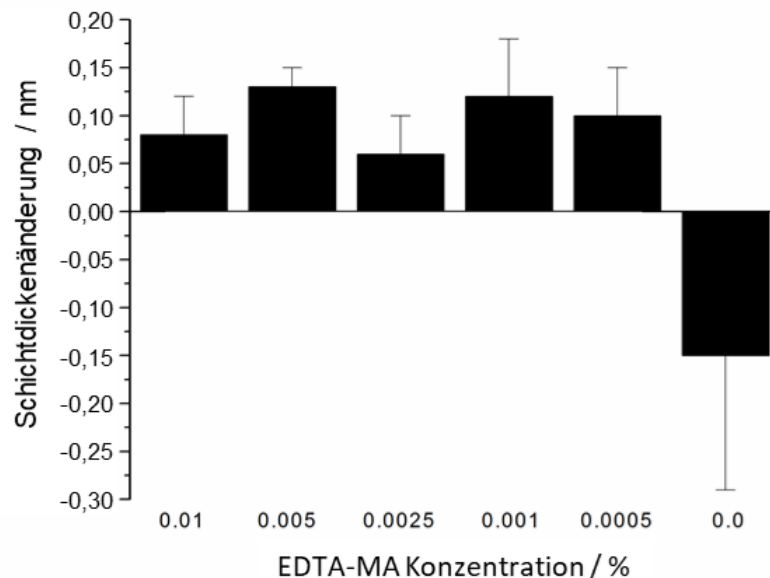


Abbildung 60: Anbindung von $^8\text{His-GFP}$ an PG-EDTA Oberflächen, welche mit verschiedenen Konzentrationen an EDTA-MA funktionalisiert wurden. Es ist nur ein kleiner Anstieg in der Schichtdicke nach der Inkubation mit dem Protein zu erkennen. Somit wurde nur eine geringe Menge des Proteins an die Oberfläche gebunden.

Zur Untersuchung der spezifischen Anbindung über den His-Tag wurde ein mit einem octa-His-Tag-markiertes, grün fluoreszierendes Protein ($^8\text{His-GFP}$) (1mg/mL) verwendet. Die Oberflächen wurden analog in PBS-gepufferte Lösungen des Proteins gelegt und die Schichtdickenzunahme anschließend ellipsometrisch bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 60 dargestellt. Für alle Oberflächen, welche mit EDTA funktionalisiert wurden, war eine leichte Zunahme zu erkennen. Die nicht funktionalisierte PG-Oberfläche hingegen wies eine leichte Abnahme auf. Zwischen den Oberflächen, welche mit verschiedenen Konzentrationen an EDTA-MA funktionalisiert wurden, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Der Unterschied zwischen der nicht-funktionalisierten und funktionalisierten Oberfläche betrug maximal 2 \AA . Das GFP besitzt

einen Durchmesser von etwa 4 nm^{168} , sodass auch bei einer Oberfläche, welche mit einer hohen Konzentration funktionalisiert wurde, nur wenige Proteine angebunden sind.

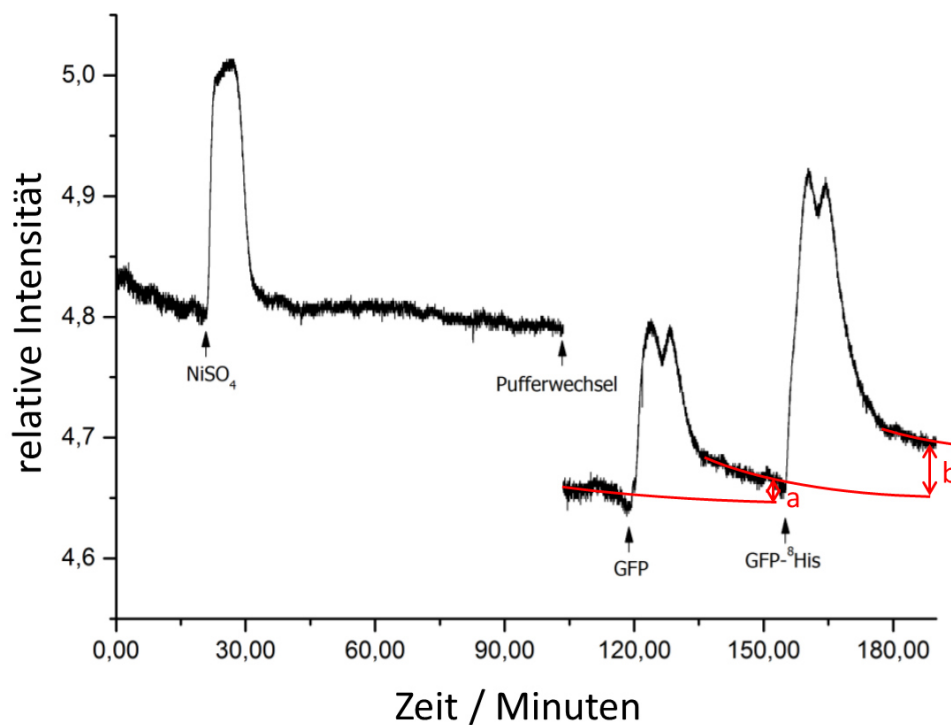


Abbildung 61: SPR-Messung einer mit 0.1%igen EDTA-MA funktionalisierten PG-Oberfläche: Zunächst erfolgte die Beladung der EDTA Gruppen mit Nickelionen durch Exposition zu 0.1%iger NiSO₄ Lösung in Wasser. Nach dem Wechsel auf PBS-Puffer wurde zunächst GFP ohne His-Tag (1 mg/mL) über die Oberfläche gespült, wobei nahezu keine Anbindung erfolgte (a). Anschließend wurde ⁸His-GFP (1 mg/mL) injiziert, was zu einer geringen Anbindung des Proteins führte (b).

Eine Methode, welche sich sehr gut eignet, um Adsorptionsprozesse an Oberflächen zu untersuchen, ist die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) (siehe Kapitel 1.8.4.). Hierbei wurde eine mit einer 0.1%igen Lösung von EDTA-MA funktionalisierte PG-Oberfläche zunächst nur mit GFP ohne His-Tag und anschließend mit ⁸His-GFP behandelt (siehe Abbildung 61). Somit wurde ausschließlich der Einfluss des His-Tags auf die Anbindung des Proteins an die mit Nickelionen beladene Oberfläche betrachtet.

Nach der Aktivierung der Oberfläche mit einer wässrigen Nickelsulfat-Lösung wurde die Oberfläche mit PBS-Puffer gespült und GFP ohne His-Tag (1 mg/mL) injiziert. Nach dem Spülen mit PBS-Puffer fiel das Signal wieder auf die Basislinie ab. Es wurde keine signifikante Anlagerung des Proteins an die Oberfläche beobachtet, was die

Biorepulsivität der Beschichtung nachweist. Anschließend wurde ⁸His-GFP (1 mg/mL) über die Oberfläche geleitet. Es wurde ein leichter Anstieg des Signals nach dem Spülen mit PBS beobachtet, weswegen hier auch nur von einer geringfügigen Anbindung des Proteins ausgegangen werden muss. Die Ergebnisse der ellipsometrisch und mittels SPR ermittelten Anbindung von His-Tag-markierten Proteinen an eine Oberfläche, auf welcher Nickelionen mit EDTA immobilisiert wurden, zeigen, dass mit diesem System keine effiziente Anbindung des His-Tag-markierten Proteins erreicht wird. Dies deutet auf eine geringere Affinität des His-Tags zu Nickelionen, welche über EDTA an die Oberfläche gebunden sind, hin. Möglicherweise führt die Koordination des Histidins an ein Nickelion, welches von EDTA koordiniert ist, zu keinem großen Energiegewinn, weswegen hier nur eine schwache Bindung auftritt. Häufig verwendete Chelatoren wie die Nitrilotriessigsäure (NTA) oder Iminodiessigsäure (IDA) weisen weniger Bindungsstellen zum Nickel auf,⁹² wodurch dort mehrere Koordinationsstellen des Nickelions für die Koordination mit Histidinen des His-Tags zur Verfügung stehen und der Komplex stabilisiert wird (Chelat-Effekt). Ein His-Tag markiertes Protein wird aufgrund der Stabilisierung stärker an die Oberfläche gebunden.

3.5.3. Untersuchungen zur spezifischen Anbindung von Proteinen über ein Nitrilotriessigsäure-Derivat

Die Untersuchungen zur Anbindung von His-Tag-markierten Proteinen an eine PG-Oberfläche, auf welcher Nickelionen mit EDTA immobilisiert wurden, zeigten, dass sich dieses System nicht zur Anbindung His-Tag markierter Proteine eignet. In der Literatur werden Derivate der Nitrilotriessigsäure (NTA) vielfach für die Anbindung von His-Tag markierten Proteinen verwendet.^{87,90-93} Außerdem können multivalente Verbindungen eingesetzt werden, um His-Tag Proteine mit höherer Affinität zu binden. Für diese Verbindungen, in denen mehrere NTA-Gruppen miteinander verknüpft sind, steigt die Stabilität des Komplexes mit dem His-Tag mit zunehmender Anzahl an NTA-Gruppen an.⁹³

Häufig werden unsymmetrisch funktionalisierte Verbindungen, welche mehrere NTA-Gruppen und einen Linker zur Anbindung des Moleküls aufweisen, verwendet.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

Diese NTA-Derivate erfordern jedoch zur Herstellung einen erhöhten synthetischen Aufwand. Da ein Vorgehensziel dieses Projektes die Entwicklung eines möglichst einfachen und kostengünstigen Systems war, sollte das symmetrische, multivalente NTA-Derivat **9** hergestellt werden, welches analog zu der Funktionalisierung von PG mit EDTA leicht über die Aktivierung einer Säuregruppe an die PG-Oberfläche angebunden werden soll. Aufgrund des symmetrischen Aufbaus des Moleküls lässt sich dieses unter geringerem synthetischen Aufwand herstellen.

Durch Zugabe eines Äquivalentes eines Aktivierungsreagenzes soll eine Säuregruppe von Verbindung **9** aktiviert und das Molekül hierdurch an die PG-Oberfläche gebunden werden. Somit würden drei weitere NTA-Gruppen für eine Anbindung des Proteins zur Verfügung stehen, wodurch eine erhöhte Affinität zu His-Tag markierten Proteinen erreicht werden sollte.

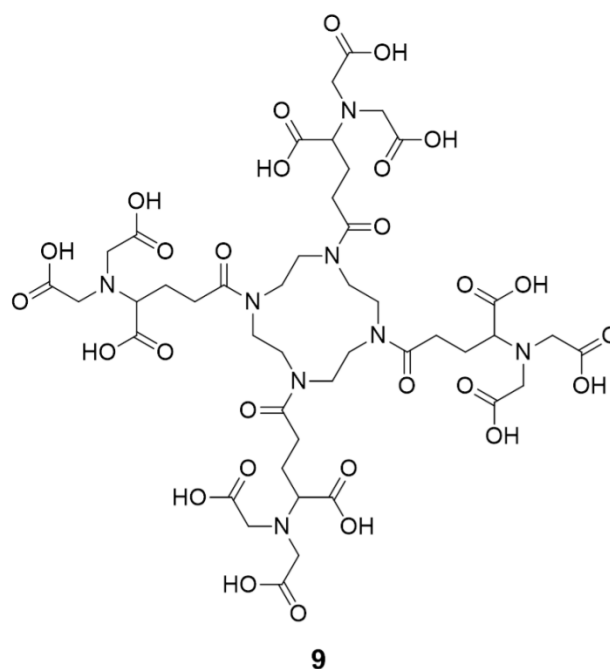


Abbildung 62: Multivalentes NTA-Derivat: Nach Aktivierung einer der Säuregruppen soll die Verbindung **9** an eine PG-Oberfläche angebunden werden und, nach Koordination mit Nickel, His-Tag markierte Proteine mit hoher Affinität binden.

3.5.3.1. Synthese des multivalenten NTA-Derivates 9

Zur Synthese des NTA-Derivats **9** soll zunächst Verbindung **10** nach Literatur¹⁶⁹ hergestellt werden. Anschließend soll das Molekül **10** mit Cyclen (**11**) zu dem *tert*-Butyl-geschützten Derivat **12** umgesetzt werden (siehe Abbildung 63). Nach einer säurekatalytischen Abspaltung der *tert*-Butyl-Gruppen von Verbindung **12** soll das Zielmolekül **9** erhalten werden.

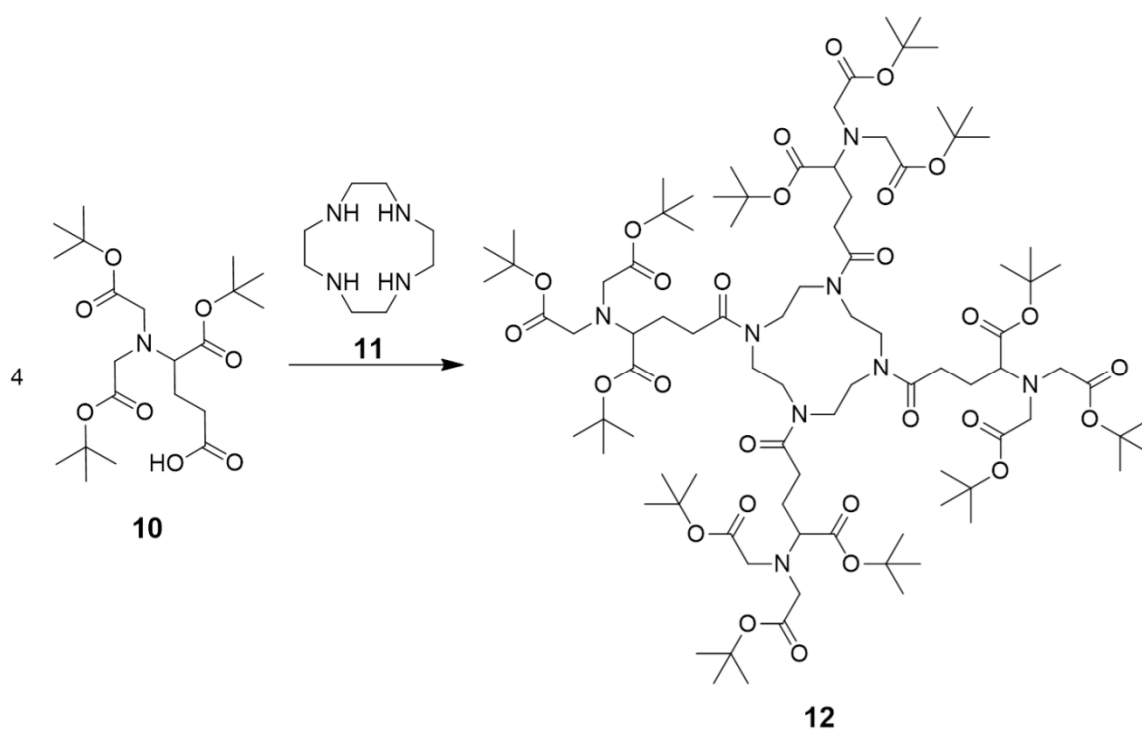


Abbildung 63: Synthese der *tert*-Butyl-geschützten Verbindung **12**: Die Verbindung kann ausgehend von Verbindung **10** und **11** in einer TBTU-vermittelten Reaktion gewonnen werden.

Die Synthese der Verbindung **10** gelang gemäß Literatur.¹⁶⁹ Anschließend konnte Verbindung **12** erfolgreich durch die Umsetzung des NTA-Derivates **10** und Cyclen (**11**) gewonnen werden. Die Umsetzung erfolgte über eine 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammoniumtetrafluoridoborat (TBTU)-vermittelte Kupplung in Anlehnung an Lata *et al.*⁹³ Nach säulenchromatographischer Aufreinigung erfolgte die Abspaltung der *tert*-Butylgruppen mit TFA⁹³ und das Zielmolekül **9** wurde erhalten. Die vollständige säulenchromatographische Auftrennung des Gemisches nach der Abspaltung der *tert*-

Butylgruppen war nicht möglich. Die Analyse des Rohproduktes mittels HPLC zeigte mehrere Verbindungen, welche eine ähnliche Retentionszeit aufwiesen, jedoch in ihrer Masse von dem Produkt **9** verschieden waren. Die Zuordnung der Verbindungen anhand der Daten aus der massenspektrometrischen Analyse war nicht möglich. Die Isolation der Verbindung **9** gelang schließlich mittels *reversed phase* HPLC mit Acetonitril/Wasser als Eluent. Das Produkt **9** konnte massenspektrometrisch eindeutig nachgewiesen werden. Im Folgenden wird das NTA-Derivat **9** als NTA₄Cyclen bezeichnet.

3.5.3.2. Funktionalisierung von PG-Oberflächen mit NTA₄Cyclen

Für die Funktionalisierung der PG-Oberfläche wurden Säuregruppen des NTA₄Cyclens mit 1.5 Äquivalenten Oxalylchlorid in absolutem DMF aktiviert. Die 0.17%ige Lösung an NTA₄Cyclen wurde mit *N,N*-Diisopropylethylamin versetzt, auf die mit PG-beschichtete CNM gegeben und über Nacht auf 70 °C geheizt.

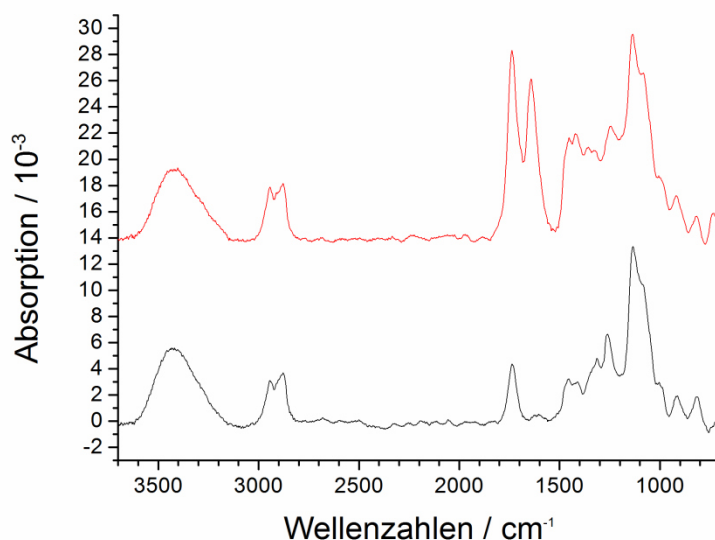


Abbildung 64: IRRA-Spektrum vor und nach der Funktionalisierung der mit PG-beschichteten CNMs mit NTA₄Cyclen: Die Banden bei 1650 und 1740 cm⁻¹ zeigen die erfolgreiche Anbindung des NTA-Derivates an die Oberfläche.

Die Charakterisierung der Oberflächen erfolgte mittels IRRAS und Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. *X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS). Das IRRA-

Spektrum vor und nach der Funktionalisierung ist in Abbildung 64 dargestellt und zeigt zwei charakteristische Banden, welche auf eine erfolgreiche Funktionalisierung der PG-Schicht hinweisen. Hierbei handelt es sich um Amid- bzw. Ester-Streckschwingung bei 1650 cm^{-1} und die Carbonyl-Streckschwingung der Säuregruppen bei 1740 cm^{-1} .

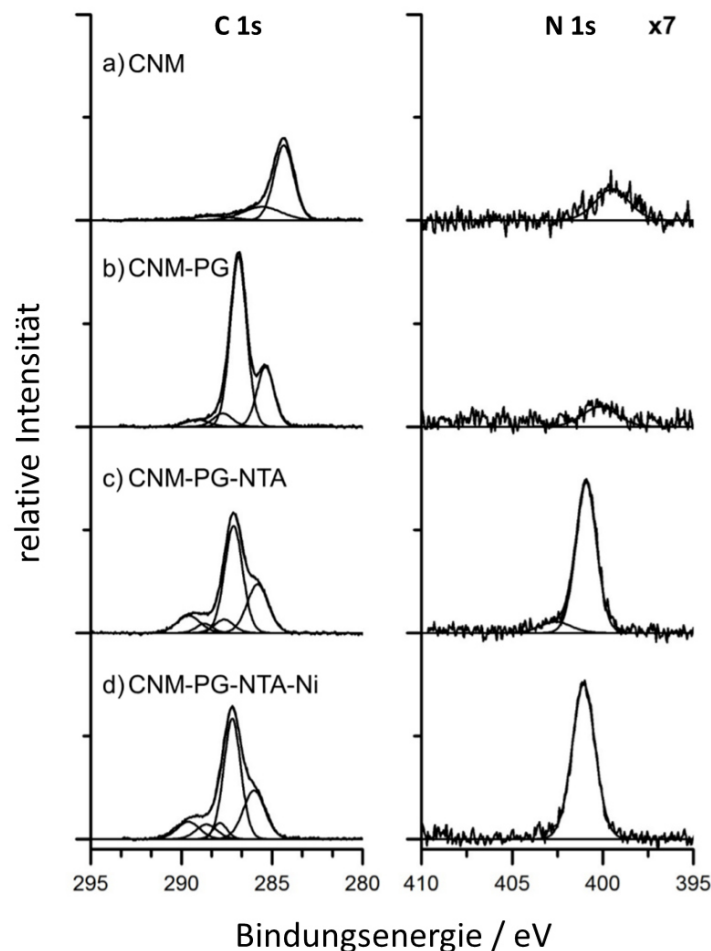


Abbildung 65: XP-Spektrum des C 1s und N 1s-Signals der verschiedenen Funktionalisierungen: Dargestellt sind die NBPT-CNM(a), anschließend mit Polyglycerol-funktionalisierte CNM (b), die mit NTA₄Cyclen-funktionalisierte PG-CNM (c) und die mit NTA₄Cyclen-funktionalisierte PG-CNM nach der Koordination von Nickelionen (d).

Die XP-Spektren der verschiedenen funktionalisierten Membranen sind in Abbildung 65 gezeigt. Die unbehandelte NBPT-CNM weist ein Signal bei 185.1 eV auf, welche typisch für die C-C Einfachbindungen innerhalb der Nanomembran ist. Im N 1s Spektrum ist der Peak für die Aminogruppe, welche sich während des Elektronenbeschusses bei der Quervernetzung aus der Nitrogruppe bildet, zu erkennen (siehe Kapitel 1.2.2.2.). Ein

Signal der Nitrogruppe ist nicht vorhanden, sodass eine vollständige Reduktion angenommen werden kann. Nach der Pfropfung von PG auf die CNM verschwindet der Peak der Aminogruppe nahezu und starke Signale im C 1s Spektrum bei 285.6 und 286.9 eV, welche den Alkylketten im PG und oxidiertem Kohlenstoff (Ether-Gruppen) zugeordnet werden können, erscheinen. Schwache Signale bei 287.7 und 289.3 eV können überoxidierten Kohlenstoffspezies (Carbonyl-Gruppen) zugeordnet werden.

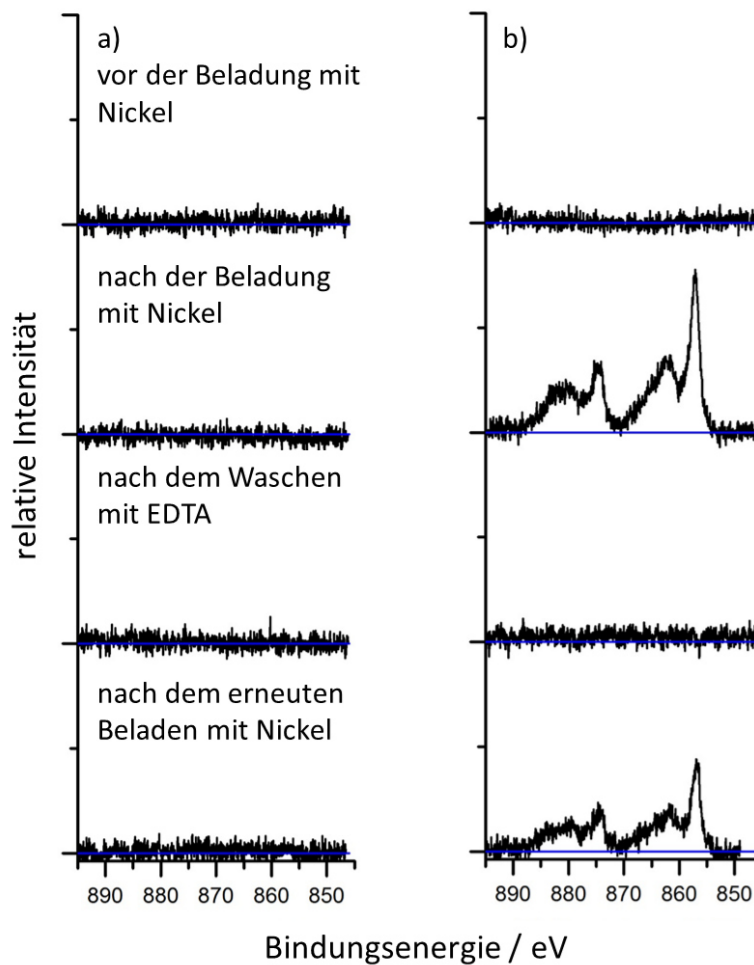


Abbildung 66: Ni 2p-Signal eines Beladungstests einer PG-CNM mit Nickel (a) und einer mit NTA₄cyclen funktionalisierten PG-CNM (b): Im Gegensatz zu der nicht funktionalisierten Membran kann die mit NTA₄cyclen funktionalisierte Oberfläche reversibel Nickel koordinieren.

Nach der Funktionalisierung der PG-Oberfläche mit NTA₄Cyclen ist ein neues Kohlenstoffsignal bei 288.7 eV zu erkennen, welches aus den vier Amid-Gruppen resultiert. Außerdem ist eine Zunahme des Carbonylkohlenstoffsignals bei 289.6 eV

ersichtlich. Ausschlaggebend für eine erfolgreiche Funktionalisierung ist das starke Stickstoffsignal bei 401.0 eV, welches dem Amid-Stickstoff und dem tertiären Amin zugeordnet werden kann. Ein kleines Stickstoffsignal bei 402.4 eV wird durch protonierten Stickstoff erzeugt. Eine Anbindung des NTA₄Cyclens wurde somit auch mittels XPS nachgewiesen.

Durch die erfolgreiche Anbindung des NTA₄Cyclen sollte auch das Beladen der Oberfläche mit Nickelionen möglich sein. Hierzu wurde die Oberfläche in einer Nickelsulfatlösung inkubiert. Die Koordination des Nickelions führt zu einer leichten Verschiebung des Stickstoffsignals zu höheren Energien (siehe Abbildung 65, c/d) und es tritt ein Ni 2p-Signal im Spektrum auf. Durch Waschen der Oberfläche mit einer wässrigen EDTA-Lösung kann das Nickelion wieder aus dem Komplex entfernt werden. Anschließend ist ein erneutes Beladen der Oberfläche möglich (siehe Abbildung 66, b). Eine nur mit PG-beschichtete CNM bindet in keinem Fall Nickel (siehe Abbildung 66, a). Mittels XPS konnte somit gezeigt werden, dass die mit den NTA₄Cyclen funktionalisierten Oberflächen reversibel Nickel koordinieren.

3.5.3.3. Proteinnanbindung an die mit NTA₄Cyclen-funktionalisierten PG-Oberflächen

Die mit Nickel beladenen NTA-Einheiten auf der Oberfläche sollten His-Tag markierte Proteine selektiv binden, weswegen deren Anbindung mittels SPR-Spektroskopie untersucht wurde.

Das Experiment wurde in HEPES-Puffer durchgeführt. Zunächst wurden die NTA-Gruppen an der Oberfläche mit Nickelionen beladen. Anschließend wurde BSA (1 mg/mL) über die Oberfläche geleitet, um die unspezifische Bindung von Proteinen zu untersuchen. Der dauerhafte Anstieg nach der Injektion zeigt, dass BSA an der Oberfläche gebunden hat. Dies ist nicht verwunderlich, da viele Aminosäuren eine gewisse Affinität zu Nickelionen aufweisen. In der Affinitätschromatographie wird aus diesem Grund häufig eine geringe Menge an Imidazol hinzugesetzt oder bei hohen Salzkonzentrationen gearbeitet.⁹² Bei der anschließenden Exposition zu ⁸His-GFP (1 mg/mL) bindet jedoch deutlich mehr Protein an der Oberfläche, was durch die größere

Affinität des ^8His -GFP zu dem Ni-NTA-Komplex erklärt werden kann. Außerdem sollte das His-Tag markierte Protein schwach gebundenes BSA aus dem Komplex verdrängen.

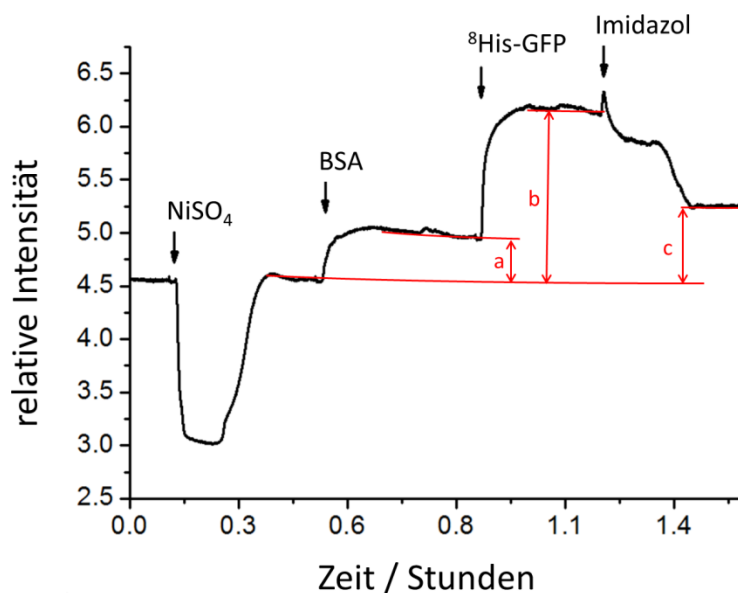


Abbildung 67: SPR-Messung einer mit NTA₄Cyclen funktionalisierten PG-CNM-Oberfläche: Zunächst erfolgte die Beladung der Oberfläche mit Nickelionen durch Injektion einer 0.1%igen NiSO₄ Lösung in HEPES-Puffer. Anschließend wurde BSA (1 mg/mL) über die Oberfläche gespült, wobei etwas Protein unspezifisch gebunden wird (a). Die anschließende Injektion von ^8His -GFP (1 mg/mL) führt jedoch zu einer deutlich stärkeren Bindung des Proteins an die Oberfläche (b). Mit Imidazol (100 mM) kann ein Teil des ^8His -GFP von der Oberfläche gelöst werden. Es verbleiben etwa 40 % der Proteine BSA oder ^8His -GFP auf der Oberfläche (c).

Vergleicht man die Größe der beiden Proteine, stellt man zudem fest, dass die Anlagerung eines BSA-Moleküls zu einer deutlich größeren Signaländerung, verglichen mit einem GFP-Molekül führen sollte. BSA kann als Rotationsellipsoid mit einer Größe von 4 nm x 4 nm x 14 nm betrachtet werden,¹⁷² wohingegen GFP nur etwa 3 nm x 3 nm x 4 nm,¹⁶⁸ also nur etwa ein Viertel so groß ist. Anschließend erfolgte die Injektion von Imidazol (100 mM). Dies führte zu einem direkten Abfall des Signals. Imidazol löst spezifisch Proteine aus dem His-Tag-Ni-NTA-Komplex, weswegen davon auszugehen ist, dass vornehmlich ^8His -GFP von der Oberfläche entfernt wurde. Außerdem sollte ^8His -GFP, das BSA, welches möglicherweise zuvor an den Ni-NTA-Komplex gebunden hat, aus dem Komplex verdrängt haben. So wurden mindestens 60 % des angebondenen ^8His -GFP aus dem Komplex gelöst. Dies zeigt, dass die Anbindung zumindest eines Teils des ^8His -GFP spezifisch über den His-Tag erfolgte. Unter Umständen kam es jedoch zur

unspezifischen Adsorption an defekten Stellen in der PG-Schicht durch BSA oder ^8His -GFP, weswegen das Signal nicht wieder auf dieselbe Höhe wie vor der Injektion der beiden Proteine abfällt.

3.5.3.4. TEM-Untersuchungen der mit NTA₄Cyclen funktionalisierten PG-CNM

Die zuvor mittels SPR-Spektroskopie gezeigte Eigenschaft der präferierten Anbindung His-Tag markierter Proteine an die mit NTA₄Cyclen funktionalisierten PG-CNM sollte im TEM-Experiment gezeigt werden. Hierzu wurde eine eins-zu-eins-Mischung der Testproteine Komplex I (mit His-Tag) und GroEL (ohne His-Tag) verwendet. Die Diskriminierung der Proteine aufgrund des His-Tags soll Aufschluss über die Funktionalität der Membran im TEM-Experiment geben.

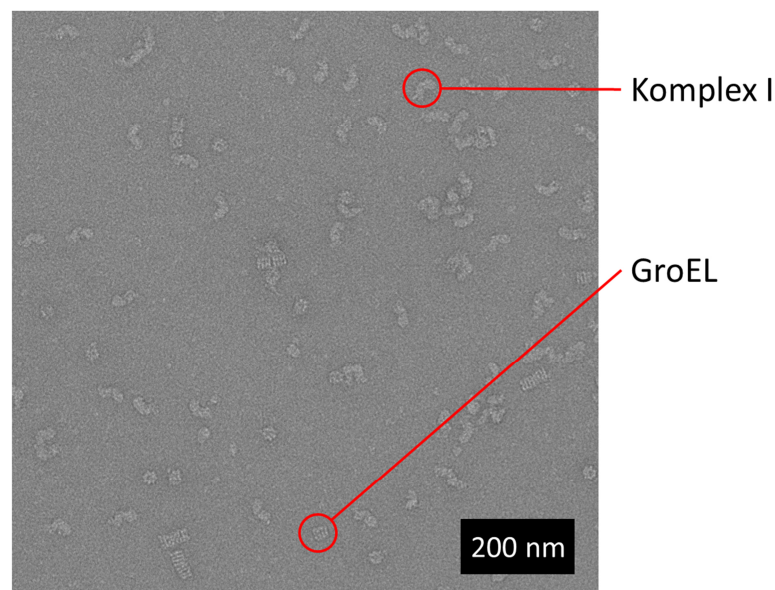


Abbildung 68: Eins-zu-eins-Mischung von Komplex I (L-förmig, mit His-Tag) und GroEL (rund, ohne His-Tag) in Negativkontrastierung (mit Uranylacetat) auf einem kontinuierlichen Kohlenstofffilm.

Zunächst wurde eine Probe mit Negativkontrastierung bei Raumtemperatur als Kontrolle auf einen kontinuierlichen Kohlenstofffilm präpariert. In den TEM-Aufnahmen sind beide Proteine gut erkennbar (siehe Abbildung 68). Anschließend wurden analog mit NTA₄-

Cyclen funktionalisierte und mit Nickelionen aktivierte PG-CNMs zur Probenpräparation verwendet (siehe Abbildung 69). Neben den Proteinen ist hier eine Vielzahl an verschieden großen, runden, hellen Bereichen zu erkennen, die nicht den Proteinen zugeordnet werden können. Da diese auf dem kontinuierlichen Kohlenstofffilm nicht zu erkennen waren, müssen diese von der Membran oder der Membran in Verbindung mit der Negativkontrastierung mit Uranylacetat herrühren. Ein Grund für das Auftreten der Bereiche wurde nicht gefunden, in jedem Fall führen sie jedoch dazu, dass eine quantitative Auswertung der Proteinverteilung aus den erhaltenen TEM-Aufnahmen auf diesem Weg nicht möglich ist.

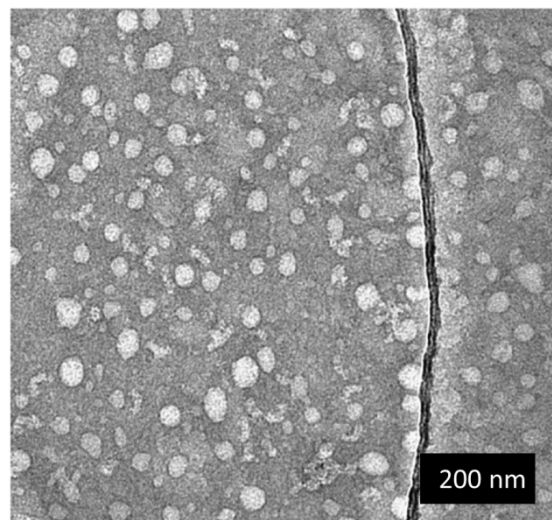


Abbildung 69: Eins-zu-eins-Mischung von Komplex I und GroEL in Negativkontrastierung (mit Uranylacetat) auf einer mit NTA₄Cyclen funktionalisierten und mit Nickelionen aktivierten PG-CNM. Vermutlich erscheint die Membran aufgrund der Negativkontrastierung fleckig. Eine Auswertung der Verteilung der Proteine auf den erhaltenen Aufnahmen ist nicht möglich.

Da in dem vorherigen Experiment vermutet wurde, dass die Negativkontrastierung in Kombination mit der Membran problematisch ist, wurden Kryo-Proben präpariert, wodurch auf eine Negativkontrastierung verzichtet werden kann. Auch hier war ein erhöhter Hintergrund festzustellen, wodurch die Proteine nur schwer zu erkennen sind (siehe Abbildung 70). Allerdings ist in diesem Fall eine Auswertung der Proteinverteilung durch ein computerunterstütztes Verfahren möglich. Die Partikel wurden auf 73 Aufnahmen mit einem halbautomatisierten Verfahren anhand der bekannten 2D-Klassen der Proteine mithilfe des Programms „RELION“ analysiert. Bilder von Partikeln, welche

keiner der 2D-Klassen der Proteine zugeordnet werden konnten, wurden verworfen. Die Analyse der TEM-Daten ergab im Durchschnitt über die 73 ausgewerteten Bilder, dass pro Bild etwa 16 Partikel Komplex I und weniger als ein Partikel GroEL gefunden wurden. Das Experiment zeigt eine deutliche Anreicherung des Komplex I um das 27-fache gegenüber GroEL. Die dreidimensionale Struktur des Proteins konnte aus 1786 Partikeln mit einer Auflösung von 17.8 Å berechnen werden (Abbildung 70, D). Anhand der Daten gibt es keinen Hinweis für eine Vorzugsorientierung der Proteine auf der funktionalisierten Nanomembran.

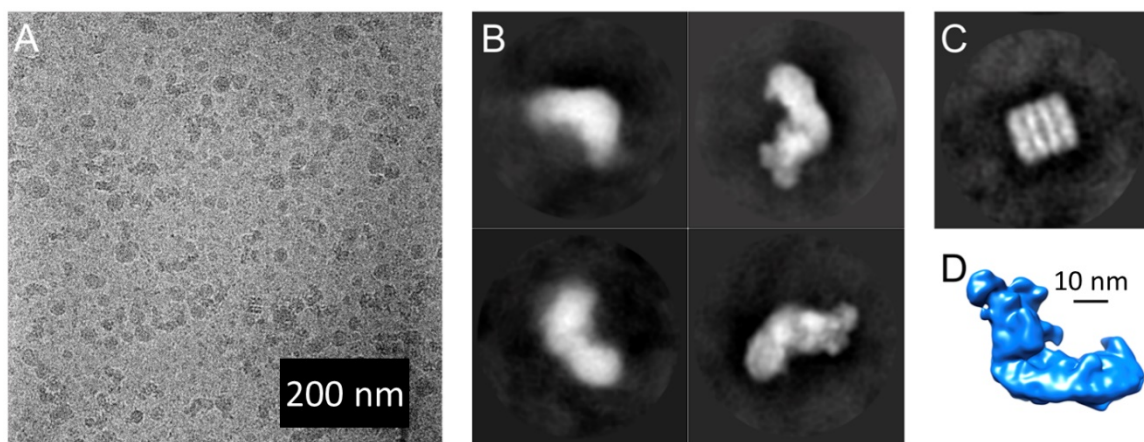


Abbildung 70: A) Kryo-TEM Aufnahme einer NTA₄Cyclen-funktionalisierten und mit Nickelionen aktivierten PG-CNM nach Exposition zu einer eins-zu-eins-Mischung von His-Tag markiertem Komplex I und GroEL (ohne His-Tag): Aufgrund eines starken Hintergrundes sind die Proteine nur schwer zu erkennen. Eine computerunterstützte Analyse ermöglicht eine Auswertung der Verteilung der Proteine auf den Aufnahmen. Das Ergebnis zeigt, dass deutlich mehr Komplex I (mit His-Tag) als GroEL (ohne His-Tag) auf der Membran fixiert wurde. B) Repräsentative 2D-Klassen des Komplex I aus der computerunterstützten Auswertung. C) Repräsentative 2D-Klasse von GroEL. D) 3D-Dichteverteilung des Komplex I.

Die Daten aus dem TEM-Experiment decken sich mit den Ergebnissen aus dem SPR-Experiment. Die mit PG und NTA₄Cyclen funktionalisierten Membranen ermöglichen eine deutliche bevorzugte Anlagerung His-Tag markierter Proteine an die Membranen, auch wenn das Auftreten anderer Biomoleküle nicht vollständig unterdrückt werden kann. In jedem Fall können die Membranen Anwendung in der Probenpräparation von Proteinen finden, welche nicht oder nur unter sehr großem Aufwand in der notwendigen hohen Reinheit erhalten werden können. Außerdem führt die gleichmäßige Funktionalisierung der PG-Schicht mit NTA₄Cyclen auch zu einer homogenen Verteilung der Proteine auf der Membran.

3.5.4. Schlussfolgerungen

In diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass amino-terminierte CNMs durch Erhitzen in reinem, frisch destilliertem Glycidol mit einer Nanometer dicken PG-Schicht biorepulsiv funktionalisiert werden können. Ein in Anlehnung an die Beschichtung oxidischer Oberflächen untersuchtes Beschichtungsverfahren,⁶⁶ welches eine 10%ige Lösung von Glycidol in absolutem NMP vorsieht, hat sich für die Funktionalisierung von CNMs aufgrund langer Reaktionszeiten und damit einhergehend einer starken Oxidation des Polymers nicht bewährt. Die Verwendung reinen, frisch destillierten Glycidols zur Beschichtung ermöglicht die Herstellung von PG-Schichten auf Amino-terminierten CNMs mit einer Dicke > 6 nm in zwei bis drei Stunden Reaktionszeit bei $140\text{ }^{\circ}\text{C}$, welche eine ausreichende Biorepulsivität aufweisen.

Die Untersuchung der spezifischen Anbindung von His-Tag markierten Proteinen an eine biorepulsive PG-Schicht über an diese angebundenes EDTA oder NTA_4 -Cyclen zeigte, dass sich immobilisiertes EDTA nicht zur Anbindung von His-Tag-markierten Proteinen eignet. EDTA und NTA_4 -Cyclen konnten jeweils über eine ihrer Säuregruppen an die PG-Oberfläche angebunden werden. Zwar konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die mit EDTA als auch NTA_4 -Cyclen-funktionalisierten Oberflächen zur Immobilisierung von Nickelionen eignen, jedoch zeigten SPR-spektroskopische Untersuchungen, dass der EDTA-Nickel-Komplex His-Tag Proteine nicht mit ausreichender Affinität bindet.

Hieraus entstand die Hypothese, dass lokal mehrere Nickel-Ionen mit freien Koordinationsstellen für die ausreichend starke Bindung His-Tag markierter Proteine benötigt werden. Sowohl SPR-spektroskopisch als auch im Kryo-TEM-Experiment konnte gezeigt werden, dass eine mit PG beschichtete und mit NTA_4 -Cyclen funktionalisierte CNMs selektiv His-Tag markierte Proteine bindet. Das Kryo-TEM-Experiment zeigte, dass eine derartig funktionalisierte CNMs das His-Tag markierte Protein 27-fach aus einer 1:1-Mischung eines His-Tag markierten und eines unmarkierten Proteins anreichert.

Die aus dem Kryo-TEM-Experiment erhaltenen mikroskopischen Aufnahmen erlaubten die Berechnung der dreidimensionalen Struktur des His-Tag markierten Proteins.

3.5.5. Experimentelles

Materialien

Silicium(100)-Wafer (Wacker Chemie AG) und TXRF-Träger aus poliertem Quarzglas (Bruker Corporation) wurden mit Aluminium bedampft (Aufdampftrate 1.5 – 2.5 Å/s; Pfeiffer Vacuum Classic 50), bis eine Schichtdicke von 200 nm erreicht war.

Kommerziell erworbene Lösungsmittel wurden destillativ aufgereinigt. *N*-Methylpyrrolidon (NMP) und *N,N*-Dimethylformamid (DMF) wurden über Calciumhydrid getrocknet, dekantiert und anschließend destilliert. Glycidol wurde durch fraktionierte Destillation (12 - 13 mbar; 50 - 55 °C) von Wasser und Verunreinigungen befreit.

Die für die Proteintests verwendeten Proteine wurden bei Sigma-Aldrich erworben. Die Proteine wurden in PBS (pH = 7.4) gelöst (1 mg/mL). Die zehnfach konzentrierte PBS-Lösung wurde aus 80.0 g NaCl, 2.0 g KCl, 14.4 g Na₂HPO₄ · H₂O und 2.4 g KH₂PO₄ in 1 L Millipore-Wasser angesetzt und für die Anwendung jeweils mit der neunfachen Menge Millipore-Wasser verdünnt.

Die Nickelsulfat-Lösung wurde mit Ni(II)SO₄ (0.1 Gew.-%) in Millipore-Wasser angesetzt.

Ellipsometrie

Zur Bestimmung von Schichtdicken sowie Substratparametern von Gold wurden Ellipsometrie-Messungen an einem Sentech Ellipsometer (SE400) durchgeführt. Der Laserstrahl mit der Wellenlänge 632.8 nm fiel unter einem Winkel von 70° auf die Probe. Folgende Parameter wurden für die Bestimmung der Schichtdicken verwendet: Aluminium: $n = 1.490$, $k = 7.340$; Aluminiumoxid: $n = 1.620$, $k = 0.000$; Aliphatische organische Schichten: $n = 1.450$, $k = 0.000$; Proteine: $n = 1.450$, $k = 0.000$.

IRRAS

IRRAS-Messungen wurden an einem Nicolet 6700 FT-IR-Spektrometer aufgenommen. Es wurde ein MCT-Detektor verwendet. Der Innenraum des Spektrometers wurde mit trockener und CO₂-freier Luft gespült. Für jedes abgebildete Spektrum wurden zwei

Spektren mit jeweils 256 Scans aufgenommen und die beiden so gewonnenen Spektren anschließend gemittelt.

SPR

Es wurde ein Multiskop der Firma Optrel verwendet. Als Lichtquelle diente ein Dioden-Laser mit einer Wellenlänge von 785 nm (Thorlabs, S1FC785). Es wurde ein 60°-Prisma (Edmund Optics) aus Flint-Glas ($n = 1.785$) verwendet. Als Immersionsflüssigkeit diente 1,2-Diiodbenzol ($n = 1.718$).

Die verwendete Flusszelle wurde aus PDMS gefertigt. Ihre Herstellung erfolgt über Polymerisation von Dimethylsiloxan in einer Petrischale mit Hilfe einer Edelstahlgussform. Das Gemisch aus 10 Teilen PDMS-Präpolymer (SYLGARD® 184 Silicone Elastomer, Dow Corning Corp.) und 1 Teil Vernetzer (SYLGARD® 184 curing agent, Dow Corning Corp.) wurde bei 65 °C über mehrere Stunden ausgehärtet. Die Zelle wurde zugeschnitten und anschließend über Nacht in Ethanol gereinigt.

Die Messungen wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 6 mL/h durchgeführt. Zu Beginn jedes Anbindungstests wurde mit dem jeweiligen Lösemittel äquilibriert. Die Inkubation mit der Proteinlösung (1 mg/mL) erfolgte durch Injektion der Proteinlösung (1 mL) mittels einer Injektionsschleife (Rheodyne Valve 7125 Injector). Anschließend wurde die Oberfläche mit Phosphatpuffer gespült, bis keine Änderung in der Intensität des aufgenommenen Signals mehr zu erkennen war.

Beschichtung von Aluminium mit PG

Mit Aluminium bedampfte Silicium-Wafer, in 1 x 2 cm große Stücke gebrochen, oder TXRF-Träger wurden zur Beschichtung verwendet. Die Substrate wurden im Sauerstoff-Plasma (0.4 – 0.6 mbar, 2 min) gereinigt. Die Dicke der Aluminiumoxid-Schicht wurde mittels Ellipsometrie bestimmt. Anschließend wurden die Substrate unter Argon in PTFE-Schraubgefäßen mit einer Lösung von absolutem Glycidol in absolutem NMP (10 Gew.-%) bedeckt und auf 140 °C für 6 Stunden geheizt. Nach beendeter Reaktion wurden die Substrate im geschlossenen PTFE-Gefäß auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Millipore-Wasser gespült, für 10 min im Ultraschallbad behandelt und im Stickstoffstrom getrocknet.

EDTA-Funktionalisierung

Mit Polyglycerol beschichtete Substrate wurden in Lösungen von EDTA-Monoanhydrid in absolutem DMF mit den Konzentrationen 0.01 %; 0.005 %; 0.0025 %, 0.001 %, 0.0005 % und 1 % unter Argon für eine Stunde bei 90 °C erhitzt. Anschließend wurden die Substrate mit Ethanol gespült, in Millipore-Wasser im Ultraschallbad für 10 Minuten behandelt und im Stickstoff-Strom getrocknet.

Spezifische und unspezifische Protein-Adsorptionstests mittels Ellipsometrie

Es wurden Protein-Adsorptionstests an mit Nickelionen beladenen sowie Nickel-freien Substraten durchgeführt. Zum Beladen der entsprechenden Substrate mit Nickel wurden diese in einer 0.1%igen Nickelsulfat-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur eingelegt, mit Millipore-Wasser gespült und im Stickstoff-Strom getrocknet.

Zur Untersuchung der Proteinadsorption wurden die Substrate in 30 mL PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Spülen mit Millipore-Wasser und Trocknen im Stickstoff-Strom wurde die gemeinsame Dicke der organischen Schicht aus Polyglycerol und EDTA bestimmt. Die Substrate wurden in den jeweiligen Proteinlösungen in PBS (1 mg/mL) für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Dicke der organischen Schicht wurde nochmals mittels Ellipsometrie bestimmt und die Differenz zur vorherigen Messung errechnet.

Veröffentlichung

Die Ergebnisse des Kapitels 3.5 werden kurzfristig veröffentlicht. Weitere Informationen und experimentelle Details können der Veröffentlichung bzw. der zugehörigen *supporting information* entnommen werden.

4. Bearbeitete Projekte: Mehrkomponenten Strukturierung von Kohlenstoffnanomembranen mittels Laserablation

Neben der Herstellung homogen funktionalisierter, kontinuierlicher Nanomembranen sind ebenfalls strukturierte Membranen von Interesse, da sie zweidimensionale Anordnungen von Biomolekülen auf dem Trägerfilm ermöglichen.^{173–175} Die Gesamtheit der Biomoleküle kann beispielsweise als Modell für eine Zellmembran oder Zelloberfläche dienen.

Kohlenstoffnanomembranen, welche durch die Quervernetzung von SAMs erhalten werden, eignen sich als Trägerfilm für derartige Anordnungen von Biomolekülen.¹⁷⁵ Für die Strukturierung von SAMs ist eine Vielzahl an Methoden beschrieben.^{176–181} Die direkte Laserstrukturierung (engl. *direct laser patterning*, DLP) ermöglicht die effiziente Herstellung Zentimeter großer Flächen mit Strukturen im Mikrometerbereich.^{178,179,181}

Im Rahmen dieses Projekts wurden SAMs mittels DLP strukturiert und anschließend durch Bestrahlung mit Elektronen quervernetzt. Hierdurch werden Membranen erhalten, die Muster aufweisen, in denen die chemischen und physikalischen Eigenschaften variieren. Die strukturierten Membranen konnten anschließend auf verschiedene Substrate transferiert werden.

4.1. Herstellung strukturierter CNMs mittels DLP

Die Herstellung der strukturierten CNMs ist schematisch in Abbildung 71 dargestellt. Für die Herstellung der Oberflächen wird zunächst ein SAM auf einer Goldoberfläche abgeschieden. Anschließend wird mithilfe eines hochenergetischen, gepulsten Laserstrahls (6 ns Puls, 50 kHz Pulsrate) die Oberfläche entlang eines Musters abgefahren. Der Laser besitzt eine Wellenlänge von 532 nm, welche primär nicht von den Molekülen der SAM absorbiert wird. Stattdessen wird die Energie des Lasers von der Goldoberfläche absorbiert, wodurch sich diese aufheizt. Dies führt zur lokalen Desorption der SAM-bildenden Moleküle von der Goldoberfläche, wodurch ein Freiraummuster, eingegrenzt von den Molekülen der SAM, entsteht.

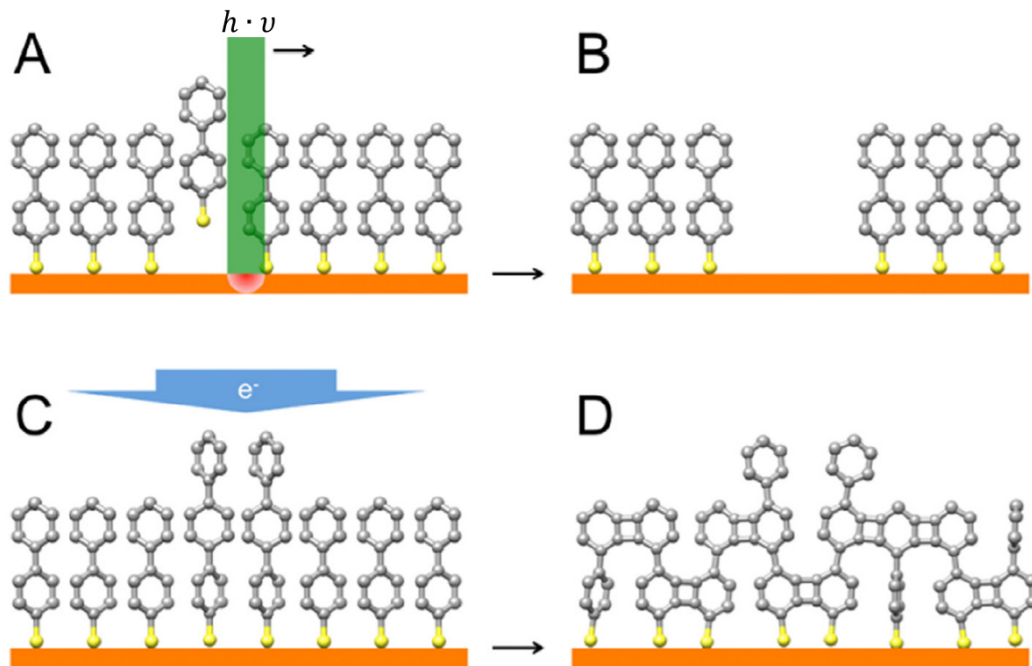


Abbildung 71: Herstellung einer strukturierten CNM mittels DLP: Mithilfe eines gepulsten Laserstrahls werden Moleküle entlang eines Muster thermisch von der Oberfläche desorbiert (A). Daraus resultieren Lücken im SAM, welche anschließend mit einem anderen SAM-bildenden Molekül aufgefüllt werden können (B). Die strukturierte SAM wird abschließend mit Elektronen bestrahlt (C). Hierdurch quervernetzen die einzelnen aromatischen Moleküle und es entsteht eine strukturierte Nanomembran (D).²⁸

Das Freiraummuster kann anschließend mit einem weiteren SAM-bildenden Molekül aufgefüllt werden. Abschließend wird die erhaltene SAM durch Elektronenbestrahlung quervernetzt, um eine Nanomembran zu erhalten. Die strukturierte SAM muss sich im letzten Schritt durch Bestrahlung mit Elektronen zu einer CNM quervernetzen lassen, weswegen prinzipiell nur aromatische Moleküle verwendet werden können.²⁷ Durch die Quervernetzung können auch weitere Veränderungen der Moleküle induziert werden. Die Bestrahlung einer NBPT-SAM führt beispielsweise zu einer Reduktion von Nitrogruppen zu Aminogruppen (siehe Abbildung 5).¹⁸²

Für die Herstellung der CNMs wurden 1,1-Biphenyl-4-thiol (BPT), [1'',4',1',1]-Terphenyl-4-thiol (TPT), Naphthalen-2-thiol (NPT) und 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol (NBPT)¹⁸³ verwendet (siehe Abbildung 72).

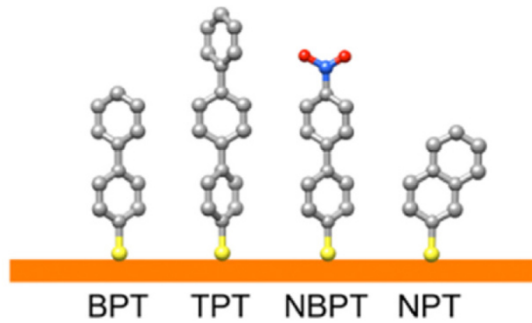


Abbildung 72: Zum Aufbau der strukturierten CNMs verwendete Moleküle: 1,1'-Biphenyl-4-thiol (BPT), [1'',4',1',1]-Terphenyl-4-thiol (TPT), Naphthalen-2-thiol (NPT) und 4'-Nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol (NBPT).²⁸

Mehrmaliges Laserstrukturieren gefolgt von Einlegen in Lösungen verschiedener SAM-bildender Moleküle, ermöglicht den Einbau mehrerer Funktionalitäten in die Membran. Abschließend erfolgt die Bestrahlung der Oberfläche mit Elektronen, wodurch die einzelnen Moleküle vernetzt und eine CNM gebildet wird. Diese kann von dem Gold abgelöst und auf ein beliebiges Substrat übertragen werden.

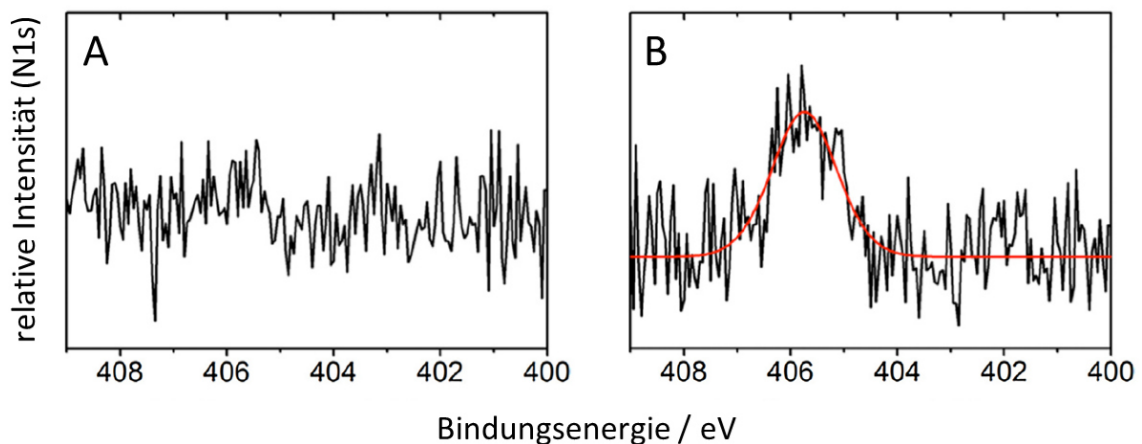


Abbildung 73: Austausch einer BPT-SAM durch NBPT-Moleküle: Wird eine unbehandelte BPT-SAM in eine Lösung von NBPT gelegt, ist im XP-Spektrum kein N 1s Signal zu erkennen, es erfolgt demnach kein Austausch (A). Wurden die BPT-SAM dahingegen mittels DLS behandelt, ist ein deutliches Stickstoffsignal durch den Einbau von NBPT zu erkennen.²⁸

Um zu zeigen, dass ein Austausch ausschließlich nach einer Behandlung der SAM mittels DLS abläuft, wurden eine zuvor strukturierte und eine unbehandelte BPT-SAM in eine NBPT Lösung eingelegt und anschließend mit XPS charakterisiert (siehe Abbildung 73).

Im XPS-Spektrum der unbehandelten BPT-SAM ist nach dem Einlegen in eine NBPT-Lösung kein Stickstoffsignal zu erkennen. Folglich wird kein NBPT in die Monolage eingebaut. Im Gegensatz dazu erscheint bei der strukturierten BPT-SAM ein deutliches Stickstoffsignal, was dafür spricht, dass NBPT-Moleküle die Freiräume in der Monolage gefüllt haben. Demnach findet ein Austausch von Molekülen an der Oberfläche mit denen in Lösung unter den Bedingungen, welche zum Befüllen des Freiraumusters mit einem SAM-bildenden Molekül angewendet werden, nicht statt.

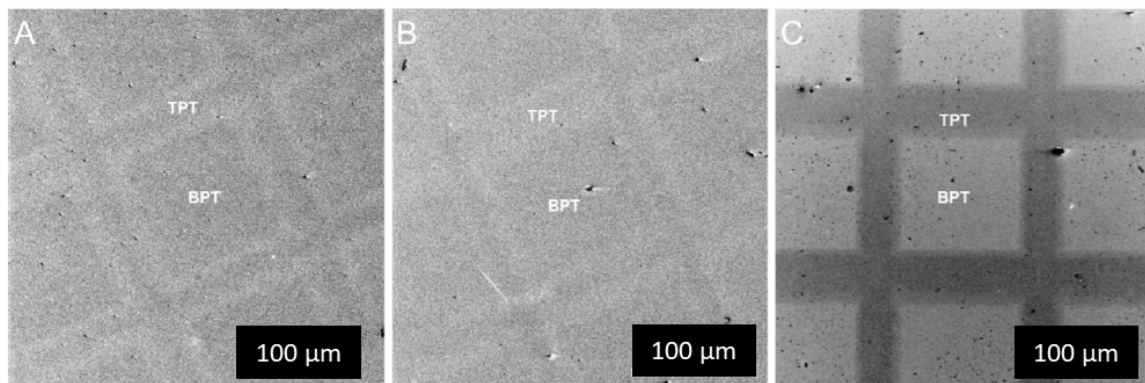


Abbildung 74: REM und HIM-mikroskopische Aufnahmen einer strukturierten SAM und CNM: HIM-Aufnahme einer SAM (A) und der daraus durch Elektronenbestrahlung hergestellten CNM (B). SEM-Aufnahme der CNM (C).²⁸

Helium-Ionen-Mikroskopie (HIM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) eignen sich zur Untersuchung von strukturierten SAMs.^{184–188} Die hergestellten SAMs und CNMs wurden mittels REM und HIM untersucht (siehe Abbildung 74). In der HIM Aufnahme der strukturierten SAM sind die hellen und dunklen Bereiche, welche den verschiedenen Molekülen (BPT, TPT) zugeordnet werden können, gut zu erkennen. Die Aufnahme der daraus hergestellten CNM zeigt, dass auch hier die Struktur erhalten geblieben ist. Auch in der REM Aufnahme führen die unterschiedlichen Kettenlängen der Moleküle zu einem Kontrast und sind gut zu erkennen. Um zu zeigen, dass der Kontrast nicht auf einer Veränderung der Goldoberfläche durch das DLP beruht, wurden die Membranen auf andere Substrate transferiert und erneut mikroskopiert (siehe Abbildung 75). Bei dem Transfer auf eine Goldoberfläche ist in einer lichtmikroskopischen Aufnahme die unterschiedliche Benetzung der strukturierten Bereiche mit Wasser zu erkennen. Die Nitrogruppen der mit NBPT-funktionalisierten Bereiche werden zu Aminogruppen

reduziert und sind somit hydrophil. Die vernetzten BPT-Bereiche verhalten sich hydrophob. Auch in HIM und TEM-Aufnahmen sind die Strukturen nach dem Transfer auf Siliziumsubstrate gut zu erkennen.

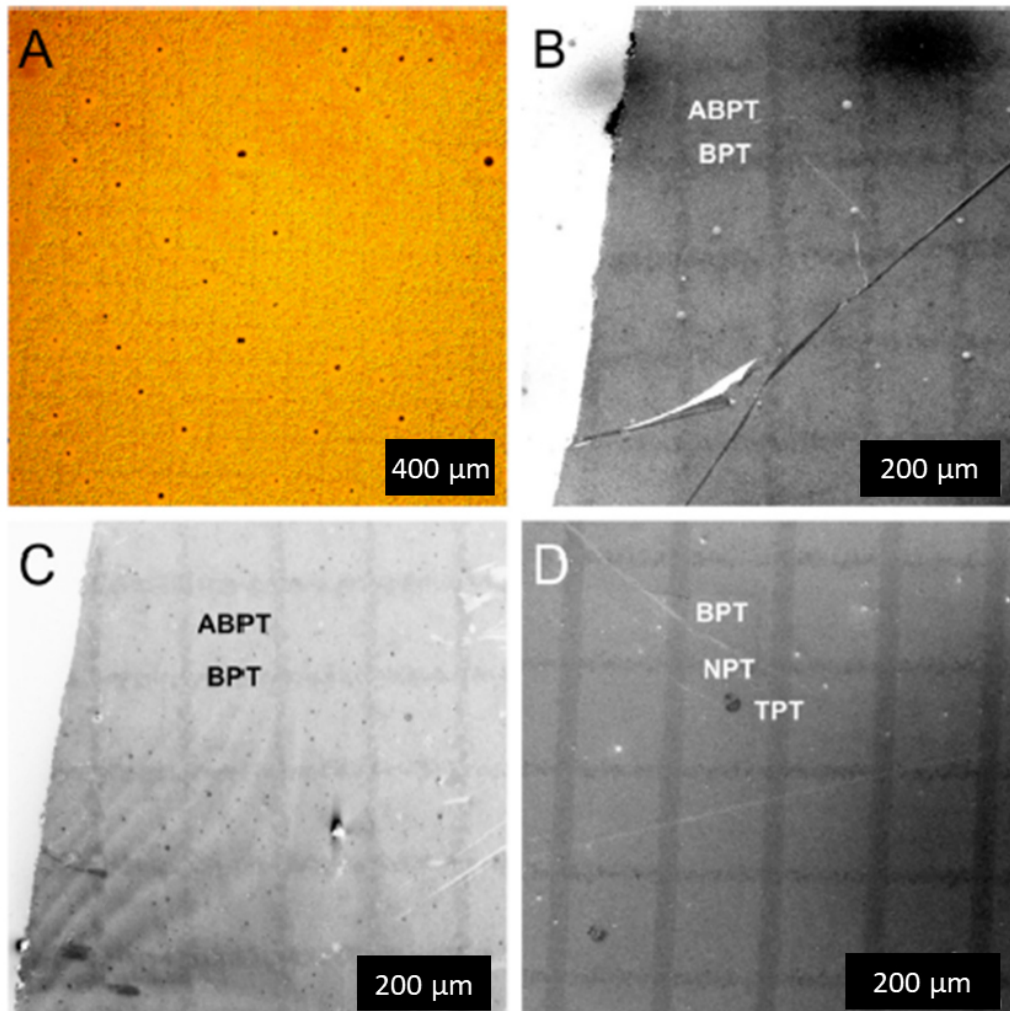


Abbildung 75: Strukturierte CNMs nach dem Transfer auf verschiedene Substrate: Die in A-C gezeigte Membran wurde durch die Vernetzung einer NBPT-SAM, welche mit BPT strukturiert wurde, hergestellt. Durch die Quervernetzung wird die Nitrogruppe von NBPT zu einer Aminogruppe reduziert (ABPT). Auf einem Goldsubstrat ist die Strukturierung durch eine unterschiedliche Benetzung der Oberfläche mit Wasser sichtbar (A). SEM (B) und HIM (C) Aufnahme der strukturierten CNM. Transferierte CNMs, welche durch die Quervernetzung einer SAM erhalten wurde, welche mit drei verschiedenen SAM-bildenden Molekülen strukturiert wurde.²⁸

Eine mehrfach strukturierte CNM ist in Abbildung 75, d) gezeigt. Hier wurden eine BPT, NPT, TPT strukturierte SAM durch mehrfache DLS und anschließendem Austausch mit dem SAM-Bildner hergestellt. Die abschließende Quervernetzung führt zu einer mehrfach

strukturierten Membran. Dies zeigt die vielfachen Variationsmöglichkeiten, welche durch die Strukturierung von Nanomembranen mittels DLS möglich sind.

4.2. Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieses Projektes konnte gezeigt werden, dass mit DLP strukturierte SAMs zur Herstellung strukturierter CNMs verwendet werden können. Die nach der Laserstrukturierung und dem anschließenden Auffüllen der bestrahlten Bereiche mit geeigneten SAM-bildenden Molekülen erhaltene SAM kann durch Bestrahlung mit Elektronen quervernetzt werden. Die nach der Elektronenbestrahlung erhaltenen strukturierten Nanomembranen können auf verschiedene Substrate transferiert werden. Die hergestellten Strukturen können mittels Lichtmikroskopie, SEM und HIM charakterisiert werden. Die Methode ermöglicht die Herstellung von beliebig strukturierten CNMs mit biologisch relevanten zentimetergroßen Bereichen mit Mikrometerstrukturen. Das entwickelte Verfahren soll als Grundlage für die zukünftige Entwicklung einfacher Modellmembranen zur Nachahmung biologischer Systeme dienen.

Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieses Projektes wurden veröffentlicht. Weitere Informationen und experimentelle Details können der Veröffentlichung entnommen werden:

Multicomponent patterned ultrathin carbon nanomembranes by laser ablation

Natalie Frese, Julian Scherr, André Beyer, Andreas Terfort, Armin Gölzhäuser, Norbert Hampp, Daniel Rhinow

Applied Surface Science **2018**, 427, 126-130

DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.07.303

Reprinted/adapted with permission from

Multicomponent patterned ultrathin carbon nanomembranes by laser ablation

Natalie Frese, Julian Scherr, André Beyer, Andreas Terfort, Armin Gölzhäuser, Norbert Hampp, Daniel Rhinow

Applied Surface Science **2018**, 427, 126-130

DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.07.303

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

5. Bearbeitete Projekte: DMAP-vermittelte Ligationsstrategie zur Modifizierung des bakteriellen Lektins FimH

Zum Verständnis biologischer Prozesse sind Substrat-Protein-Interaktionen wichtig, wofür die Kenntnis der Struktur von Proteinen, insbesondere deren Bindungstaschen, von Bedeutung ist. Die Oberfläche eukaryotischer Zellen exponiert in das umgebende Medium Kohlenhydrate, deren Gesamtheit als Glykokalyx bezeichnet wird. Primäre Interaktionen von Bakterien mit eukaryontischen Zellen verlaufen meist über die Adhäsion von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen, sogenannten Lektinen, an die Kohlenhydrat-oberfläche. Außerdem werden diverse Interaktionen von Bakterien untereinander durch Wechselwirkungen der Glykokalyx mit Lektinen reguliert.^{189,190}

Die Oberfläche eines Bakteriums ist dicht besetzt mit länglichen Organellen, sogenannten Fimbrien. Typ-1-Fimbrien sind Organelle, welche von *E.coli* und anderen Enterobakterien gebildet werden. Typ-1-Fimbrien sind aus einer Vielzahl verschiedener Proteine, den Fim-Proteinen, aufgebaut. Hauptsächlich bestehen die länglichen Fimbrien, an deren Spitze das Lektin FimH sitzt, aus FimA-Untereinheiten. FimH besteht aus 279 Aminosäuren und ist für die Erkennung von Kohlenhydraten von Bedeutung, da es spezifisch α -D-Mannoside bindet. Bei den uropathogenen *E.coli* Bakterien wurde gezeigt, dass die Bindung von FimH an Mannose-Oligosaccharide eine entscheidende Rolle in der Besiedelung von Blasengewebe und bei der Entstehung von Krankheiten spielt.^{191,192}

Ein Verständnis der Faktoren für die spezifische bakterielle Adhäsion ist gerade in Zeiten von multiresistenten Keimen wichtig, um neue Strategien für die Bekämpfung bakterieller Infektionen zu entwickeln.

5.1. Untersuchung der DMAP-vermittelten Ligation anhand einer FimH Modelloberfläche

Die Arbeitsgruppe Lindhorst (Universität Kiel) verwendet das Lektin FimH als Modellsystem zur Untersuchung bakterieller Adhäsion. Ein Aspekt, der untersucht wird, ist die selektive Markierung einer α -D-Mannosid-Bindungstasche mit einem

Photoschalter. Hierdurch soll es möglich sein, die Bindung von Mannosiden an FimH photochemisch zu kontrollieren. Für die Untersuchung der *N,N*-Dimethylaminopyridin(DMAP)-vermittelten Ligationstrategie zur Markierung des FimH wurde ein Modellsystem für die Proteinoberfläche gesucht.

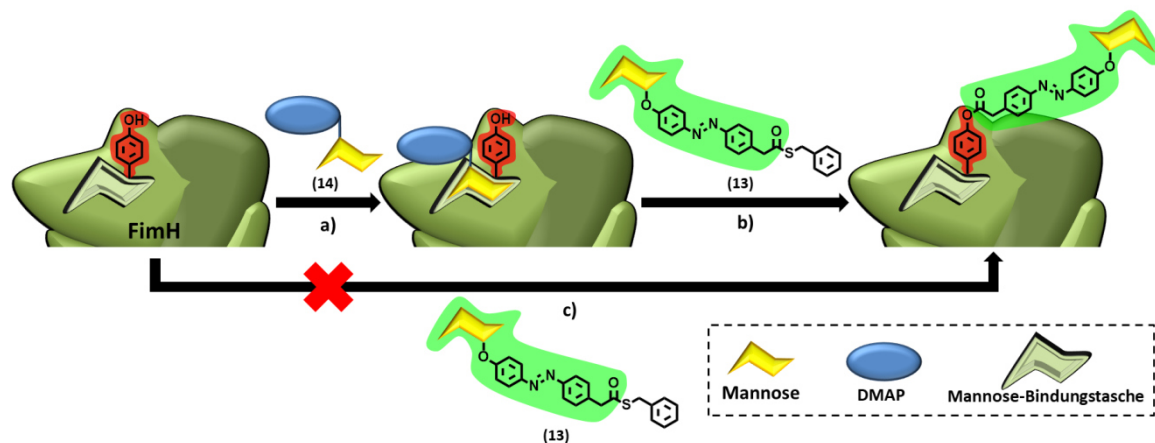


Abbildung 76: Schematische Darstellung der DMAP-vermittelten Ligationstrategie zur Markierung der Mannose-Bindungstasche des FimH mit einem Azobenzol-Photoschalter. Zur Markierung einer Tyrosin-Seitenkette (rot) in der Nähe der Bindungstasche soll eine DMAP-vermittelte Ligationstrategie verwendet werden. Ein Mannose-DMAP-Derivat (14) wird eingesetzt, welches selektiv in der Tasche bindet (a). Wenn das DMAP-Mannose-Derivat (14) in der Tasche gebunden ist, kann es die Reaktion der Tyrosin-Seitenkette mit dem Mannose-Azobenzol-Thioester (13) katalysieren (b), wodurch der Mannose-Azobenzol-Photoschalter (hellgrün) angebracht wird. Ist das Mannose-DMAP-Derivat (14) nicht in der Tasche gebunden, soll keine Reaktion mit dem Azobenzol-Thioester ablaufen (c).

Die Anbindung des Photoschalters soll durch die Modifizierung eines Tyrosins an der Bindungstasche des Proteins mit einem Mannose-terminierten Azobenzolderivat mit einem reaktiven Thioester (13) erfolgen. Um die Reaktion an anderen reaktiven Stellen des Proteins zu verhindern, wird eine DMAP-vermittelte Ligationstrategie genutzt. Die Adressierung dieses Tyrosins soll durch die Bindung eines Mannose-modifizierten DMAP-Derivates (14) erfolgen, welches selektiv in der Mannose-Bindungstasche andockt. Nur wenn das DMAP-Mannose-Derivat 14 in der Tasche gebunden ist, kann es die Reaktion der benachbarten Tyrosin-Seitenkette mit dem Azobenzol-Thioester 13 katalysieren, wodurch der Azobenzol-Photoschalter angebracht wird. In Abwesenheit des Mannose-DMAP-Derivates soll keine Reaktion des Thioesters stattfinden (siehe Abbildung 76).

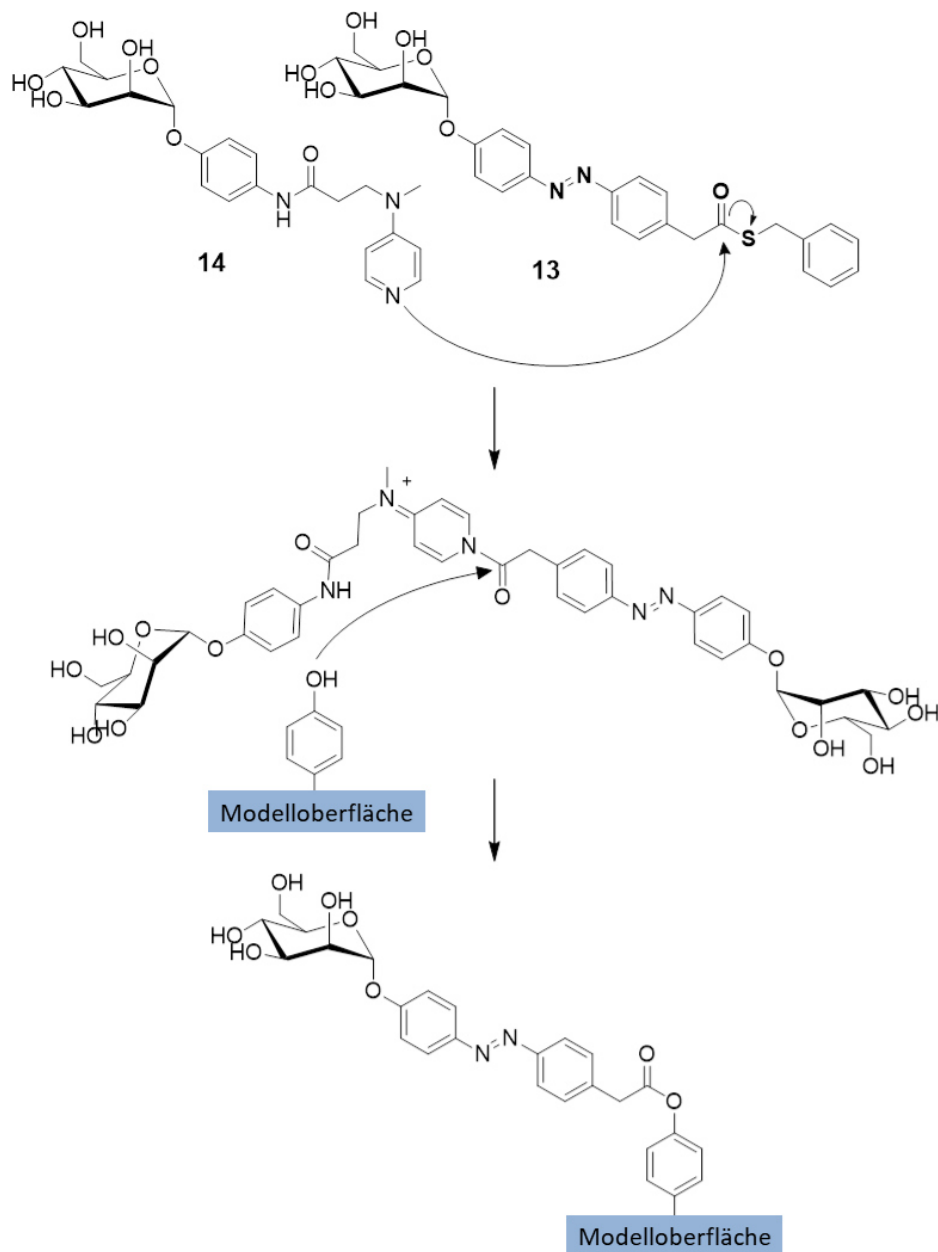


Abbildung 77: Anbindung einer Azobenzol-Einheit an eine Tyrosin-Modelloberfläche: Die katalytische Aktivität des DMAP-Derivates **14** auf die Reaktion des Thioesters **13** mit einer oberflächengebundenen Tyrosin-Einheit ist dargestellt. Das Modellsystem ermöglicht die Untersuchung der Reaktion zur Anbindung der Azobenzol-Einheit an eine Tyrosin-haltige Proteinoberfläche.

Die Aktivität eines DMAP-Derivates **14** auf die Katalyse eines oberflächengebundenen Tyrosins in der Reaktion mit einem Thioester **13** soll hierzu geprüft werden. Im Rahmen dieses Projektes wurde eine Modelloberfläche für das Protein FimH entwickelt. Da die katalytische Modifizierung der Aminosäure Tyrosin an einer Oberfläche untersucht werden sollte, wurde das phenolische Strukturmerkmal des Tyrosins in eine Matrix auf einer Oberfläche eingebaut. Die Detektion einer erfolgreichen Anbindung des Mannose-

haltigen Azobenzol-Thioesters **13** an der Oberfläche (siehe Abbildung 77) wurde durch einen Bakterienadhäsionstest mit einem GFP-exprimierenden *Escherichia coli* (*E.coli*) Stamm realisiert.

5.1.1. Untersuchungen von mixed-SAMs als Modelloberfläche für FimH

Die Anbindung des Mannose-haltigen Azobenzolderivates **13** an eine Tyrosin-haltige Modelloberfläche soll in Anwesenheit und Abwesenheit des katalytisch aktiven DMAP-Derivates **14** untersucht werden. Die im Falle einer erfolgreichen Ligation an die Oberfläche gebundene Mannose soll über die Adhäsion von Bakterien detektiert werden und hierdurch eine Anbindung der Azobenzol-Einheit nachgewiesen werden. In dem Bakterienadhäsionstest wird die spezifische Interaktion des bakteriellen Lektins FimH von *E.coli* (pPKL1162) genutzt.

Für den Bakterienadhäsionstest soll die Oberfläche biorepulsiv sein, um unspezifische Adhäsion von Bakterien zu unterdrücken. Nur die spezifische Interaktion der nach erfolgreicher Ligation oberflächengebundenen Mannose mit FimH soll zur Adhäsion der Bakterien führen. Das Modellsystem soll somit aus einer biorepulsiven Matrix bestehen, welche das phenolische Strukturmerkmal des Tyrosins exponiert.

Die Oberflächenbeschichtung soll aus zwei mit Thioacetat-terminierten Molekülen, welche auf einer Goldoberfläche abgeschieden werden können, aufgebaut werden. Die biorepulsive Matrix soll durch die Abscheidung von [1-[(Acetyl)thio]undec-11-yl]tetraethylglykol (**15**) erhalten werden. Das Molekül besteht aus einem Undecan-Linker, welcher die biorepulsive Tetraethylglykol-Kopfgruppe und die Schwefel-Ankergruppe verknüpft. Derartige Undecan-Ethylglykol-SAMs sind dafür bekannt, weitgehend defektfreie SAMs zu bilden, welche in biologischen Medien stabil sind.¹⁹³ Durch Herstellung von gemischten Monolagen des Matrixmoleküls **15** mit 4-[(11-(Acetylthio)-undecyltetra(ethylglykol)]-phenol (**16**) soll die phenolische Einheit in die Matrix eingebaut werden.

5.1.1.1. Synthese der SAM-bildenden Moleküle

Zunächst erfolgte die Synthese der beiden SAM-bildenden Moleküle **15** und **16** (siehe Abbildung 78). Hierfür wurde 11-Bromundec-1-en (**17**) mit Tetraethylenglykol (**18**) unter basischen Bedingungen zu Undec-1-en-11-yl-tetraethylenglykol (**19**) umgesetzt. Verbindung **19** kann photochemisch weiter mit Thioessigsäure (**20**) zu dem Matrix-bildenden Molekül **15** reagieren. Um Verbindung **16** zu erhalten, wurde **15** mit Hydrochinon (**21**) in einer Mitsunobu-Reaktion^{194,195} gekoppelt.

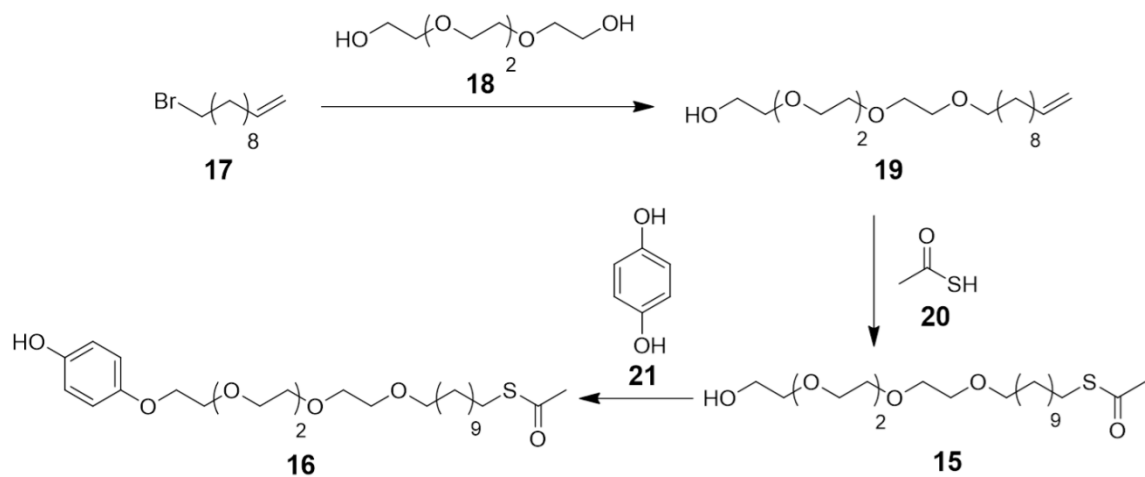


Abbildung 78: Synthese der beiden SAM-bildenden Bausteine zur Herstellung einer Tyrosin-haltigen Protein-Modelloberfläche.

5.1.1.2. Herstellung und Charakterisierung der gemischten SAMs

Zur Herstellung gemischter SAMs wurden die Schichtbildungseigenschaften aus Lösungen, welche beide SAM-bildenden Moleküle enthalten, untersucht. Hierzu wurden elf verschiedene Lösungen mit Molenbrüchen von Verbindung **16** im Bereich von 0.0 (nur Verbindung **15**) bis 1.0 (nur Verbindung **16**) mit einem Inkrement von 0.1 hergestellt und daraus SAMs auf Goldoberflächen abgeschieden. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der erhaltenen Schichten mittels Ellipsometrie und IRRAS.

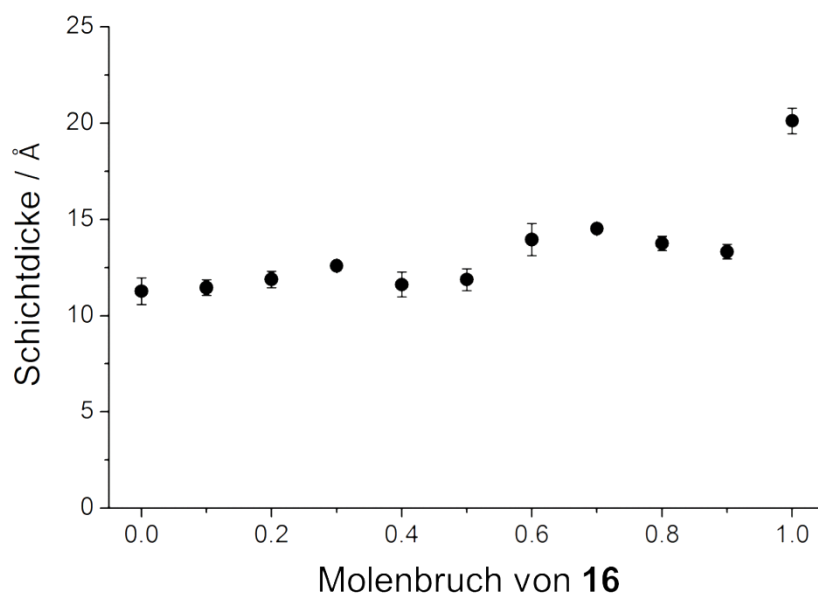


Abbildung 79: Ellipsometrische Schichtdicken der Oberflächen, welche mit verschiedenen Molenbrüchen von Verbindung 16 in der Abscheidungslösung behandelt wurden.

Die ellipsometrisch bestimmten Schichtdicken für die verschiedenen Molenbrüche der Abscheidungslösungen variieren von 1.1 bis 2.0 nm (siehe Abbildung 79). Die bestimmten Schichtdicken sind somit kleiner als es für die elongierten Moleküle, deren Länge 2.9 nm (Verbindung 15) bzw. 3.5 nm (Verbindung 16) beträgt, zu erwarten wäre. Dies kann durch die Unordnung der Ethylenglykol-Ketten erklärt werden, die keine gestreckte Struktur einnehmen. Die Änderung des Molenbruchs von 0.9 nach 1.0 führt zu einer großen Änderung der Schichtdicke. Die kleineren Schichtdicken der Molenbrüche (0.0 bis 0.9) deuten darauf hin, dass Verbindung 16 deutlich schlechter in die Monolage eingebaut wird.

Die Vermutung, dass Verbindung 16 schlechter als Verbindung 15 in die Monolage eingebaut wird, bestätigen auch die IRRA-Spektren (siehe Abbildung 80).

Die Banden bei $2830\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$ können den symmetrischen und asymmetrischen Streckschwingungen der Methylen-Einheiten in der Alkyl- und der Ethylenglykol-Kette zugeordnet werden. Das Maximum der asymmetrischen Streckschwingung bei 2920 cm^{-1} deutet auf eine hohe Ordnung der Alkylketten und eine dicht gepackte Monolage hin. Die Banden bei 1350 cm^{-1} (CH_2 -Wippschwingung) und bei 1130 cm^{-1} (C-O-C-Streckschwingung) sind charakteristisch für die Ethylenglykol-Ketten. Das Signal bei

1740-1760 cm^{-1} (Carbonyl-Streckschwingung) ist ein Hinweis für eine leichte Oxidation der Ethylenglykol-Einheiten.¹⁹⁶ Die scharfe Bande bei 1513 cm^{-1} ist mit der phenolischen Einheit in Verbindung **16** assoziiert und ermöglicht die Quantifizierung des Anteils der Verbindung in der Monolage.

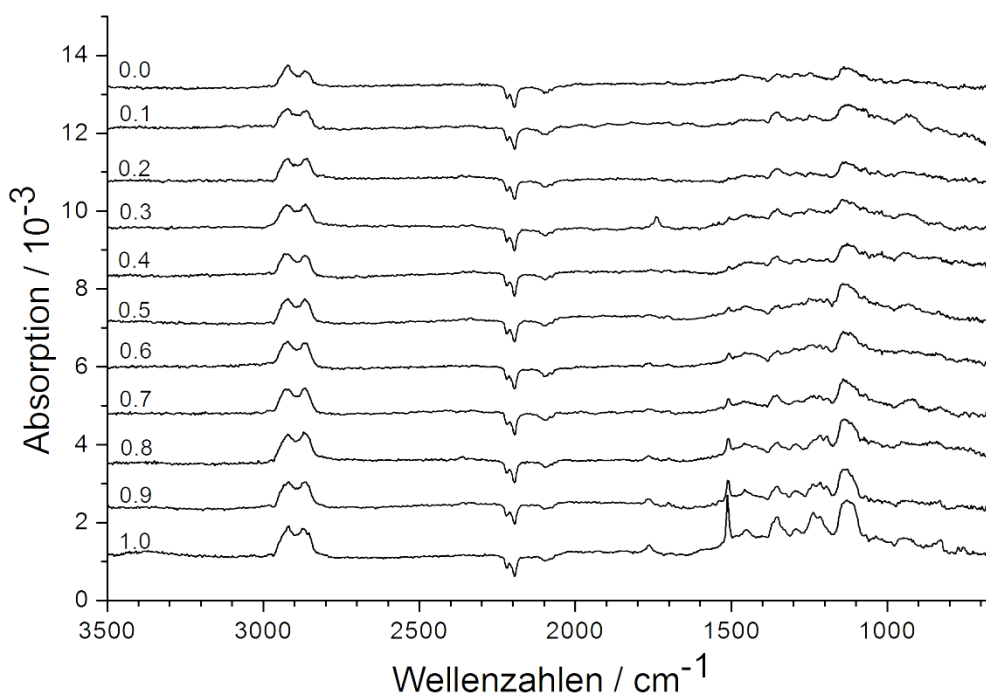


Abbildung 80: IRRA-Spektren der gemischten SAMs aus verschiedenen Molenbrüchen von Verbindung 16 in der Abscheidelösung: Die Signale von 2830 bis 2970 cm^{-1} können der symmetrischen und asymmetrischen Methylen-Streckschwingung der Alkyl-Kette und der Ethylenglykol-Einheiten zugeordnet werden. Das Signal bei 1513 cm^{-1} ist charakteristisch für die C-O-Streckschwingung der phenolischen Gruppe. Das Signal bei 1130 cm^{-1} ist der C-O-C-Streckschwingung der Ethylenglykol-Ketten zuzuordnen.

Unter der Annahme, dass die Anzahl der Moleküle in der Monolage unabhängig von der Gegenwart der phenolischen Kopfgruppe ist, wurde das Integral des Signals in Abhängigkeit von dem Molenbruch der Verbindung in der Abscheidelösung bestimmt. Das Signal der aus der Lösung mit einem Molenbruch von 1.0 (nur Verbindung **16**) gebildeten Schicht wurde als 100 % angenommen. Auch die Daten der IRRAS-Messungen zeigen somit, dass Verbindung **16** deutlich schlechter in die Monolage eingebaut wird. Nur 46 % der Monolage besteht aus Verbindung **16**, wenn ein Molenbruch von 0.9 in der Lösung für die Abscheidung verwendet wird (siehe Abbildung 81).

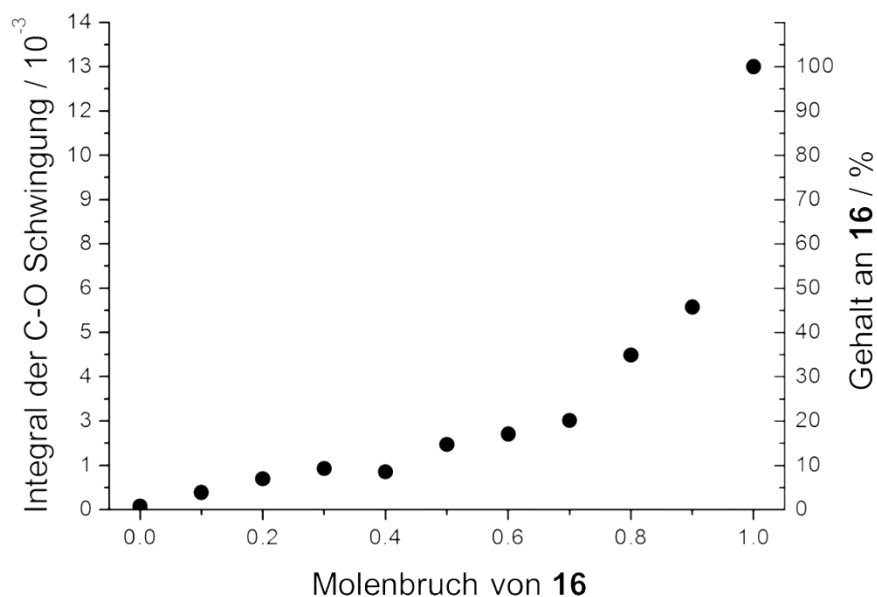


Abbildung 81: Die Integrierung des Signals der phenolischen-C-O-Schwingung erlaubt die Bestimmung des Anteils an Verbindung 16 in der SAM. Die Daten unterstützen den schlechteren Einbau von Verbindung 16 in die gemischte Monolage.

5.1.2. Untersuchungen der DMAP-vermittelten Ligation anhand eines bakteriellen Adhäsionstests

Um die erfolgreiche Anbindung des Thioesters **13** an die phenolische Oberfläche nachzuweisen, wurden Bakterienadhäsionstests durchgeführt. Hierfür ist es notwendig, die Biorepulsivität der unmannosylierten Oberfläche gegenüber dem verwendeten Bakterium sicherzustellen, um eine unspezifische Adhäsion möglichst zu unterdrücken. Die zuvor mittels Ellipsometrie und IRRAS charakterisierten SAMs, welche aus Lösungen mit verschiedenen Molenbrüchen abgeschieden wurden, wurden in dem bakteriellen Adhäsionstest hinsichtlich ihrer Biorepulsivität untersucht (siehe Abbildung 82).

Ein Typ 1-fimbrierter *E.coli* Stamm, welcher mit GFP markiert wurde (pPKL1162),¹⁹⁷ wurde in seiner exponentiellen Wachstumsphase (optische Dichte (OD) = 0.5) verwendet. Die Substrate wurden in der Bakterienlösung für 30 Minuten inkubiert. Das Ergebnis zeigt keinen signifikanten Unterschied für die Oberflächen, welche aus Lösungen mit den Molenbrüchen 0.0 – 0.9 abgeschieden wurden. Für einen Molenbruch von 1.0 (nur

Verbindung **14**) wurde eine etwa doppelt so hohe Anzahl an Bakterien gefunden, was vergleichbar ist mit dem Verhalten einer unbehandelten Goldoberfläche.

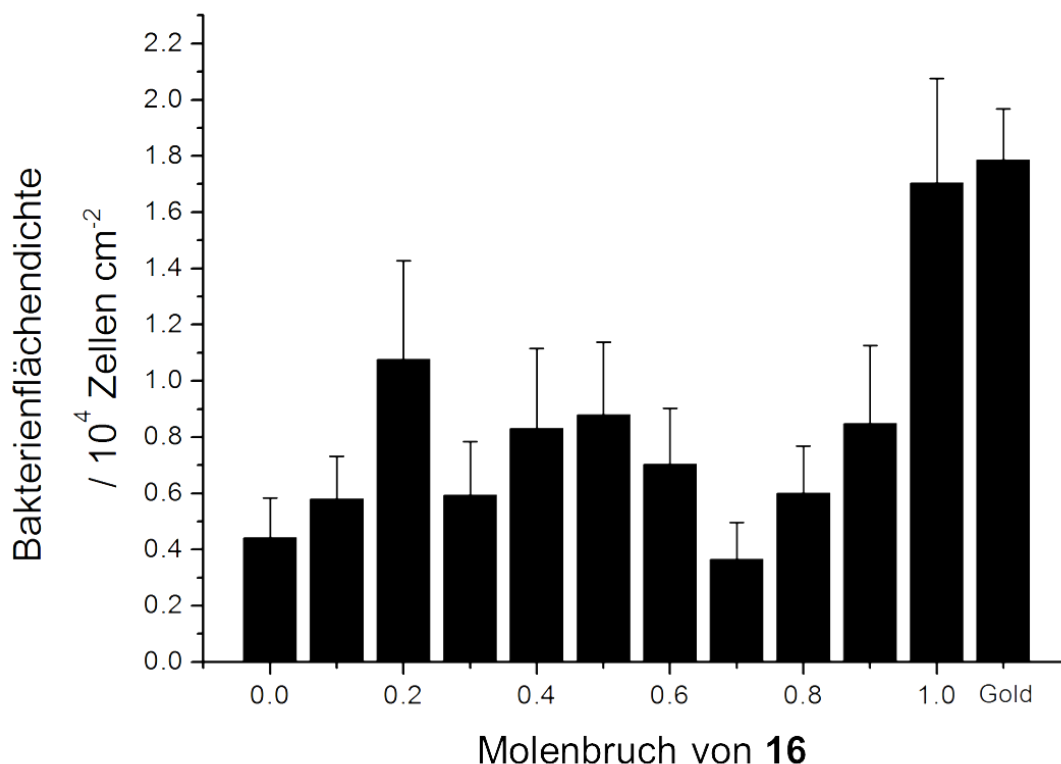


Abbildung 82: Bakterienadhäsionstest für verschiedene Molenbrüche von Verbindung **16** in der Abscheidelösung: Kein signifikanter Unterschied kann für die Molenbrüche von 0.1 bis 0.9 festgestellt werden. Dagegen wird eine erhöhte unspezifische Adhäsion von Bakterien an die SAM mit dem Molenbruch 1.0 (Verbindung **16**), vergleichbar zu der Adhäsion an einer Goldoberfläche, gefunden. Die Fehler sind mit 95 % Konfidenzintervall angegeben.

Um die unspezifische Adhäsion zu minimieren, wurde ein Molenbruch von 0.9 für die Untersuchung der Anbindung des Thioesters **13** an die Oberfläche verwendet. Hierdurch sind eine Vielzahl an phenolischen Reaktionsstellen (46 % von Verbindung **16** in der Monolage verglichen zu einem reinen SAM aus Verbindung **16**) auf der Oberfläche vorhanden, welche mit dem Thioester **13** reagieren können.

Die durch das DMAP-Derivat **14** katalysierte Ligation des Thioesters **13** wurde in 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure(HEPES)-Puffer (pH = 8), welcher 15 % Dimethylsulfoxid (DMSO) enthält, durchgeführt. Diese Bedingungen entsprechen denen, welche die Arbeitsgruppe Lindhorst für die Ligation an das bakterielle Lektin

FimH verwendet.¹⁹⁸ Die durch die SAM beschichteten Modelloberflächen wurden in Lösungen des DMAP-Derivates **14**, des Thioesters **13** und einer 1:1 Mischung der beiden Moleküle inkubiert (siehe Abbildung 83). Um die Stabilität der Monolagen unter den Bedingungen sicherzustellen, wurde ebenfalls ein SAM-beschichtetes Substrat in DMSO-haltigen HEPES-Puffer eingelegt. Anschließend wurden die Oberflächen ähnlich wie die verschiedenen gemischten SAMs (siehe Abbildung 82) in einem bakteriellen Adhäsionstest untersucht. Ein unbehandeltes Goldsubstrat wurde als Referenz verwendet.

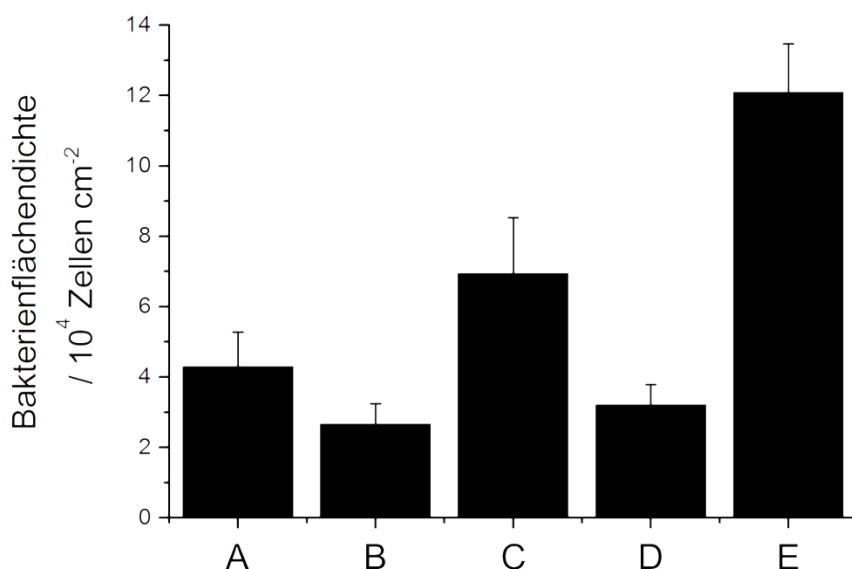


Abbildung 83: Bakterienadhäsionstest nach der DMAP-katalysierten Ligation mit dem Thioester: Die Adhäsion der *E.coli* Zellen auf den unterschiedlich behandelten Oberflächen ist dargestellt: Unbehandelte Goldoberfläche (A), SAM in DMSO/HEPES-Puffer (B), SAM in einer Lösung des Thioesters (C), SAM in einer Lösung des DMAP-Derivates (D), SAM in einer Lösung bestehend aus einer 1:1 Mischung des Thioesters **13** und DMAP-Derivates **14** (E). Die Fehler sind mit 95 % Konfidenzintervall angegeben.

Die durch die SAM beschichteten Goldsubstrate, welche in den DMSO-haltigen HEPES-Puffer bzw. in die Lösung des DMAP-Derivates **14** eingelegt wurden, zeigen keine signifikante Änderung in der Zelladhäsion. Dagegen weist die Oberfläche, welche mit dem Thioester **13** funktionalisiert wurde, eine Erhöhung der bakteriellen Adhäsion um den Faktor drei (ungefähr $70000 \text{ Zellen/cm}^2$) auf. Die Kombination des Thioesters **13** mit dem DMAP-Derivat **14** weist eine fünffach höhere Adhäsion an Bakterien (ungefähr $120000 \text{ Zellen/cm}^2$) auf.

5.1.3. Schlussfolgerungen

Zur Untersuchung der DMAP-vermittelten Ligationsstrategie zur Anbindung eines Azo-Photoschalters an der Mannose-Bindungstasche des Lectins FimH konnte erfolgreich eine Modelloberfläche entworfen werden, welche sich aus einer Hydrogel-Matrix und daraus exponierten Phenolgruppen zusammensetzt. Hierzu konnten zwei Thioacetate, eines, das die Hydrogel-Matrix aufbaut (Verbindung **15**) und jenes, welches die Phenolgruppe trägt, (Verbindung **16**) hergestellt werden. Die Untersuchungen zur Abscheidung einer SAM durch Inkubation von Goldoberflächen in Lösungen, welche Mischungen der beiden SAM-bildenden Thioacetate mit verschiedenen Molenbrüchen enthielten, zeigte, dass das Phenol-haltige Molekül **16** schlechter in die Schicht eingebaut wird. Die SAM, welche durch die Abscheidung aus einer Lösung mit einem Molenbruch von 0.9 von Verbindung **16** erhalten wird, ist ausreichend biorepulsiv und kann für die Untersuchung der Ligationsstrategie verwendet werden.

Der Bakterienadhäsionstest zur Untersuchungen der durch das DMAP-Derivat **14** vermittelten Reaktion des Thioesters **13** mit der Modelloberfläche zeigt, dass vermutlich bereits der Thioester **13** mit der phenolischen Einheit der Oberfläche reagiert. Die Mischung des DMAP-Derivates **14** und des Thioesters **13** erhöht jedoch die Ausbeute des Ligationsproduktes. Für die Reaktion an der Proteinoberfläche des Lektins FimH muss somit neben der spezifischen, durch das DMAP-Derivat katalysierten Anbindung der Azobenzol-Einheit an der Bindungstasche, auch eine unspezifische Nebenreaktion erwartet werden. Dies bedeutet, dass davon ausgegangen werden muss, dass auch an anderen Stellen des Proteins das Azobenzol-Derivat angebunden wird.

5.1.4. Experimentelles

Synthese der SAM-bildenden Moleküle

Materialien und generelle Methoden

Feuchtigkeits- und sauerstoffempfindliche Reaktionen wurden unter Schutzgasatmosphäre (Stickstoff 5.0 (≥ 99.999 Vol.-%)) in zuvor getrockneten Glasapparaturen (Ausheizen im Vakuum) durchgeführt. Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (0.040-0.063 mm, *Macherey-Nagel, Germany*) verwendet. Kommerziell erhältliche Lösungsmittel wurden destillativ gereinigt.

$^1\text{H-NMR}$ Spektren wurden an einem *Bruker AM-250* NMR-Spektrometer aufgenommen. Die chemische Verschiebung ist in ppm relativ zu Tetramethylsilan angegeben. Die Kalibrierung der Spektren erfolgte anhand der Restprotonensignale der Lösungsmittel Chloroform ($\delta = 7.26$ ppm) oder Dimethylsulfoxid ($\delta = 2.50$ ppm).

Die Synthese von 2-Phenyl-(4'-azo(4''-(α -D-mannopyranosyloxy)-phenyl)-essigsäurethiophenylester (**13**) und 3-(Methyl-4'-pyridylamino)-propansäure-(4''-(α -D-mannopyranosyloxy))-phenylamid (**14**) sind veröffentlicht.¹⁹⁸

Synthese von Undec-1-en-11-yl-tetraethylglykol (**19**)

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an Literatur 199.

Tetraethylglykol (25.0 g, 129 mmol) und Natriumhydroxid (50 Gew.-% in dest. Wasser, 515 mg, 12.9 mmol) wurden für 40 Minuten bei 120 °C gerührt. Anschließend wurde 11-Brom-1-undecen (3.0 g, 12 mmol) hinzugegeben und für weitere 23 Stunden unter Rühren auf 120 °C erwärmt. Die Reaktion wurde mit *n*-Hexan (6 x 30 mL) extrahiert und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch mit Ethylacetat aufgereinigt. Es wurden 2.70 g (7.79 mmol, 61 % Ausbeute) von Undec-1-en-11-yl-tetraethylglykol als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.80$ (ddt, $^3J = 17.0$ Hz, $^3J = 10.2$ Hz, $^3J = 6.7$ Hz, 1H), 4.98 (ddd, $^2J = 3.7$ Hz, $^3J = 17.0$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 1H), 4.92 (ddt, $^2J = 2.2$ Hz, $^3J = 10.2$ Hz,

$^4J = 1.2$ Hz, 1H), 3.74 – 3.55 (m, 16H), 3.44 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H), 2.03 (q, $^3J = 7.5$ Hz, 2H), 1.57 (quin, $^3J = 6.9$ Hz, 2H), 1.36 (quin, $^3J = 7.0$ Hz, 2H), 1.27 (br s, 10H) ppm.

Synthese von [1-[(Acetyl)thio]undec-11-yl]tetraethylenglykol (15)

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an Literatur 199.

Methanol (2.5 mL) und Thioessigsäure (0.73 mL, 10 mmol) wurden gemeinsam entgast. Nach der Zugabe von Undec-1-en-11-yl-tetraethylenglykol (1.40 g, 4.04 mmol) wurde die Reaktionslösung mit einer 150 W Quecksilberdampflampe bestrahlt, bis eine vollständige Umsetzung mittels Dünnschichtchromatographie (Merck Kieselgel60 F₂₅₄: Ethylacetat) festgestellt wurde, bestrahlt. Alle flüchtigen Verbindungen wurden im Vakuum entfernt und Wasser zu dem Rückstand hinzugegeben. Die Lösung wurde mit Ethylacetat extrahiert und die organische Phase mit Wasser gewaschen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie mit Ethylacetat aufgereinigt. Es wurden 1.25 g (2.96 mmol, 73 % Ausbeute) von [1-[(Acetyl)thio]undec-11-yl]tetraethylenglykol als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 3.74 - 3.55$ (m, 16H), 3.42 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2H), 2.85 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.66 – 1.45 (m, 4H), 1.25 (br s, 14H) ppm.

Synthese von 4-[(11-(Acetylthio)undec-1-yl)-tetraethylenglykol]-phenol (16)

Die Synthese erfolgte in Anlehnung an Literatur 200.

Zu einer Mischung aus Hydrochinon (1.81 g, 16.4 mmol) und [1-[(Acetyl)thio]undec-11-yl]tetraethylenglykol (694 mg, 1.64 mmol) in 35 mL Tetrahydrofuran wurde Triphenylphosphan (431 mg, 1.64 mmol) hinzugegeben. Azodicarbonsäure-diisopropylester (332 mg, 1.64 mmol) wurde tropfenweise unter Eiskühlung hinzugegeben und die Reaktion für 15 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für 17 Stunden weiter gerührt. Alle flüchtigen Verbindungen wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (*n*-Hexan/Ethylacetat 2:1) gereinigt. Abschließend wurde verbleibendes Hydrochinon

durch Sublimation aus dem Öl entfernt ($1.2 \cdot 10^{-2}$ mbar, 130 °C) und 162 mg (0.305 mmol, 19 %) 4-[(11-(Acetylthio)undec-1-yl)-tetraethylenglykol]-phenol erhalten.

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.88 (s, 1H), 6.74 (d, ³*J* = 9.0 Hz, 2H), 6.65 (d, ³*J* = 9.0 Hz, 2H), 3.96 (t, ³*J* = 4.4 Hz, 2H), 3.68 (t, ³*J* = 5.0 Hz, 2H), 3.61 – 3.41 (m, 12H), 3.35 (t, ³*J* = 6.5 Hz, 2H), 2.81 (t, ³*J* = 7.2 Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.46 (m, 4H), 1.23 (br s, 14H) ppm.

Herstellung und Charakterisierung der SAMs

Zur Herstellung der Substrate wurden Silicium(100)-Wafer (Wacker Chemie AG) mit 2.5 nm Chrom (Aufdampfrate ≈ 0.5 Å/s; Pfeiffer Vacuum Classic 50) und 200 nm Gold bedampft (Aufdampfrate $\approx 1.0 - 2.0$ Å/s).

Ethanol (99 % mit 1 % Petrolether) wurde für sechs Stunden refluxiert und destilliert. DMSO wurde in p.a.-(*pro analysi*) Qualität erworben und ohne Aufreinigung eingesetzt. Die Siliciumwafer wurden gebrochen, mit Ethanol gespült, im Stickstoffgasstrom getrocknet und im H₂ Plasma gereinigt (Harrick PDC-32G Plasma Cleaner („high level“ bei einem Druck von $5 \cdot 10^{-1}$ mbar für 2 min). Zur Abscheidung der SAMs wurden die Substrate in 0.5 M Lösungen der Verbindung **13**, **14** oder einer Mischung beider (Molenbrüche von 0.1 bis 0.9 in Schritten von 0.1) in Ethanol bei Raumtemperatur gelegt. Nach mindestens 24 Stunden wurden die Substrate herausgenommen, mit Ethanol gespült und im Stickstoffgasstrom getrocknet.

Ellipsometrie

Zur Bestimmung von Schichtdicken sowie Substratparametern von Gold wurden Ellipsometrie-Messungen an einem Sentech Ellipsometer (SE400) durchgeführt. Der Laserstrahl mit der Wellenlänge 632.8 nm fiel unter einem Winkel von 70 ° auf die Probe. Für die Bestimmung der Schichtdicken wurden für die organischen Schichten folgende Parameter verwendet: $n = 1.450$, $k = 0.000$.

IRRAS

IRRAS-Messungen wurden an einem Nicolet 6700 FT-IR-Spektrometer aufgenommen. Es wurde ein MCT-Detektor verwendet. Der Innenraum des Spektrometers wurde mit trockener und CO₂-freier Luft gespült. Für jedes abgebildete Spektrum wurden jeweils 256 Scans aufgenommen.

Untersuchungen der DMAP-vermittelten Ligation anhand eines bakteriellen Adhäsionstests

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Puffer wurde aus 115 mM NaCl, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 2.4 mM K₂HPO₄ und 20 mM HEPES in Wasser hergestellt. Es wurde ein pH von 8 (25 °C) eingestellt.

Phosphatgepufferte Salzlösung Tween20 (PBST) wurde aus 0.1%igen Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween20), 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl, und 3 mM KCl in Wasser hergestellt. Es wurde ein pH von 7.4 (25 °C) eingestellt.

Für die Untersuchung der von dem DMAP-Derivat **14** katalysierten Ligation des Thioesters **13** mit der Modelloberfläche wurde eine SAM aus einer Lösung mit dem Molenbruch von 0.9 der Verbindung **16** abgeschieden. Vier mit der SAM beschichtete Oberflächen wurden in jeweils 5 mL einer Reaktionslösung inkubiert. Vier verschiedene Reaktionslösungen wurden verwendet:

1. HEPES-Puffer mit 15 % Dimethylsulfoxid
2. HEPES-Puffer mit 15 % Dimethylsulfoxid und 0.1 M **13**
3. HEPES-Puffer mit 15 % Dimethylsulfoxid und 0.1 M **14**
4. HEPES-Puffer mit 15 % Dimethylsulfoxid, 0.1 M **13** und 0.1 M **14**

Alle Lösungen wurden steril filtriert (0.20 µm, Polyethersulfon Membran) und alle Gefäße mit Ethanol sterilisiert. Die Substrate wurden in Lösung in einem Inkubationsschüttler bei 100 rpm und 37.5 °C über Nacht inkubiert. Die Substrate wurden aus der Lösung genommen und gründlich mit PBST und DMSO gespült. Abschließend wurden die Substrate für 10 Minuten in DMSO im Ultraschallbad behandelt.

Bakterienadhäsionstest

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) wurde hergestellt aus 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 138 mM NaCl und 3 mM KCl. Es wurde ein pH von 7.4 (25 °C) eingestellt.

Für den Bakterienadhäsionstest der SAMs mit verschiedenen Molenbrüchen von Verbindung **16** in der Abscheidungslösung wurden mindestens vier Substrate für jeden Molenbruch getestet. Fünf Bakterienadhäsionstests wurden durchgeführt, wobei in jedem Test elf SAMs mit verschiedenen Molenbrüchen (Molenbruch von 0.0 bis 1.0 mit einem Inkrement von 0.1) und acht plasmagereinigte Goldsubstrate untersucht wurden.

In dem Bakterienadhäsionstest zur Untersuchung der Ligation des Thioesters **13** mit der phenolischen Einheit auf der Oberfläche wurden vier beschichtete Oberflächen für jede Reaktionslösung (Lösungen 1 bis 4) zusammen mit vier plasmagereinigten Goldsubstraten untersucht.

Für den Bakterienadhäsionstest wurde eine Suspension des fluoreszierenden GFP-markierten *E. coli* (pPKL11 62) Stamms¹⁹⁷ in CASO Nährmedium (30 g/L) mit einer optischen Dichte (OD) von 0.5 (*fisher scientific*, Zelldichte-Messgerät Modell 40) verwendet. Die Substrate wurden in PTFE Haltern in 400 mL der Bakteriensuspension gestellt und bei 100 rpm für 30 Minuten bei 37.5 °C inkubiert. Der Adhäsionsprozess wurde durch gleichzeitiges Überführen der Substrathalter in PBS-Puffer gestoppt. Anschließend wurde jedes Substrat in ein 50 mL Falcon®-Zentrifugenröhrchen, welches mit 15 mL PBS-Puffer gefüllt war, gelegt und die Röhrchen bei 200 rpm für 2 Minuten geschüttelt. Abschließend wurden die Substrate einzeln in frischen PBS-Puffer getaucht. Die Bakterienflächendichte wurde mithilfe eines *Olympus BX51* Mikroskops, welches mit einer Metallampflampe und einem 475 nm Filter zur Anregung sowie einem 535 nm Filter zur Detektion ausgestattet war, gemessen. Für jedes Substrat wurden an zufällig ausgewählten Stellen in der Mitte des Substrates Aufnahmen gemacht und die Anzahl an Bakterien bestimmt. Die Fehler wurden mit einem Konfidenzintervall von 95 % berechnet.

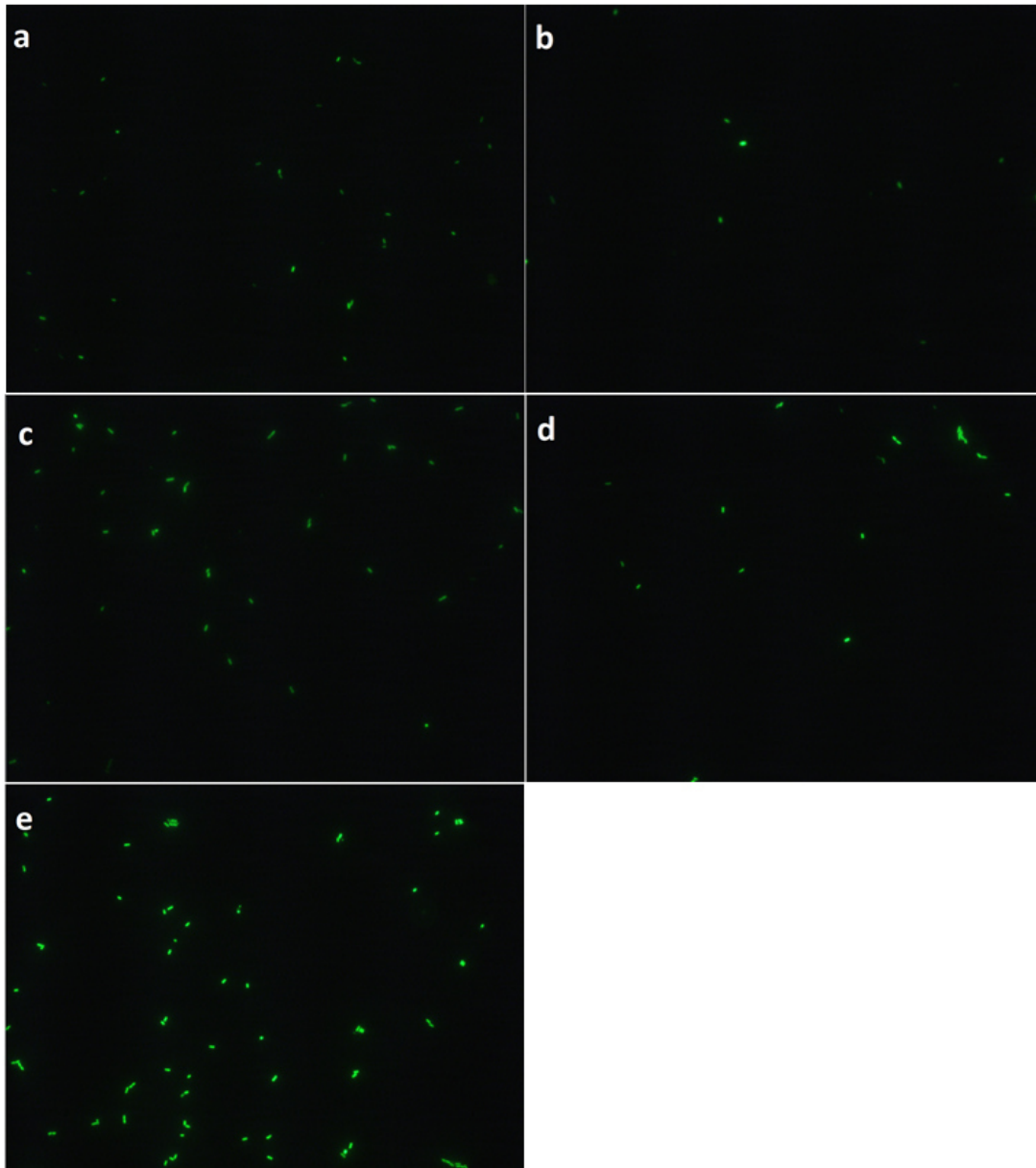


Abbildung 84: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der fluoreszierenden *E. coli* Zellen auf den Substraten. Die Substrate wurden in vier verschiedenen Reaktionslösungen inkubiert: a) gereinigtes Gold, b) mit einer SAM beschichtetes Gold in HEPES-Puffer/DMSO c) mit einer SAM beschichtetes Gold in HEPES-Puffer/DMSO und Verbindung 13 d) mit einer SAM beschichtetes Gold in HEPES-Puffer/DMSO und Verbindung 14 e) beschichtetes Gold in HEPES-Puffer/DMSO, Verbindung 13 und 14.

Tabelle 1: Absolute Anzahl an *E. coli* Zellen auf gereinigten Gold-Substraten und den SAMs, welche durch die Abscheidung aus Lösungen mit verschiedenen Molenbrüchen an Verbindung 16 erhalten wurden. Von jedem Substrat wurden zehn Aufnahmen gemacht.

Molenbruch an Verbindung 16	Bakterienflächen -dichte / Zellen cm ⁻²	Standard- abweichung / Zellen cm ⁻²	95 % Konfidenz- intervall / Zellen cm ⁻²	Anzahl an Substraten
1.0	17100	13000	4000	5
0.9	8500	9800	2800	5
0.8	6000	5900	1700	5
0.7	3700	4600	1300	5
0.6	7000	7000	2000	5
0.5	8800	8100	2600	4
0.4	8300	8900	2900	4
0.3	5900	6000	1900	4
0.2	11000	11000	3500	5
0.1	5800	5300	1500	4
0.0	4400	5000	1400	5
Gold	17900	18500	1800	40

Tabelle 2: Absolute Anzahl an *E. coli* Zellen auf gereinigten Goldsubstraten und den SAMs, welche in verschiedenen Reaktionslösungen (Lösungen 1 bis 4) inkubiert wurden. Von jedem Substrat wurden zehn Aufnahmen gemacht.

Reaktions- lösung	Bakterienflächen -dichte / Zellen cm ⁻²	Standard- abweichung/ Zellen cm ⁻²	95 % Konfidenz- intervall / Zellen cm ⁻²	Anzahl an Substraten
HEPES- Puffer/DMSO	26700	18100	5800	4
HEPES- Puffer/DMSO + Verbindung	69500	49600	15900	4
HEPES- Puffer/DMSO + Verbindung	32100	1800	5800	4
HEPES- Puffer/DMSO + Verbindung 13 und 14	120800	43600	13900	4
Gold	42900	30600	9800	4

Veröffentlichung

Das Projekt ist ein Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe Lindhorst (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel). Die Ergebnisse dieses Projekts, die Synthesen der Moleküle, sowie die Modifizierung des Proteins FimH, für welches in diesem Projekt ein Modellsystem entwickelt wurde, werden veröffentlicht.

6. Zusammenfassung

Die Kenntnis der Struktur von Biomolekülen und der biologischen Abläufe, in welche diese involviert sind, ist grundlegend für die Entwicklung von medizinischen Behandlungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Systeme zur Untersuchung von Biomolekülen, insbesondere Proteinen, hergestellt. Im Mittelpunkt stand die Entwicklung von Materialien, welche neue Möglichkeiten zur Präparation von Proteinen zur Untersuchung ihrer Struktur mittels Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM) eröffnen.

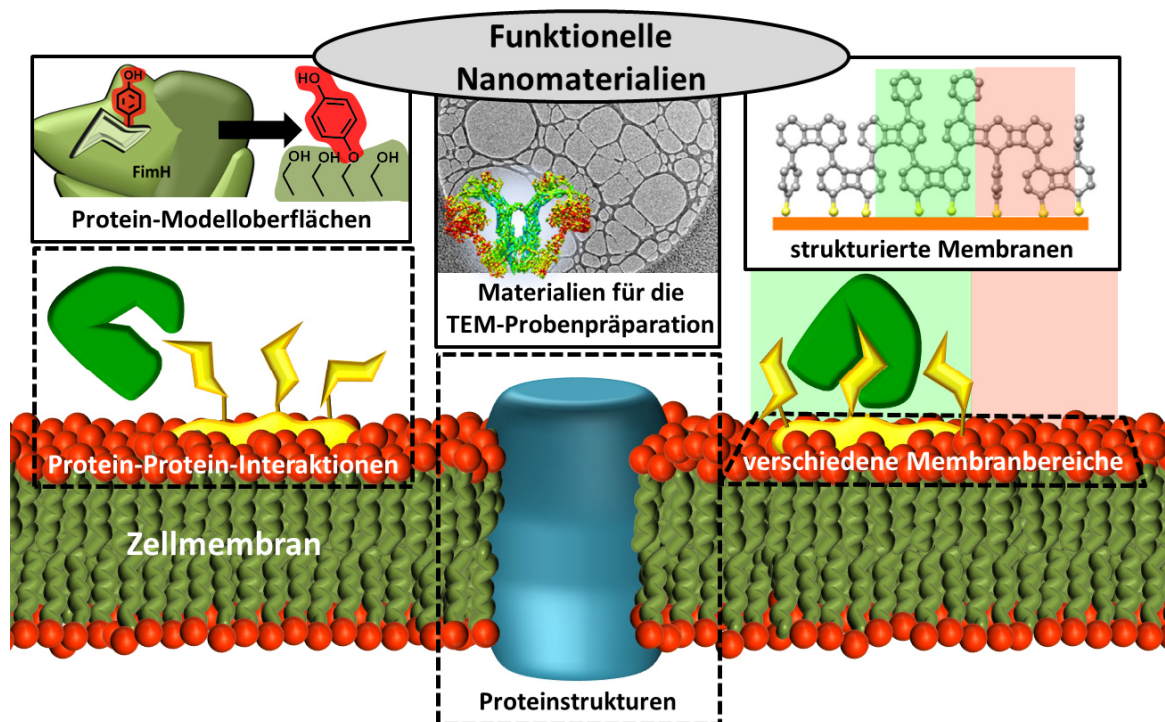


Abbildung Z1: Funktionelle Nanomaterialien, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden im Vergleich zu einer biologischen Membran (unten). Die biologische Membran besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht (olivgrün/orange), welche eine Vielzahl komplex strukturierter Bereiche aufweist. Proteine (blau, Transmembranprotein), Glykoproteine (gelb) und viele andere Biomoleküle sind dort in verschiedenste biologische Prozesse (z.B. Protein-Protein-Interaktionen) involviert. Die in dieser Arbeit entwickelten Nanomaterialien können in verschiedenen Bereichen dazu beitragen, derartige biologische Systeme zu untersuchen. Es wurden Nanomaterialien, welche die Probenpräparation von Membranproteinen zur Strukturbestimmung mittels Kryo-TEM erleichtern, entwickelt. Es wurde eine Oberflächenbeschichtung im Nanometerbereich hergestellt, welche die Peripherie eines Proteins nachbildet und als Protein-Modelloberfläche genutzt wurde. Außerdem wurde ein Verfahren zur Herstellung simplen strukturierter Nanomembranen untersucht, welches als Basis für die zukünftige Entwicklung von Herstellungsverfahren für einfache biologische Modellmembranen dienen könnte.

In zwei weiteren Projekten wurden biomimetische Systeme aufgebaut, welche die Oberfläche eines Biomoleküls oder biologischen Ensembles nachahmen und hierdurch deren Untersuchung ermöglichen. Hier wurden Systeme zur einfachen Nachbildung biologischer Membranen oder Proteinoberflächen betrachtet (siehe Abbildung Z1)

Eine wichtige Methode zur Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von Biomolekülen ist die Kryo-TEM. Die TEM ermöglicht eine direkte Abbildung von Objekten, indem diese mit Elektronen durchstrahlt werden. Seit wenigen Jahren ist auf diese Weise die Bestimmung der Struktur von Proteinen mit einer Auflösung im einstelligen Ångström-Bereich möglich. Ausschlaggebend hierfür war die Entwicklung einer neuen Generation von Elektronendetektoren und Verbesserungen in der Bildverarbeitung. Jedoch ist die Mikroskopie vieler Biomoleküle trotz des Fortschrittes schwierig, da die Präparation von qualitativ hochwertigen Proben problematisch ist.

Zur Mikroskopie werden die Biomoleküle in wenige Mikrometer großen Löchern eines amorphen Kohlenstofflochfilms mittels einer wenige Nanometer dicken Schicht aus amorphem Eis fixiert. Hierfür wird ein dünner Film einer wässrigen Probe auf den Kohlenstofflochfilm aufgebracht und gefroren. Insbesondere für Membranproteine ist die Herstellung derartiger Proben schwierig, da die Proteinpartikel zur Aggregation und Adsorption an dem Kohlenstofflochfilm neigen, wodurch keine Partikel in den Löchern des Kohlenstofffilms auftreten, welche mikroskopiert werden können.

In dieser Arbeit wurden Materialien zur Verbesserung der Präparation von Proteinen für die Kryo-TEM entwickelt. Es wurden hierfür verschiedene biorepulsive Materialien, auch solche, welche eine spezifische Anbindung der Biomoleküle erlauben, untersucht. Da in der TEM die Probe durchstrahlt wird, eignen sich Nanometer dünne Membranen dieser Materialien als Trägermaterial für die Biomoleküle, da sie nur zu einem geringen Hintergrund führen. Zum einen wurden Nanomembranen durch die chemische Quervernetzung von Nanometer dicken Hydrogelfilmen mit verschiedenen quervernetzenden Molekülen hergestellt. Zum anderen wurden Trägerfilme, wie amorphe Kohlenstofffilme oder Kohlenstoffnanomembranen (engl. *carbon nanomembranes*, CNM) biorepulsiv funktionalisiert. Darüber hinaus wurde eine Nitrilotriessigsäure(NTA)-funktionalisierte Hydrogel-beschichtete Nanomembran entwickelt, welche markierte Proteine selektiv über einen His-Tag bindet.

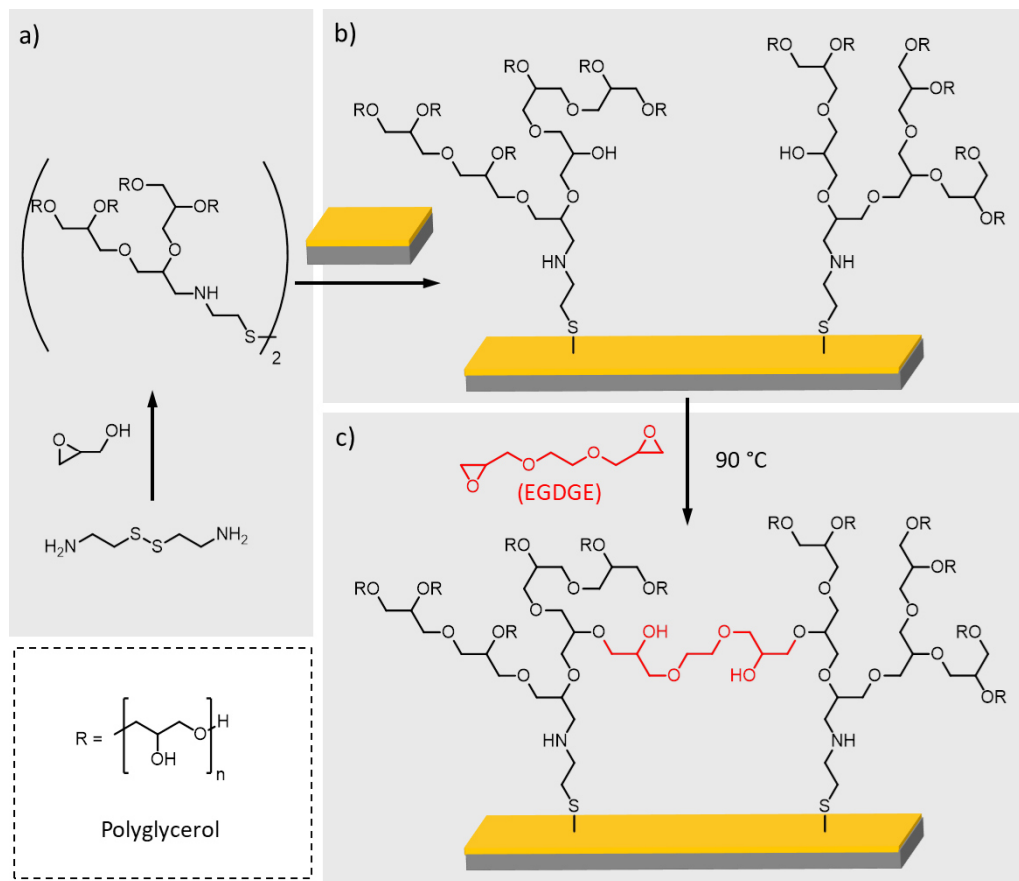


Abbildung Z2: a) Synthese des Disulfid-funktionalisierten Polyglycerolderivates. b) Abscheidung auf einer Goldoberfläche. c) Quervernetzung zweier PG-Dendrimere mit EGDGE (rot). Durch die Reaktion mit EGDGE wird das PG quervernetzt, wobei die Anzahl an Hydroxygruppen im Polymer erhalten bleibt. Hierdurch kann die Schicht durch eine weitere Reaktion der Hydroxygruppen mit EGDGE-Molekülen zusätzlich verstärkt werden.

Zur Herstellung dünner, freistehender Membranen aus einem biorepulsiven Hydrogel wurden Polyglycerol(PG)-Filme auf Goldoberflächen hergestellt und quervernetzt. Zur Herstellung der PG-Filme wurde ein Disulfid-haltiges PG-Dendrimer synthetisiert, welches aufgrund der Thiolgruppe an Goldoberflächen bindet und eine Monolage bildet (siehe Abbildung Z2, a-b). Zur Herstellung der Membranen wurden verschiedene Quervernetzer untersucht, welche zu verschiedenartigen Membranstrukturen führen. Der eingesetzte Ethylenglykoldiglycidylether (EGDGE) ermöglicht nicht nur die Quervernetzung der PG-Schicht, sondern kann aufgrund seiner zwei Epoxid-Gruppen polymerisieren und das Hydrogel weiter aufbauen (siehe Abbildung Z2, b-c). Es wurden optimale Bedingungen für die Reaktion des Quervernetzers gefunden. Durch Variation der Reaktionszeit und Temperatur ist es möglich, die Dicke der resultierenden Membran einzustellen. Es konnten wenige Nanometer dicke, kontinuierliche, freistehende

Membranen erhalten werden, welche unter den typischen Bedingungen eines TEM-Experimentes stabil sind.

Die Verwendung des reaktiven Tetraethylglykolderivates 1,11-Di(mesyloxy)-3,6,9-trioxaundecan (Ms_2TEG) konnten selbst-perforierende Hydrogel-Nanomembranen (SPHyNs) hergestellt werden (siehe Abbildung Z3, a). Der Quervernetzer, welcher keinen Aufbau der Hydrogel-Schicht durch Polymerisation erlaubt, führt zu etwa 2 nm dicken Membranen, welche über den Kohlenstofflochfilm gelegt werden können und diesen abdecken. Die Adsorption von Biomolekülen an dem Kohlenstofffilm wird hierdurch stark reduziert. Über den Löchern des Kohlenstofffilms reißt die Membran auf (Selbstperforation) wobei sich eine spinnennetzartige Struktur ausbildet (siehe Abbildung Z3, b). Diese hat den Vorteil, dass sie den Wasserfilm in den Löchern während der Probenpräparation stabilisiert und die Proteine homogen in einer sehr dünnen Eisschicht in den Löchern des Netzwerkes auftreten.

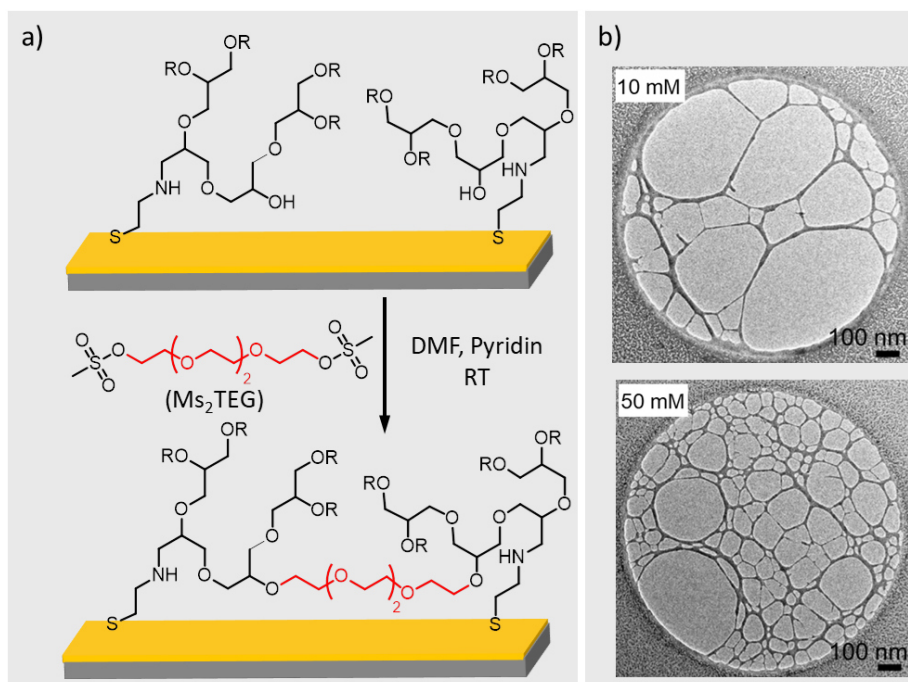


Abbildung Z3: Herstellung der selbst-perforierenden Hydrogel-Nanomembranen: a) Quervernetzung einer PG-Schicht mit Ms_2TEG . b) TEM-Aufnahme quervernetzter PG-Membranen nach dem Transfer auf TEM-Netze mit Kohlenstofflochfilmen. Die Membranen reißen über den Löchern auf. In Abhängigkeit von der verwendeten Quervernetzerkonzentration (hier 50 und 10 mM) wird ein eng- bzw. grobmaschigeres Netz erhalten.³⁵

Die erhaltenen Membranen wurden oberflächenanalytisch und elektronenmikroskopisch eingehend charakterisiert, insbesondere hinsichtlich ihrer Selbstperforation in Abhängigkeit von der Stärke der Quervernetzung und der daraus resultierenden Netzstruktur. Die Verwendung von SPHyNs bei der Herstellung von Proben zweier Membranproteine, deren Präparation zuvor nicht oder nur mit großem Aufwand möglich war, erlaubte die Berechnung deren dreidimensionaler Struktur mit einer Auflösung im Ångström-Bereich.

Eine weitere Methode zur Verbesserung der Proteinverteilung basiert auf der nicht-kovalenten Funktionalisierung des amorphen Kohlenstofflochfilms mit PG-Pyren-Derivaten. Es konnte gezeigt werden, dass sich PG-Pyren-Derivate eignen, um stabile Oberflächenbeschichtungen auf amorphen Kohlenstofffilmen zu erhalten. Die entwickelte Methode ermöglicht die einfache Beschichtung der Kohlenstoffoberfläche mit einem biorepulsiven PG-Hydrogel, wodurch die Adsorption der Proteine an diesem minimiert wird. Dies führt dazu, dass die Proteine gleichmäßig verteilt in dem Wasserfilm in den Löchern des Kohlenstofflochfilms vorkommen und dort gefroren werden können.

Darüber hinaus wurde mit der Methode ein System, bestehend aus einem Hydrogel-funktionalisierten Kohlenstoffnanoröhren-Netzwerk (HyCaNets), hergestellt (siehe Abbildung Z4). Ein bekanntes Problem während eines Kryo-TEM-Experiments ist die elektronenstrahlinduzierte Bewegung der zu mikroskopierenden Partikel im Eis. Mithilfe eines Netzwerkes aus leitfähigen Kohlenstoffnanoröhren, welche die Löcher des Kohlenstofflochfilms überspannen, können Ladungen abgeführt und die elektronenstrahlinduzierte Bewegung reduziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die für die Funktionalisierung der Kohlenstofffilme verwendeten PG-Pyren-Derivate auch für die Funktionalisierung leitfähiger Kohlenstoffnanoröhren eignen. Um eine Adsorption an den Nanoröhren zu verhindern, wurden diese ebenfalls mit dem Hydrogel funktionalisiert.

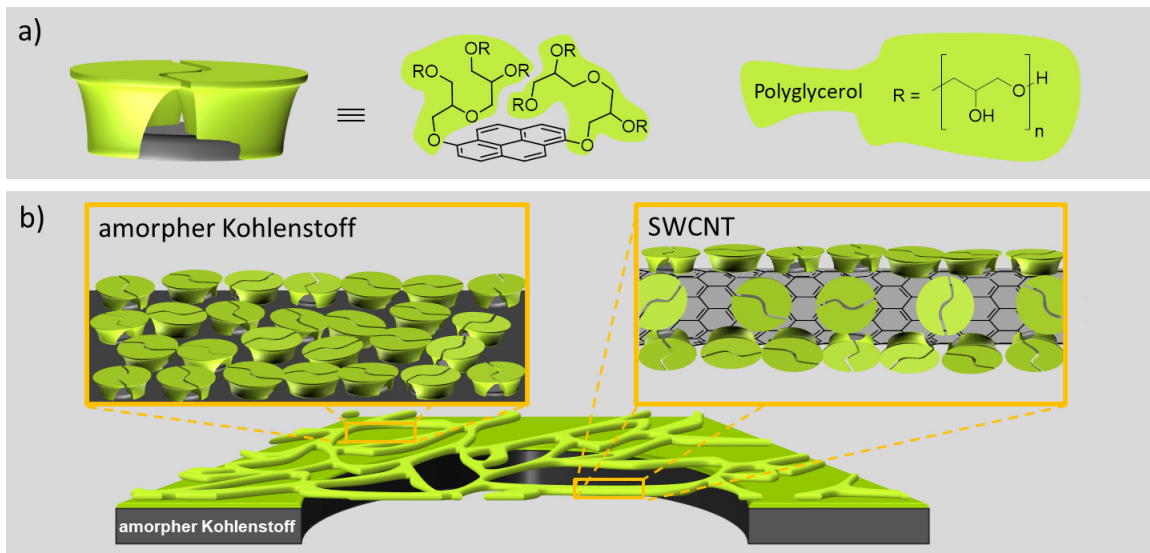


Abbildung Z4: a) Pyren-haltiges PG-Derivat zur Funktionalisierung amorpher Kohlenstofffilme. b) Das PG-Pyren-Derivat bindet über die Pyren-Einheit an die Kohlenstoffoberflächen. Ein HyCaNet besteht aus einem TEM-Netz mit Kohlenstofflochfilm, dessen Löcher mit SWCNTs netzartig überspannt sind. Sowohl die SWCNTs wie auch der amorphe Kohlenstoff sind mit biorepulsivem PG beschichtet.¹⁴³

Anstatt Proteine freistehend in der amorphen Eisschicht zu präparieren, besteht die Möglichkeit, diese an einen dünnen kontinuierlichen Trägerfilm anzubinden. Kohlenstoffnanomembranen eignen sich aufgrund ihrer geringen Dicke (1-2 nm) bei gleichzeitig hoher mechanischer Stabilität als Trägermaterial. Sie lassen sich durch die Bestrahlung einer selbstanordnenden Monolage (SAM) mit Elektronen herstellen. In einem weiteren Projekt wurden derartige Kohlenstoffnanomembranen biorepulsiv mit einem PG-Hydrogel funktionalisiert, wodurch eine unspezifische Anbindung von Proteinen weitestgehend unterdrückt werden kann. Anschließend wurden die biorepulsiven Nanomembranen mit NTA-Einheiten als spezifische Erkennungsstellen zur Immobilisierung gewünschter Biomoleküle ausgestattet. Es wurde gezeigt, dass die selektive Anbindung von His-Tag markierten Proteinen aus einer Mischung mehrerer Biomoleküle möglich ist (siehe Abbildung Z5).

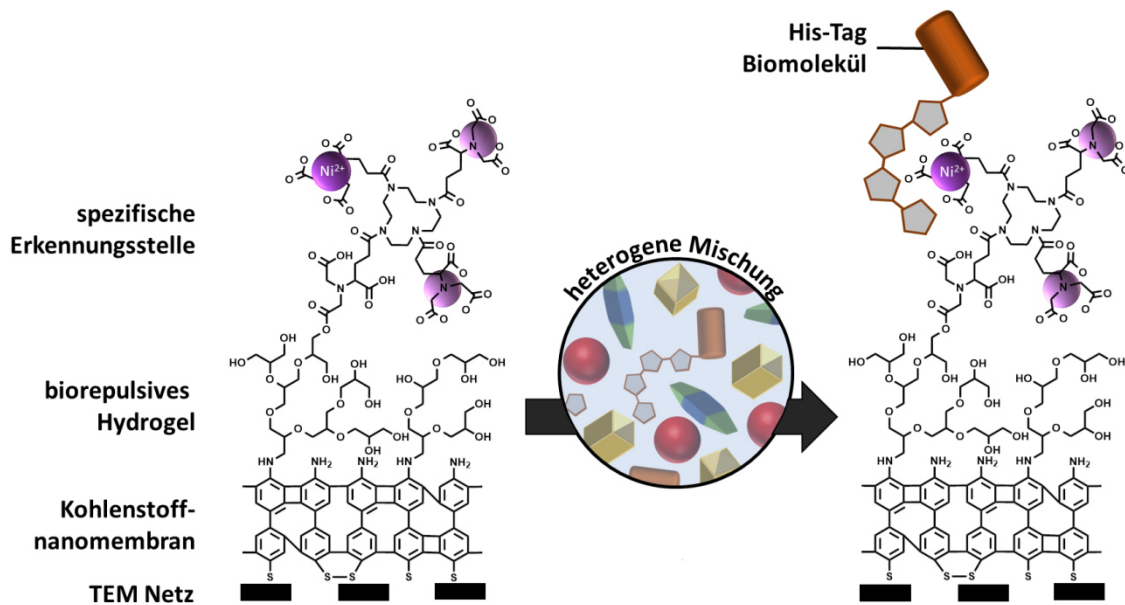


Abbildung Z5: Affinitäts-Netz: Mit einem PG-Hydrogel biorepulsiv beschichtete CNM, welche mit NTA-Gruppen funktionalisiert wurde, um spezifisch His-Tag markierte Biomoleküle aus einer heterogenen Mischung von Biomolekülen zu binden. Das an die Membran angebundene Biomolekül kann anschließend im TEM mikroskopiert werden.

Neben der Entwicklung von Materialien zur Untersuchung von Proteinen mittels Kryo-TEM wurden Beschichtungen hergestellt, welche die Oberfläche eines Biomoleküls oder eines Ensembles von Biomolekülen nachahmen. Diese Modelloberflächen sollten ebenfalls die Untersuchung von Eigenschaften der biologischen Systeme ermöglichen. Biologische Membranen bestehen aus einem Ensemble von Biomolekülen. Eine Vielzahl verschiedener Biomoleküle tritt in einer komplexen Anordnung in diesen dünnen Membranen auf. Es wurde versucht, strukturierte Membranen mit lokalen Variationen der physikalischen und chemischen Eigenschaften, jedoch weitaus weniger komplexen Aufbau, herzustellen. Die hergestellten Membranen mit biologisch relevanten Strukturen im Mikrometer- bis Zentimeterbereich, können nach weiterer Forschung als einfache Modellsysteme zur Nachahmung ihrer komplexen biologischen Vorbilder dienen.

Die bereits als Trägermaterial für die Kryo-TEM verwendeten CNMs wurden für die Herstellung strukturierter Modellmembranen untersucht. Durch die mehrfache direkte Laserstrukturierung (DLP) einer SAM mit jeweils anschließendem Auffüllen der bestrahlten Bereiche mit unterschiedlichen SAM-bildenden Molekülen konnten vielfach strukturierte SAMs hergestellt werden. Die Bestrahlung beliebiger Bereiche der Oberfläche, erlaubt die flexible Herstellung strukturierter SAMs im Mikrometerbereich.

Durch Quervernetzung dieser SAMs mittels Bestrahlung mit einem Elektronenstrahl konnten strukturierte Nanomembranen erhalten werden, welche als Basis für die zukünftige Entwicklung einfacher Modellmembranen für biologische Systeme dienen könnten (siehe Abbildung Z6).

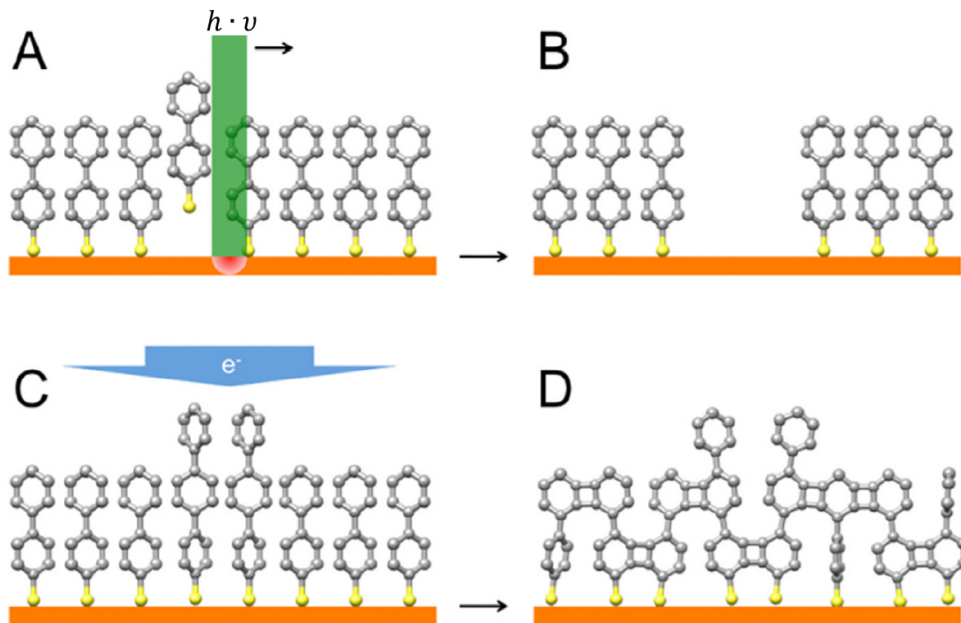


Abbildung Z6: Herstellung einer strukturierten CNM mittels DLP: Mithilfe eines gepulsten Laserstrahls werden Moleküle entlang eines Musters thermisch von der Oberfläche desorbiert (A). Daraus resultieren Lücken im SAM, welche anschließend mit einem anderen SAM-bildenden Molekül aufgefüllt werden können (B). Die strukturierte SAM wird abschließend mit Elektronen bestrahlt (C). Hierdurch quervernetzen die einzelnen aromatischen Moleküle und es entsteht eine strukturierte Nanomembran (D).²⁸

In einem weiteren Projekt wurde eine Modelloberfläche für die Bindungstasche des Proteins FimH, welches eine wichtige Rolle in der bakteriellen Adhäsion spielt, entwickelt. Die Arbeitsgruppe Lindhorst (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) versucht, diese Bindungstasche mit einem Photoschalter zu funktionalisieren, um eine Kontrolle der Substratbindung zu ermöglichen. Der Photoschalter soll hierzu an eine bestimmte Aminosäure an der Öffnung der Bindungstasche des Proteins ligiert werden. Die Verwendung eines auf die Ligationreaktion katalytisch wirkenden Substrates, welches in der Bindungstasche des Proteins bindet, sollte bewirken, dass nur die dort lokalisierte Aminosäure reagiert.

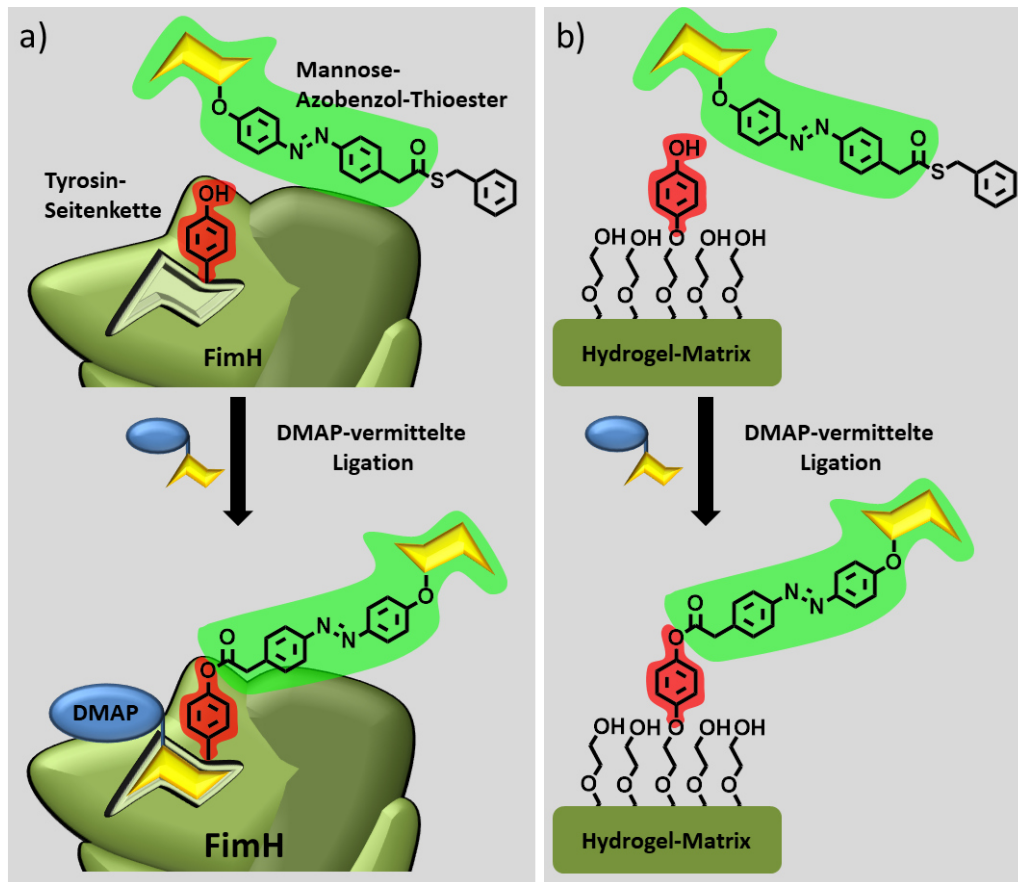


Abbildung Z7: Schematische Darstellung der Markierung der Tyrosin-Seitenkette des FimH (a) und der dazu entwickelten Modelloberfläche (b) mit einem Azobenzol-Photoschalter durch eine DMAP-vermittelte Ligationsstrategie: a) Zur gezielten Markierung einer Tyrosin-Seitenkette (rot) in der Nähe der Bindungstasche soll eine DMAP-vermittelte Ligationsstrategie verwendet werden. Ein Mannose-DMAP-Derivat (blau) wird eingesetzt, welches selektiv in der Tasche bindet und die Reaktion der Tyrosin-Seitenkette mit dem Mannose-Azobenzol-Thioester katalysiert, wodurch der Mannose-Azobenzol-Photoschalter (hellgrün) angebracht wird. b) Das Modellsystem zur Untersuchung der Anbindung einer Azobenzol-Einheit besteht aus einer biorepulsiven Hydrogel-Matrix, aus welcher eine Phenolgruppe (rot), vergleichbar der des Tyrosins, in die Lösung exponiert ist. Das Modellsystem ermöglicht die Untersuchung der Reaktion zur Anbindung der Azobenzol-Einheit an eine Tyrosin-haltige Proteinoberfläche durch Detektion der an die Oberfläche gebundenen Mannose mithilfe eines Bakterienadhäsionstests.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Lindhorst wurde ein Modellsystem entwickelt, welches dazu dient, herauszufinden, inwiefern eine Funktionalisierung einer Aminosäure mit der vorgeschlagenen Ligationsstrategie möglich ist. Das Modellsystem besteht aus einer biorepulsiven Hydrogel-Matrix, aus welcher die Seitenkette der Aminosäure Tyrosin in die Lösung exponiert ist (siehe Abbildung Z7). Die Substrat-katalysierte Reaktion der Aminosäuren-Seitenkette mit dem Photoschalter wurde mithilfe eines Bakterienadhäsionstests untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich die vorgeschlagene Ligationsstrategie unter Berücksichtigung von Nebenreaktionen zur Modifizierung des Proteins eignet.

Es konnten vier neuartige Systeme, welche die Probenpräparation zur Untersuchung von Proteinen mittels Kryo-TEM vereinfachen, entwickelt werden. Die Ergebnisse sind von wissenschaftlicher Relevanz, da sie die Strukturbestimmung vieler Proteine deutlich vereinfachen und hierdurch beschleunigen können. Außerdem wurden biomimetische Beschichtungen entwickelt, welche entweder Proteinoberflächen oder Biomembranen nachahmen. Die entwickelten Modellsysteme erweitern das Spektrum an Möglichkeiten, Biomoleküle oder biologische Ensembles zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

1. F. U. Hartl. Protein Misfolding Diseases. *Annu. Rev. Biochem.* **2017**, 86, 21–26.
2. C. Bertozzi. Atoms out of Blobs: CryoEM Takes the Nobel Prize in Chemistry. *ACS Cent. Sci.* **2017**, 3, 1056–1056.
3. J. Dubochet, M. Adrian, J.-J. Chang, J.-C. Homo, J. Lepault, A. W. McDowell, P. Schultz. Cryo-Electron Microscopy of Vitrified Specimens. *Q. Rev. Biophys.* **1988**, 21, 129–228.
4. M. Adrian, J. Dubochet, J. Lepault, A. W. McDowell. Cryo-Electron Microscopy of Viruses. *Nature* **1984**, 308, 32–36.
5. X. Bai, G. McMullan, S. H. W. Scheres. How Cryo-EM Is Revolutionizing Structural Biology. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, 40, 49–57.
6. R. F. Thompson, M. Walker, C. A. Siebert, S. P. Muench, N. A. Ranson. An Introduction to Sample Preparation and Imaging by Cryo-Electron Microscopy for Structural Biology. *Methods* **2016**, 100, 3–15.
7. E. Migliorini, D. Thakar, R. Sadir, T. Pleiner, F. Baleux, H. Lortat-Jacob, L. Coche-Guerente, R. P. Richter. Well-Defined Biomimetic Surfaces to Characterize Glycosaminoglycan-Mediated Interactions on the Molecular, Supramolecular and Cellular Levels. *Biomaterials* **2014**, 35, 8903–8915.
8. T. Weber, V. Chandrasekaran, I. Stamer, M. B. Thygesen, A. Terfort, T. K. Lindhorst. Switching of Bacterial Adhesion to a Glycosylated Surface by Reversible Reorientation of the Carbohydrate Ligand. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 14583–14586.
9. D. A. Skoog, J. J. Leary, D. Brendel, S. Hoffstetter-Kuhn. Instrumentelle Analytik: Grundlagen - Geräte - Anwendungen; Springer-Lehrbuch; Springer-Verlag, 1996; pp 606–608.
10. J. Thomas, T. Gemming. *Analytische Transmissionselektronenmikroskopie*; Springer-Verlag Wien, 2013.
11. E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Für Mikrosk. Anat.* **1873**, 9, 413–418.
12. P. J. Goodhew, F. J. Humphreys, R. Beanland. *Electron Microscopy and Analysis*; Taylor & Francis: London, 2001.
13. E. V. Orlova, H. R. Saibil. Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy. *Chem. Rev.* **2011**, 111, 7710–7748.
14. Quantifoil Micro Tools GmbH. Kohlenstofflochfilm (JPEG Image, 500 × 400 pixels) <http://www.quantifoil.com/images/r12.jpg> (accessed Jul 10, 2018).
15. K. Murata, M. Wolf. Cryo-Electron Microscopy for Structural Analysis of Dynamic Biological Macromolecules. *Biochim. Biophys. Acta* **2018**, 1862, 324–334.
16. U. Jakubowski, M. Mende. Preparation of Ultrathin Amorphous Ice Films for Cryo-Electron Microscopy. *J. Microsc.* **1991**, 161, 241–252.
17. J. Dubochet, A. W. McDowell. Vitrification of Pure Water for Electron Microscopy. *J. Microsc.* **1981**, 124, 3–4.
18. E. Cao, Y. Chen, Z. Cui, P. R. Foster. Effect of Freezing and Thawing Rates on Denaturation of Proteins in Aqueous Solutions. *Biotechnol Bioeng* **2003**, 82, 684–690.
19. R. S. Pantelic, J. C. Meyer, U. Kaiser, H. Stahlberg. The Application of Graphene as a Sample Support in Transmission Electron Microscopy. *Solid State Commun.* **2012**, 152, 1375–1382.

20. D. Rhinow, M. Bünenfeld, N.-E. Weber, A. Beyer, A. Götzhäuser, W. Kühlbrandt, N. Hampp, A. Turchanin. Energy-Filtered Transmission Electron Microscopy of Biological Samples on Highly Transparent Carbon Nanomembranes. *Ultramicroscopy* **2011**, 111, 342–349.
21. N. Meyerbröcker, Z.-A. Li, W. Eck, M. Zharnikov. Biocompatible Nanomembranes Based on PEGylation of Cross-Linked Self-Assembled Monolayers. *Chem. Mater.* **2012**, 24, 2965–2972.
22. N. Meyerbröcker, M. Zharnikov. Ultraflexible, Freestanding Nanomembranes Based on Poly(Ethylene Glycol). *Adv. Mater.* **2014**, 26, 3328–3332.
23. D. F. Kelly, D. Dukovski, T. Walz. Strategy for the Use of Affinity Grids to Prepare Non-His-Tagged Macromolecular Complexes for Single-Particle Electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* **2010**, 400, 675–681.
24. J. Quispe, J. Damiano, S. E. Mick, D. P. Nackashi, D. Fellmann, T. G. Ajero, B. Carragher, C. S. Potter. An Improved Holey Carbon Film for Cryo-Electron Microscopy. *Microsc. Microanal.* **2007**, 13, 365–371.
25. M. Cheung, N. Kajimura, F. Makino, M. Ashihara, T. Miyata, T. Kato, K. Namba, A. J. Blocker. A Method to Achieve Homogeneous Dispersion of Large Transmembrane Complexes within the Holes of Carbon Films for Electron Cryomicroscopy. *J. Struct. Biol.* **2013**, 182, 51–56.
26. A. Turchanin, A. Götzhäuser. Carbon Nanomembranes. *Adv. Mater.* 28, 6075–6103.
27. A. Turchanin, A. Götzhäuser. Carbon Nanomembranes from Self-Assembled Monolayers: Functional Surfaces without Bulk. *Prog. Surf. Sci.* **2012**, 87, 108–162.
28. N. Frese, J. Scherr, A. Beyer, A. Terfort, A. Götzhäuser, N. Hampp, D. Rhinow. Multicomponent Patterned Ultrathin Carbon Nanomembranes by Laser Ablation. *Appl. Surf. Sci.* **2018**, 427, 126–130.
29. W. Eck, A. Küller, M. Grunze, B. Völkel, A. Götzhäuser. Freestanding Nanosheets from Crosslinked Biphenyl Self-Assembled Monolayers. *Adv. Mater.* 17, 2583–2587.
30. C. T. Nottbohm, R. Sopher, M. Heilemann, M. Sauer, A. Götzhäuser. Fluorescently Labeled 1 Nm Thin Nanomembranes. *J. Biotechnol.* **2010**, 149, 267–271.
31. P. Angelova, H. Vieker, N.-E. Weber, D. Matei, O. Reimer, I. Meier, S. Kurasch, J. Biskupek, D. Lorbach, K. Wunderlich, et al. A Universal Scheme to Convert Aromatic Molecular Monolayers into Functional Carbon Nanomembranes. *ACS Nano* **2013**, 7, 6489–6497.
32. H. Watanabe, R. Vendamme, T. Kunitake. Development of Fabrication of Giant Nanomembranes. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2007**, 80, 433–440.
33. P. Lindemann, M. Tsotsalas, S. Shishatskiy, V. Abetz, P. Krolla-Sidenstein, C. Azucena, L. Monnereau, A. Beyer, A. Götzhäuser, V. Mugnaini, et al. Preparation of Freestanding Conjugated Microporous Polymer Nanomembranes for Gas Separation. *Chem. Mater.* **2014**, 26, 7189–7193.
34. W. Cheng, M. J. Campolongo, S. J. Tan, D. Luo. Freestanding Ultrathin Nanomembranes via Self-Assembly. *Nano Today* **2009**, 4, 482–493.
35. J. Scherr, K. Parey, N. Klusch, B. J. Murphy, S. Balsler, A. Neuhaus, V. Zickermann, W. Kühlbrandt, A. Terfort, D. Rhinow. Self-Perforated Hydrogel Nanomembranes Facilitate Structural Analysis of Proteins by Electron Cryo-Microscopy. *ACS Nano* **2017**, 11, 6467–6473.
36. J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103–1170.

37. A. Chandekar, S. K. Sengupta, J. E. Whitten. Thermal Stability of Thiol and Silane Monolayers: A Comparative Study. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, 256, 2742–2749.
38. E. Cortés, A. A. Rubert, G. Benitez, P. Carro, M. E. Vela, R. C. Salvarezza. Enhanced Stability of Thiolate Self-Assembled Monolayers (SAMs) on Nanostructured Gold Substrates. *Langmuir* **2009**, 25, 5661–5666.
39. M. H. Schoenfisch, J. E. Pemberton. Air Stability of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Silver and Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4502–4513.
40. C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, R. C. Salvarezza. Self-Assembled Monolayers of Thiols and Dithiols on Gold: New Challenges for a Well-Known System. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1805–1834.
41. W. Niu, S. Zheng, D. Wang, X. Liu, H. Li, S. Han, J. Chen, Z. Tang, G. Xu. Selective Synthesis of Single-Crystalline Rhombic Dodecahedral, Octahedral, and Cubic Gold Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 697–703.
42. J. D. Andrade, V. Hlady. Protein Adsorption and Materials Biocompatibility: A Tutorial Review and Suggested Hypotheses. In *Biopolymers/Non-Exclusion HPLC*; Advances in Polymer Science; Springer, Berlin, Heidelberg, 1986; pp 1–63.
43. S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. De Gennes. Protein—Surface Interactions in the Presence of Polyethylene Oxide: I. Simplified Theory. *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 142, 149–158.
44. C. F. Wertz, M. M. Santore. Adsorption and Relaxation Kinetics of Albumin and Fibrinogen on Hydrophobic Surfaces: Single-Species and Competitive Behavior. *Langmuir* **1999**, 15, 8884–8894.
45. Habash Marc, Reid Gregor. Microbial Biofilms: Their Development and Significance for Medical Device—Related Infections. *J. Clin. Pharmacol.* **2013**, 39, 887–898.
46. T. R. Neu, K. C. Marshall. Bacterial Polymers: Physicochemical Aspects of Their Interactions at Interfaces. *J. Biomater. Appl.* **1990**, 5, 107–133.
47. M. Fletcher, D. C. Savage. Bacterial Adhesion: Mechanisms and Physiological Significance; Springer Science & Business Media, 2013; pp 142–145.
48. R. G. Chapman, E. Ostuni, M. N. Liang, G. Meluleni, E. Kim, L. Yan, G. Pier, H. S. Warren, G. M. Whitesides. Polymeric Thin Films That Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacteria. *Langmuir* **2001**, 17, 1225–1233.
49. Pierre Lembre, Cécile Lorentz, Patrick Di Martino. Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. In *The Complex World of Polysaccharides*; IntechOpen: Rijeka, 2012; pp 171–192.
50. T. R. Garrett, M. Bhakoo, Z. Zhang. Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces. *Prog. Nat. Sci.* **2008**, 18, 1049–1056.
51. P. Kingshott, H. J. Griesser. Surfaces That Resist Bioadhesion. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1999**, 4, 403–412.
52. F. Hizal, I. Zhuk, S. Sukhishvili, H. J. Busscher, H. C. van der Mei, C.-H. Choi. Impact of 3D Hierarchical Nanostructures on the Antibacterial Efficacy of a Bacteria-Triggered Self-Defensive Antibiotic Coating. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, 7, 20304–20313.
53. J. A. Callow, M. E. Callow. Trends in the Development of Environmentally Friendly Fouling-Resistant Marine Coatings. *Nat. Commun.* **2011**, 2:244, 1–8.
54. T. Becherer, C. Grunewald, V. Engelschalt, G. Multhaupt, T. Risse, R. Haag. Polyglycerol Based Coatings to Reduce Non-Specific Protein Adsorption in Sample Vials and on SPR Sensors. *Anal. Chim. Acta* **2015**, 867, 47–55.
55. H. Frey, R. Haag. Dendritic Polyglycerol: A New Versatile Biocompatible Material. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, 90, 257–267.

56. C. Siegers, M. Biesalski, R. Haag. Self-Assembled Monolayers of Dendritic Polyglycerol Derivatives on Gold That Resist the Adsorption of Proteins. *Chem. - Eur. J.* **2004**, 10, 2831–2838.
57. E. Burakowska, J. R. Quinn, S. C. Zimmerman, R. Haag. Cross-Linked Hyperbranched Polyglycerols as Hosts for Selective Binding of Guest Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 10574–10580.
58. Y. L. Jeyachandran, N. Meyerbröcker, A. Terfort, M. Zharnikov. Maskless Ultraviolet Projection Lithography with a Biorepelling Monomolecular Resist. *J. Phys. Chem. C* **2015**, 119, 494–501.
59. Y. L. Jeyachandran, T. Weber, A. Terfort, M. Zharnikov. Application of Long Wavelength Ultraviolet Radiation for Modification and Patterning of Protein-Repelling Monolayers. *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 5824–5830.
60. Y. L. Jeyachandran, A. Terfort, M. Zharnikov. Controlled Modification of Protein-Repelling Self-Assembled Monolayers by Ultraviolet Light: The Effect of the Wavelength. *J. Phys. Chem. C* **2012**, 116, 9019–9028.
61. P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, P. E. Laibinis. Molecular Conformation in Oligo (Ethylene Glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability to Resist Protein Adsorption. *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 426–436.
62. R. L. C. Wang, H. J. Kreuzer, M. Grunze. Molecular Conformation and Solvation of Oligo(Ethylene Glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers and Their Resistance to Protein Adsorption. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 9767–9773.
63. S. Stumpe, M. Weide, R. Breves, N. Wrubbel, M. Lüken, J. Boy. Reduction of the Formation of Biofilm by Means of Multifunctional Copolymers. US20100249249A1, September 30, 2010.
64. M. Morra, C. Cassineli. Non-Fouling Properties of Polysaccharide-Coated Surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1999**, 10, 1107–1124.
65. C. Mao, Y. Qiu, H. Sang, H. Mei, A. Zhu, J. Shen, S. Lin. Various Approaches to Modify Biomaterial Surfaces for Improving Hemocompatibility. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, 110, 5–17.
66. T. Weber, M. Bechthold, T. Winkler, J. Dauselt, A. Terfort. Direct Grafting of Anti-Fouling Polyglycerol Layers to Steel and Other Technically Relevant Materials. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, 111, 360–366.
67. T. Weber, Y. Gies, A. Terfort. Bacteria-Repulsive Polyglycerol Surfaces by Grafting Polymerization onto Aminopropylated Surfaces. *Langmuir* **2012**, 28, 15916–15921.
68. N. P. Desai, J. A. Hubbell. Solution Technique to Incorporate Polyethylene Oxide and Other Water-Soluble Polymers into Surfaces of Polymeric Biomaterials. *Biomaterials* **1991**, 12, 144–153.
69. D. J. Vanderah, G. Valincius, C. W. Meuse. Self-Assembled Monolayers of Methyl 1-Thiahexa(Ethylene Oxide) for the Inhibition of Protein Adsorption. *Langmuir* **2002**, 18, 4674–4680.
70. T. Hayashi, Y. Tanaka, Y. Koide, M. Tanaka, M. Hara. Mechanism Underlying Bioinertness of Self-Assembled Monolayers of Oligo(Ethylene glycol)-Terminated Alkanethiols on Gold: Protein Adsorption, Platelet Adhesion, and Surface Forces. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14, 10196–10206.
71. A. J. Pertsin, M. Grunze. Computer Simulation of Water near the Surface of Oligo(Ethylene Glycol)-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2000**, 16, 8829–8841.
72. M. Witting, M. Molina, K. Obst, R. Plank, K. M. Eckl, H. C. Hennies, M. Calderón, W. Frieß, S. Hedtrich. Thermosensitive Dendritic Polyglycerol-Based Nanogels for

- Cutaneous Delivery of Biomacromolecules. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, 11, 1179–1187.
73. A. Sunder, R. Hanselmann, H. Frey, R. Mülhaupt. Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization. *Macromolecules* **1999**, 32, 4240–4246.
 74. E. J. Vandenberg. Polymerization of Glycidol and Its Derivatives: A New Rearrangement Polymerization. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* **1985**, 23, 915–949.
 75. T. H. Rider, A. J. Hill. Studies of Glycidol. I. Preparation from Glycerol Monochlorohydrin. *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, 52, 1521–1527.
 76. C. Gao, D. Yan. Hyperbranched Polymers: From Synthesis to Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 183–275.
 77. M. Khan, W. T. Huck. Hyperbranched Polyglycidol on Si/SiO₂ Surfaces via Surface-Initiated Polymerization. *Macromolecules* **2003**, 36, 5088–5093.
 78. E. Moore, B. Delalat, R. Vasani, G. McPhee, H. Thissen, N. H. Voelcker. Surface-Initiated Hyperbranched Polyglycerol as an Ultralow-Fouling Coating on Glass, Silicon, and Porous Silicon Substrates. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 15243–15252.
 79. P.-R. Chen, T.-C. Wang, S.-T. Chen, H.-Y. Chen, W.-B. Tsai. Development of Antifouling Hyperbranched Polyglycerol Layers on Hydroxyl Poly-p-Xylylene Coatings. *Langmuir* **2017**, 33, 14657–14662.
 80. Q. Wei, S. Krysiak, K. Achazi, T. Becherer, P.-L. M. Noeske, F. Paulus, H. Liebe, I. Grunwald, J. Dervede, A. Hartwig, et al. Multivalent Anchored and Crosslinked Hyperbranched Polyglycerol Monolayers as Antifouling Coating for Titanium Oxide Surfaces. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2014**, 122, 684–692.
 81. Weinhart Marie, Becherer Tobias, Schnurbusch Nicolai, Schwibbert Karin, Kunte Hans-Jörg, Haag Rainer. Linear and Hyperbranched Polyglycerol Derivatives as Excellent Bioinert Glass Coating Materials. *Adv. Eng. Mater.* **2011**, 13, B501–B510.
 82. M. C. Lukowiak, S. Wettmarshausen, G. Hidde, P. Landsberger, V. Boenke, K. Rodenacker, U. Braun, J. F. Friedrich, A. A. Gorbushina, R. Haag. Polyglycerol Coated Polypropylene Surfaces for Protein and Bacteria Resistance. *Polym. Chem.* **2015**, 6, 1350–1359.
 83. M. Wyszogrodzka, R. Haag. Synthesis and Characterization of Glycerol Dendrons, Self-Assembled Monolayers on Gold: A Detailed Study of Their Protein Resistance. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 1043–1054.
 84. D. Wilms, S.-E. Stiriba, H. Frey. Hyperbranched Polyglycerols: From the Controlled Synthesis of Biocompatible Polyether Polyols to Multipurpose Applications. *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 129–141.
 85. S. Song, Y. Qin, Y. He, Q. Huang, C. Fan, H.-Y. Chen. Functional Nanoprobes for Ultrasensitive Detection of Biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4234–4243.
 86. S. Herrwerth, T. Rosendahl, C. Feng, J. Fick, W. Eck, M. Himmelhaus, R. Dahint, M. Grunze. Covalent Coupling of Antibodies to Self-Assembled Monolayers of Carboxy-Functionalized Poly(Ethylene Glycol): Protein Resistance and Specific Binding of Biomolecules. *Langmuir* **2003**, 19, 1880–1887.
 87. D. S. Waugh. Making the Most of Affinity Tags. *Trends Biotechnol.* **2005**, 23, 316–320.
 88. X. Zhao, G. Li, S. Liang. Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *J. Anal. Methods Chem.* **2013**, 2013, 1–8.
 89. X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, Y. Sun. Sensitive Optical Biosensors for Unlabeled Targets: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 620, 8–26.

90. Young Carissa L., Britton Zachary T., Robinson Anne S. Recombinant Protein Expression and Purification: A Comprehensive Review of Affinity Tags and Microbial Applications. *Biotechnol. J.* **2012**, *7*, 620–634.
91. E. K. M. Ueda, P. W. Gout, L. Morganti. Current and Prospective Applications of Metal Ion–Protein Binding. *J. Chromatogr. A* **2003**, *988*, 1–23.
92. E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher. New Metal Chelate Adsorbent Selective for Proteins and Peptides Containing Neighbouring Histidine Residues. *J. Chromatogr. A* **1987**, *411*, 177–184.
93. S. Lata, A. Reichel, R. Brock, R. Tampé, J. Piehler. High-Affinity Adaptors for Switchable Recognition of Histidine-Tagged Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205–10215.
94. H. Fujiwara. *Spectroscopic Ellipsometry: Principles and Applications*; John Wiley & Sons, 2007.
95. H. G. Tompkins, A. I. Eugene. *Handbook of Ellipsometry*, 1st Edition.; Springer-Verlag GmbH & Co. KG: Heidelberg, 2005.
96. De Feijter J. A., Benjamins J., Veer F. A. Ellipsometry as a Tool to Study the Adsorption Behavior of Synthetic and Biopolymers at the Air–Water Interface. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1759–1772.
97. F. L. McCrackin, E. Passaglia, R. R. Stromberg, H. L. Steinberg. Treasure of the Past VII: Measurement of the Thickness and Refractive Index of Very Thin Films and the Optical Properties of Surfaces by Ellipsometry. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* **2001**, *106*, 589–603.
98. T E Jenkins. Multiple-Angle-of-Incidence Ellipsometry. *J. Phys. Appl. Phys.* **1999**, *32*, R45–R56.
99. A. J. Tudos, R. B. M. Schasfoort. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1968.
100. O. S. Wolfbeis, J. Homola. *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2006.
101. W. Demtröder. *Experimentalphysik 2*, 6th ed.; Springer-Lehrbuch; Springer Berlin Heidelberg, 2009.
102. P. R. Griffiths, J. A. D. Haseth, J. D. Winefordner. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*; Wiley John + Sons, 2007.
103. G. Gauglitz, D. S. Moore. *Handbook of Spectroscopy*; John Wiley & Sons, 2014.
104. V. P. Tolstoy, I. V. Chernyshova, V. A. Skryshevsky. *Handbook of Infrared Spectroscopy of Ultrathin Films: Tolstoy/Infrared Spectroscopy*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2003.
105. S. Hüfner. *Photoelectron Spectroscopy: Principles and Applications*, 3rd ed.; Advanced Texts in Physics; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2003.
106. E. Nogales. The Development of Cryo-EM into a Mainstream Structural Biology Technique. *Nat. Methods* **2015**, *13*, 24–27.
107. W. Kühlbrandt. The Resolution Revolution. *Science* **2014**, *343*, 1443.
108. J. R. Meyerson, P. Rao, J. Kumar, S. Chittori, S. Banerjee, J. Pierson, M. L. Mayer, S. Subramaniam. Self-Assembled Monolayers Improve Protein Distribution on Holey Carbon Cryo-EM Supports. *Sci. Rep.* **2014**, *4*:7084, 1–5.
109. J. Zheng, L. A. Smith Callahan, J. Hao, K. Guo, C. Wesdemiotis, R. A. Weiss, M. L. Becker. Strain-Promoted Cross-Linking of PEG-Based Hydrogels via Copper-Free Cycloaddition. *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 1071–1073.
110. J. Maitra, V. K. Shukla. Cross-Linking in Hydrogels - A Review. *Am. J. Polym. Sci.* **2014**, *4*, 25–31.

111. N. Li, R. Bai. A Novel Amine-Shielded Surface Cross-Linking of Chitosan Hydrogel Beads for Enhanced Metal Adsorption Performance. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, 44, 6692–6700.
112. G. Vargas, J. L. Acevedo, J. López, J. Romero. Study of Cross-Linking of Gelatin by Ethylene Glycol Diglycidyl Ether. *Mater. Lett.* **2008**, 62, 3656–3658.
113. R. Rodríguez, C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro. Cationic Cellulose Hydrogels: Kinetics of the Cross-Linking Process and Characterization as PH-/Ion-Sensitive Drug Delivery Systems. *J. Controlled Release* **2003**, 86, 253–265.
114. Y.-S. Shon, T. R. Lee. Chelating Self-Assembled Monolayers on Gold Generated from Spiroalkanedithiols. *Langmuir* **1999**, 15, 1136–1140.
115. Y. Yuan, C. M. Yam, O. E. Shmakova, R. Colorado, M. Graupe, H. Fukushima, H. J. Moore, T. R. Lee. Solution-Phase Desorption of Self-Assembled Monolayers on Gold Derived From Terminally Perfluorinated Alkanethiols. *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 19749–19760.
116. N. Garg, E. Carrasquillo-Molina, T. R. Lee. Self-Assembled Monolayers Composed of Aromatic Thiols on Gold: Structural Characterization and Thermal Stability in Solution. *Langmuir* **2002**, 18, 2717–2726.
117. J. B. Schlenoff, M. Li, H. Ly. Stability and Self-Exchange in Alkanethiol Monolayers. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 12528–12536.
118. S. Balsler. Stabilisierung von Polyglycerolfilmen Durch Quervernetzung. Bachelorarbeit, Goethe-Universität Frankfurt: Frankfurt am Main, 2016.
119. A. Turchanin, A. Beyer, C. T. Nottbohm, X. Zhang, R. Stosch, A. Sologubenko, J. Mayer, P. Hinze, T. Weimann, A. Gölzhäuser. One Nanometer Thin Carbon Nanosheets with Tunable Conductivity and Stiffness. *Adv. Mater.* **2009**, 21, 1233–1237.
120. C. J. Russo, L. A. Passmore. Ultrastable Gold Substrates for Electron Cryomicroscopy. *Science* **2014**, 346, 1377–1380.
121. C. J. Russo, L. A. Passmore. Controlling Protein Adsorption on Graphene for Cryo-EM Using Low-Energy Hydrogen Plasmas. *Nat. Methods* **2014**, 11, 649.
122. C. J. Russo, L. A. Passmore. Progress towards an Optimal Specimen Support for Electron Cryomicroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, 37, 81–89.
123. D. Rhinow, W. Kühlbrandt. Electron Cryo-Microscopy of Biological Specimens on Conductive Titanium–Silicon Metal Glass Films. *Ultramicroscopy* **2008**, 108, 698–705.
124. A. Hahn, K. Parey, M. Bublitz, D. J. Mills, V. Zickermann, J. Vonck, W. Kühlbrandt, T. Meier. Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Mol. Cell* **2016**, 63, 445–456.
125. J. Hirst. Mitochondrial Complex I. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, 82, 551–575.
126. C. S. Popeney, A. Setaro, R.-C. Mutihac, P. Bluemmel, B. Trappmann, J. Vonneman, S. Reich, R. Haag. Polyglycerol-Derived Amphiphiles for the Solubilization of Single-Walled Carbon Nanotubes in Water: A Structure–Property Study. *Chem Phys Chem* **2011**, 13, 203–211.
127. A. Setaro, C. S. Popeney, B. Trappmann, V. Datsyuk, R. Haag, S. Reich. Polyglycerol-Derived Amphiphiles for Single Walled Carbon Nanotube Suspension. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, 493, 147–150.
128. J. Liu, O. Bibari, P. Mailley, J. Dijon, E. Rouvière, F. Sauter-Starace, P. Caillat, F. Vinet, G. Marchand. Stable Non-Covalent Functionalisation of Multi-Walled Carbon Nanotubes by Pyrene–Polyethylene Glycol through π – π Stacking. *New J. Chem.* **2009**, 33, 1017–1024.

129. A. Setaro, C. S. Popeney, M. U. Witt, P. Bluemmel, M. Glaeske, R. Haag, S. Reich. Chiral Selectivity of Polyglycerol-Based Amphiphiles Incorporating Different Aromatic Cores. *Phys. Status Solidi B* **2015**, 252, 2536–2540.
130. J.-T. Sun, C.-Y. Hong, C.-Y. Pan. Surface Modification of Carbon Nanotubes with Dendrimers or Hyperbranched Polymers. *Polym. Chem.* **2011**, 2, 998–1007.
131. L. Xu, X. Yang. Molecular Dynamics Simulation of Adsorption of Pyrene–Polyethylene Glycol onto Graphene. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, 418, 66–73.
132. B. A. Fickel. Entwicklung Eines Konzepts Zur Biorepulsiven Ausstattung von Graphenoberflächen. Masterarbeit, Goethe-Universität Frankfurt: Frankfurt am Main, 2015.
133. M. M. J. Treacy, T. W. Ebbesen, J. M. Gibson. Exceptionally High Young's Modulus Observed for Individual Carbon Nanotubes. *Nature* **1996**, 381, 678–680.
134. R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. de Heer. Carbon Nanotubes--the Route Toward Applications. *Science* **2002**, 297, 787–792.
135. T. W. Ebbesen, H. J. Lezec, H. Hiura, J. W. Bennett, H. F. Ghaemi, T. Thio. Electrical Conductivity of Individual Carbon Nanotubes. *Nature* **1996**, 382, 54–56.
136. H. Dai, E. W. Wong, C. M. Lieber. Probing Electrical Transport in Nanomaterials: Conductivity of Individual Carbon Nanotubes. *Science* **1996**, 272, 523–526.
137. R. H. Mitchell, Y. Chen, J. Zhang. N-Bromosuccinimide-Chloroform, a More Convenient Method to Nuclear Brominate Reactive Aromatic Hydrocarbons. *Org. Prep. Proced. Int.* **1997**, 29, 715–719.
138. K. Kim, S. Hong, H. Jang, D. Jeong. Organic Compound and Organic Light Emitting Device Using the Same. US20070059556A1, March 15, 2007.
139. Crawford Andrew G., Liu Zhiqiang, Mkhaliid Ibraheem A. I., Thibault Marie-Hélène, Schwarz Nicolle, Alcaraz Gilles, Steffen Andreas, Collings Jonathan C., Batsanov Andrei S., Howard Judith A. K., et al. Synthesis of 2- and 2,7-Functionalized Pyrene Derivatives: An Application of Selective C-H Borylation. *Chem. – Eur. J.* **2012**, 18, 5022–5035.
140. K. N. Parida, J. N. Moorthy. Synthesis of O-Carboxyarylacrylic Acids by Room Temperature Oxidative Cleavage of Hydroxynaphthalenes and Higher Aromatics with Oxone. *J. Org. Chem.* **2015**, 80, 8354–8360.
141. C. Tintel, J. Terheijden, J. Lugtenburg, J. Cornelisse. Photoreduction and Photoaddition Reactions of Pyrenediones. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2057–2060.
142. D. E. Bradley. Evaporated Carbon Films for Use in Electron Microscopy. *Br. J. Appl. Phys.* **1954**, 5, 65–66.
143. J. Scherr, A. Neuhaus, K. Parey, N. Klusch, B. J. Murphy, V. Zickermann, W. Kühlbrandt, A. Terfort, D. Rhinow. Noncovalent Functionalization of Carbon Substrates with Hydrogels Improves Structural Analysis of Vitriified Proteins by Electron Cryo-Microscopy. *ACS Nano* **2019**, DOI: 10.1021/acsnano.9b02651.
144. X. Li, P. Mooney, S. Zheng, C. R. Booth, M. B. Braunfeld, S. Gubbens, D. A. Agard, Y. Cheng. Electron Counting and Beam-Induced Motion Correction Enable near-Atomic-Resolution Single-Particle Cryo-EM. *Nat. Methods* **2013**, 10, 584–590.
145. T. J. Simmons, J. Bult, D. P. Hashim, R. J. Linhardt, P. M. Ajayan. Noncovalent Functionalization as an Alternative to Oxidative Acid Treatment of Single Wall Carbon Nanotubes with Applications for Polymer Composites. *ACS Nano* **2009**, 3, 865–870.
146. Z. Wu, Z. Chen, X. Du, J. M. Logan, J. Sippel, M. Nikolou, K. Kamaras, J. R. Reynolds, D. B. Tanner, A. F. Hebard, et al. Transparent, Conductive Carbon Nanotube Films. *Science* **2004**, 305, 1273–1276.

147. R. M. Glaeser, R. J. Hall. Reaching the Information Limit in Cryo-EM of Biological Macromolecules: Experimental Aspects. *Biophys. J.* **2011**, 100, 2331–2337.
148. R. R. Nair, P. Blake, J. R. Blake, R. Zan, S. Anissimova, U. Bangert, A. P. Golovanov, S. V. Morozov, A. K. Geim, K. S. Novoselov, et al. Graphene as a Transparent Conductive Support for Studying Biological Molecules by Transmission Electron Microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **2010**, 97, 153102.
149. H. Cho, M. R. Jones, S. C. Nguyen, M. R. Hauwiller, A. Zettl, A. P. Alivisatos. The Use of Graphene and Its Derivatives for Liquid-Phase Transmission Electron Microscopy of Radiation-Sensitive Specimens. *Nano Lett.* **2017**, 17, 414–420.
150. R. S. Pantelic, J. W. Suk, C. W. Magnuson, J. C. Meyer, P. Wachsmuth, U. Kaiser, R. S. Ruoff, H. Stahlberg. Graphene: Substrate Preparation and Introduction. *J. Struct. Biol.* **2011**, 174, 234–238.
151. N. R. Wilson, P. A. Pandey, R. Beanland, R. J. Young, I. A. Kinloch, L. Gong, Z. Liu, K. Suenaga, J. P. Rourke, S. J. York, et al. Graphene Oxide: Structural Analysis and Application as a Highly Transparent Support for Electron Microscopy. *ACS Nano* **2009**, 3, 2547–2556.
152. D. Rhinow, J. Vonck, M. Schranz, A. Beyer, A. Götzhäuser, N. Hampp. Ultrathin Conductive Carbon Nanomembranes as Support Films for Structural Analysis of Biological Specimens. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, 12, 4345–4350.
153. R. S. Pantelic, J. C. Meyer, U. Kaiser, W. Baumeister, J. M. Plitzko. Graphene Oxide: A Substrate for Optimizing Preparations of Frozen-Hydrated Samples. *J. Struct. Biol.* **2010**, 170, 152–156.
154. P. Roach, D. Farrar, C. C. Perry. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8168–8173.
155. R. K. Scopes. *Protein Purification: Principles and Practice*; Springer Science & Business Media, 2013.
156. A. Terfort, D. Rhinow, A. Turchanin. Functionalized Nanomembrane, a Method for Preparation Thereof and Their Use. US20180017558A1, January 18, 2018.
157. D. F. Kelly, P. D. Abeyrathne, D. Dukovski, T. Walz. The Affinity Grid: A Pre-Fabricated EM Grid for Monolayer Purification. *J. Mol. Biol.* **2008**, 382, 423–433.
158. G. Sharma, J. Pallesen, S. Das, R. Grassucci, R. Langlois, C. M. Hampton, D. F. Kelly, A. des Georges, J. Frank. Affinity Grid-Based Cryo-EM of PKC Binding to RACK1 on the Ribosome. *J. Struct. Biol.* **2013**, 181, 190–194.
159. D. F. Kelly, D. Dukovski, T. Walz. Monolayer Purification: A Rapid Method for Isolating Protein Complexes for Single-Particle Electron Microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 4703–4708.
160. D. F. Kelly, D. Dukovski, T. Walz. Chapter Four - A Practical Guide to the Use of Monolayer Purification and Affinity Grids. In *Methods in Enzymology*; Jensen, G. J., Ed.; Cryo-EM Part A Sample Preparation and Data Collection; Academic Press, 2010; Vol. 481, pp 83–107.
161. C. J. Benjamin, K. J. Wright, S. C. Bolton, S.-H. Hyun, K. Krynski, M. Grover, G. Yu, F. Guo, T. L. Kinzer-Ursem, W. Jiang, et al. Selective Capture of Histidine-Tagged Proteins from Cell Lysates Using TEM Grids Modified with NTA-Graphene Oxide. *Sci. Rep.* **2016**, 6:32500, 1–11.
162. G. Yu, F. Vago, D. Zhang, J. E. Snyder, R. Yan, C. Zhang, C. Benjamin, X. Jiang, R. J. Kuhn, P. Serwer, et al. Single-Step Antibody-Based Affinity Cryo-Electron Microscopy for Imaging and Structural Analysis of Macromolecular Assemblies. *J. Struct. Biol.* **2014**, 187, 1–9.
163. B.-G. Han, R. W. Walton, A. Song, P. Hwu, M. T. Stubbs, S. M. Yannoni, P. Arbeláez, M. Dong, R. M. Glaeser. Electron Microscopy of Biotinylated Protein

- Complexes Bound to Streptavidin Monolayer Crystals. *J. Struct. Biol.* **2012**, 180, 249–253.
164. B.-G. Han, Z. Watson, H. Kang, A. Pulk, K. H. Downing, J. Cate, R. M. Glaeser. Long Shelf-Life Streptavidin Support-Films Suitable for Electron Microscopy of Biological Macromolecules. *J. Struct. Biol.* **2016**, 195, 238–244.
165. B.-G. Han, Z. Watson, J. H. D. Cate, R. M. Glaeser. Monolayer-Crystal Streptavidin Support Films Provide an Internal Standard of Cryo-EM Image Quality. *J. Struct. Biol.* **2017**, 200, 307–313.
166. M. E. R. Weiss, F. Paulus, D. Steinhilber, A. N. Nikitin, R. Haag, C. Schütte. Estimating Kinetic Parameters for the Spontaneous Polymerization of Glycidol at Elevated Temperatures. *Macromol. Theory Simul.* **2012**, 21, 470–481.
167. A. Capretta, R. B. Maharajh, R. A. Bell. Synthesis and Characterization of Cyclomaltoheptaose-Based Metal Chelants as Probes for Intestinal Permeability. *Carbohydr. Res.* **1995**, 267, 49–63.
168. W. B. Frommer, M. W. Davidson, R. E. Campbell. Genetically Encoded Biosensors Based on Engineered Fluorescent Proteins. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 2833–2841.
169. J. T. Heeres, S.-H. Kim, B. J. Leslie, E. A. Lidstone, B. T. Cunningham, P. J. Hergenrother. Identifying Modulators of Protein–Protein Interactions Using Photonic Crystal Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 18202–18203.
170. S. Lata, M. Gavutis, R. Tampé, J. Piehler. Specific and Stable Fluorescence Labeling of Histidine-Tagged Proteins for Dissecting Multi-Protein Complex Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2365–2372.
171. V. Glembockyte, R. Wieneke, K. Gatterdam, Y. Gidi, R. Tampé, G. Cosa. Tris-N-Nitrilotriacetic Acid Fluorophore as a Self-Healing Dye for Single-Molecule Fluorescence Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 11006–11012.
172. A. K. Wright, M. R. Thompson. Hydrodynamic Structure of Bovine Serum Albumin Determined by Transient Electric Birefringence. *Biophys. J.* **1975**, 15, 137–141.
173. A. Schröter, S. Franzka, N. Hartmann. Photothermal Laser Fabrication of Micro- and Nanostructured Chemical Templates for Directed Protein Immobilization. *Langmuir* **2014**, 30, 14841–14848.
174. J. H. Slater, J. S. Miller, S. S. Yu, J. L. West. Fabrication of Multifaceted Micropatterned Surfaces with Laser Scanning Lithography. *Adv. Funct. Mater.* **2011**, 21, 2876–2888.
175. A. Turchanin, A. Tinazli, M. El-Desawy, H. Großmann, M. Schnietz, H. H. Solak, R. Tampé, A. Götzhäuser. Molecular Self-Assembly, Chemical Lithography, and Biochemical Tweezers: A Path for the Fabrication of Functional Nanometer-Scale Protein Arrays. *Adv. Mater.* **2008**, 20, 471–477.
176. M. E. Anderson, M. Mihok, H. Tanaka, L.-P. Tan, M. W. Horn, G. S. McCarty, P. S. Weiss. Hybrid Approaches to Nanolithography: Photolithographic Structures with Precise, Controllable Nanometer-Scale Spacings Created by Molecular Rulers. *Adv. Mater.* **2006**, 18, 1020–1022.
177. R. D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S. Hong, C. A. Mirkin. “Dip-Pen” Nanolithography. *Science* **1999**, 283, 661–663.
178. A. Götzhäuser, W. Eck, W. Geyer, V. Stadler, T. Weimann, P. Hinze, M. Grunze. Chemical Nanolithography with Electron Beams. *Adv. Mater.* **2001**, 13, 803–806.
179. M. R. Shadnam, S. E. Kirkwood, R. Fedosejevs, A. Amirfazli. Direct Patterning of Self-Assembled Monolayers on Gold Using a Laser Beam. *Langmuir* **2004**, 20, 2667–2676.

180. D. Rhinow, N. A. Hampp. Forming Microstructured Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold by Laser Ablation. *IEEE Trans. NanoBioscience* **2006**, 5, 188–192.
181. L. Iversen, O. Younes-Metzler, K. L. Martinez, D. Stamou. Chemically Specific Laser-Induced Patterning of Alkanethiol SAMs: Characterization by SEM and AFM. *Langmuir* **2009**, 25, 12819–12824.
182. W. Eck, V. Stadler, W. Geyer, M. Zharnikov, A. Götzhäuser, M. Grunze. Generation of Surface Amino Groups on Aromatic Self-Assembled Monolayers by Low Energy Electron Beams—A First Step Towards Chemical Lithography. *Adv. Mater.* **2000**, 12, 805–808.
183. A. Schröter, S. Franzka, J. Koch, B. N. Chichkov, A. Ostendorf, N. Hartmann. Femtosecond-Laser Processing of Nitrobiphenylthiol Self-Assembled Monolayers. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, 278, 43–46.
184. A. George, M. Knez, G. Hlawacek, D. Hagedoorn, H. H. J. Verputten, R. van Gastel, J. E. ten Elshof. Nanoscale Patterning of Organosilane Molecular Thin Films from the Gas Phase and Its Applications: Fabrication of Multifunctional Surfaces and Large Area Molecular Templates for Site-Selective Material Deposition. *Langmuir* **2012**, 28, 3045–3052.
185. G. Hlawacek, V. Veligura, S. Lorbek, T. F. Mocking, A. George, R. van Gastel, H. J. W. Zandvliet, B. Poelsema. Imaging Ultra Thin Layers with Helium Ion Microscopy: Utilizing the Channeling Contrast Mechanism. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2012**, 3, 507–512.
186. N. H. Mack, R. Dong, R. G. Nuzzo. Quantitative Imaging of Protein Adsorption on Patterned Organic Thin-Film Arrays Using Secondary Electron Emission. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7871–7881.
187. A. G. Bittermann, S. Jacobi, L. F. Chi, H. Fuchs, R. Reichelt. Contrast Studies on Organic Monolayers of Different Molecular Packing in FESEM and Their Correlation with SFM Data. *Langmuir* **2001**, 17, 1872–1877.
188. G. P. Lopez, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides. Scanning Electron Microscopy Can Form Images of Patterns in Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **1993**, 9, 1513–1516.
189. M. D. Mager, V. LaPointe, M. M. Stevens. Exploring and Exploiting Chemistry at the Cell Surface. *Nat. Chem.* **2011**, 3, 582–589.
190. S. Reitsma, D. W. Slaaf, H. Vink, M. A. M. J. van Zandvoort, M. G. A. oude Egbrink. The Endothelial Glycocalyx: Composition, Functions, and Visualization. *Pflugers Arch.* **2007**, 454, 345–359.
191. M. Hartmann, T. K. Lindhorst. The Bacterial Lectin FimH, a Target for Drug Discovery – Carbohydrate Inhibitors of Type 1 Fimbriae-Mediated Bacterial Adhesion. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 3583–3609.
192. D. Choudhury, A. Thompson, V. Stojanoff, S. Langermann, J. Pinkner, S. J. Hultgren, S. D. Knight. X-Ray Structure of the FimC-FimH Chaperone-Adhesin Complex from Uropathogenic Escherichia Coli. *Science* **1999**, 285, 1061–1066.
193. N. T. Flynn, T. N. T. Tran, M. J. Cima, R. Langer. Long-Term Stability of Self-Assembled Monolayers in Biological Media. *Langmuir* **2003**, 19, 10909–10915.
194. O. Mitsunobu, M. Yamada. Preparation of Esters of Carboxylic and Phosphoric Acid via Quaternary Phosphonium Salts. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, 40, 2380–2382.
195. J. A. Buonomo, C. C. Aldrich. Mitsunobu Reactions Catalytic in Phosphine and a Fully Catalytic System. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 13041–13044.

196. T. Weber, N. Meyerbröcker, N. K. Hira, M. Zharnikov, A. Terfort. UV-Mediated Tuning of Surface Biorepulsivity in Aqueous Environment. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 4325–4327.
197. A. Reisner, J. A. Haagensen, M. A. Schembri, E. L. Zechner, S. Molin. Development and Maturation of Escherichia Coli K-12 Biofilms. *Mol. Microbiol.* **2003**, 48, 933–946.
198. F.-I. Beiroth. Markierung Und Modifizierung Der FimH Bindungstasche Zur Untersuchung Und Kontrolle Bakterieller Adhäsion, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel: Kiel, 2015.
199. C. Pale-Grosdemange, E. S. Simon, K. L. Prime, G. M. Whitesides. Formation of Self-Assembled Monolayers by Chemisorption of Derivatives of Oligo(Ethylene Glycol) of Structure HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)_MOH on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 12–20.
200. V. Chandrasekaran, H. Jacob, F. Petersen, K. Kathirvel, F. Tuzek, T. K. Lindhorst. Synthesis and Surface-Spectroscopic Characterization of Photoisomerizable Glyco-SAMs on Au(111). *Chem. – Eur. J.* **2014**, 20, 8744–8752.

8. Abkürzungsverzeichnis

AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
APTMS	3-Aminopropyltrimethoxysilan
Bpin-	(4,4,5,5-Tetramethyl-1,3,2-dioxaborolanyl)-
BPT	1,1-Biphenyl-4-thiol
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (engl. <i>charge-coupled device</i>)
cCNM	leitfähige Kohlenstoffnanomembran (engl. <i>conductive carbon nanomembrane</i>)
CNM	Kohlenstoffnanomembran (engl. <i>carbon nanomembrane</i>)
GroEL	Chaperon EL
CRT	Kathodenstrahlröhrenbildschirm (engl. <i>cathode ray tube</i>)
DDM	Dodecylmaltosid
DLP	direkte Laserstrukturierung (engl. <i>direct laser patterning</i>)
DM	Decylmaltosid
DMAP	N,N-Dimethylaminopyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA-MA	Ethylendiamintetraessigsäure-Monoanhydrid
EG	Ethylenglykol
EGDGE	Ethylenglykoldiglycidylether
EM	Elektronenmikroskopie
EPS	Extrazelluläre Polymere Substanzen
EUV	extremes Ultraviolett
Fos-12	<i>n</i> -Dodecylphosphocholin
Gew.-%	Gewichtsprozent
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HIM	Helium-Ionen-Mikroskopie
His	Histidin
HOPG	hochorientierter pyrolytischer Graphit (engl. <i>highly oriented pyrolytic graphite</i>)
HyCaNet	Hydrogel-funktionalisiertes Netzwerk aus Kohlenstoffnanoröhren (engl. <i>hydrogel-functionalized carbon nanotube network</i>)
IDA	Iminodiessigsäure
IR	Infrarot
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (engl. <i>infrared reflection adsorption spectroscopy</i>)
KPT	Kritisch-Punkt Trocknung (engl. <i>critical-point drying</i>)
Kryo-	Tiefemperatur-
MCT	Quecksilber-Cadmium-Tellurid (engl. <i>Mercury-Cadmium-Tellurid</i>)
Mes	Methansulfonyl
NBPT	4-Nitro-1,1'-biphenyl-4'-thiol
nm	Nanometer
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NPT	Naphthalen-2-thiol
NTA	Nitrilotriessigsäure
OC	Octylglucosid
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferten Salzlösungen (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung Tween20
PEG	Polyethylenglykol
PG	Polyglycerol
PMMA	Polymethylmethacrylat
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
SAM	selbstanordnende Monolage
SEM	Rasterelektronenmikroskopie (REM) (engl. <i>scanning electron microscopy</i>)
SPA	Einzelpartikelanalyse (engl. <i>single particle analysis</i>)

SPHyNs	selbst-perforierende Hydrogel-Nanomembran (engl. <i>self-perforated hydrogel-nanomembrane</i>)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (engl. <i>surface plasmon resonance</i>)
SWCNT	einwandige Kohlenstoffnanoröhren (<i>single-walled carbon nanotube</i>)
TBTU	2 (1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammoniumtetrafluoridoborat
t-Bu	teritär-Butyl
TEG	Tetraethylenglykol
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
<i>tert</i> -Butyl	teritär-Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
TPT	[1'',4',1',1]-Terphenyl-4-thiol
Triton-X-100	Polyethylenglykol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenylether
Ts	<i>para</i> -Toluolsulfonyl
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UV	Ultraviolett
Vol.-%	Volumenprozent
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i>)
Zwittergent 3-12	<i>n</i> -Dodecyl- <i>N,N</i> -dimethyl-3-ammonium-1-propansulfonat

9. Eigene Anteile an Veröffentlichungen in Fachjournalen

Self-Perforated Hydrogel Nanomembranes Facilitate Structural Analysis of Proteins by Electron Cryo-Microscopy

Julian Scherr, Kristian Parey, Niklas Klusch, Bonnie J. Murphy, Sebastian Balser, Alexander Neuhaus, Volker Zickermann, Werner Kühlbrandt, Andreas Terfort, Daniel Rhinow

ACS Nano **2017** 11 (6), 6467-6473

- 1) Herstellung der Goldoberflächen mittels Elektronenstrahlbedampfung
- 2) Synthese des Polyglycerol-haltigen Disulfides und der Quervernetzer
- 3) Herstellung von Polyglycerol-Monoschichten auf Goldoberflächen
- 4) Charakterisierung von Polyglycerol-Monoschichten mittels IR-Spektroskopie und Ellipsometrie
- 5) Entwicklung eines Systems zur Quervernetzung und Durchführung von Experimenten zu Quervernetzung der Polyglycerolschichten
- 6) Bestimmung der optimalen Bedingungen für eine Quervernetzung mittels Ellipsometrie und IR-Spektroskopie
- 7) Auswertung der SEM und TEM-Aufnahmen
- 8) Transfer der erhaltenen Nanomembranen auf diverse Substrate
- 9) Optimierung eines Protokolls zur Kritisch-Punkt Trocknung der Membranen
- 10) Untersuchung der Nanomembran mittels AFM, IR-Spektroskopie und Ellipsometrie

Noncovalent Functionalization of Carbon Substrates with Hydrogels Improves Structural Analysis of Vitrified Proteins by Electron Cryo-Microscopy

Julian Scherr, Alexander Neuhaus, Kristian Parey, Niklas Klusch, Bonny J. Murphy, Volker Zickermann, Werner Kühlbrandt, Andreas Terfort, Daniel Rhinow

ACS Nano **2019** (akzeptiert zur Veröffentlichung)

DOI: 10.1021/acsnano.9b02651

- 1) Herstellung der Goldoberflächen mittels Elektronenstrahlbedampfung
- 2) Synthese der verschiedenen Pyren-haltigen Polyglycerole
- 3) Beschichtung von amorphen Kohlenstofffilmen mit den verschiedenen Pyren-haltigen Polyglycerolen
- 4) Charakterisierung der beschichteten Kohlenstoffoberflächen mittels IR-Spektroskopie und Ellipsometrie
- 5) Untersuchung der Adsorption von Proteinen an den beschichteten Kohlenstoffoberflächen

Funktionalisierte Kohlenstoffnanomembranen mit spezifischen Anbindungsstellen

Die Ergebnisse des Kapitels 3.5 werden kurzfristig veröffentlicht.

- 1) Herstellung der Goldoberflächen mittels Elektronenstrahlbedampfung
- 2) Charakterisierung der Goldoberflächen
- 3) Optimierung eines Verfahrens zur Beschichtung von Kohlenstoffnanomembranen mit Polyglycerol
- 4) Charakterisierung der Polyglycerol-Beschichtungen mittels IR-Spektroskopie und Ellipsometrie
- 5) Untersuchung der unspezifischen Adsorption von Proteinen an den PG-Beschichtung
- 6) Synthese des NTA₄Cyclen-Derivates
- 7) Durchführung und Entwicklung der Parameter zur Funktionalisierung von PG-Oberflächen mit dem NTA₄Cyclen-Derivat
- 8) Charakterisierung der NTA-funktionalisierten Oberfläche mittels IR-Spektroskopie und Ellipsometrie
- 9) Untersuchungen zur spezifischen und unspezifischen Adsorption von Proteinen an die NTA-funktionalisierten Oberflächen mittels SPR
- 10) Transfer der erhaltenen Nanomembranen auf diverse Substrate
- 11) Kritisch-Punkt Trocknung der Membranen
- 12) Untersuchung der Nanomembran mittels AFM, IR-Spektroskopie und Ellipsometrie

Multicomponent patterned ultrathin carbon nanomembranes by laser ablation

Natalie Frese, Julian Scherr, André Beyer, Andreas Terfort, Armin Götzhäuser, Norbert Hampp, Daniel Rhinow

Applied Surface Science **2018** 427, 126-130

- 1) Abscheidung von selbst-anordnenden Monolagen
- 2) Transfer der Nanomembranen auf verschiedene Oberflächen
- 3) Charakterisierung der Nanomembranen mittels IR-Spektroskopie
- 4) Untersuchungen zum Nachweis der Funktionalisierung der Nanomembranen

Reprinted with permission from

**Self-Perforated Hydrogel Nanomembranes Facilitate Structural
Analysis of Proteins by Electron Cryo-Microscopy**

Julian Scherr, Kristian Parey, Niklas Klusch, Bonnie J. Murphy, Sebastian
Balsler, Alexander Neuhaus, Volker Zickermann, Werner Kühlbrandt,
Andreas Terfort, and Daniel Rhinow

ACS Nano **2017** *11* (6), 6467-6473

DOI: 10.1021/acsnano.7b03099

Copyright 2017 American Chemical Society.

Self-Perforated Hydrogel Nanomembranes Facilitate Structural Analysis of Proteins by Electron Cryo-Microscopy

Julian Scherr,[†] Kristian Parey,[‡] Niklas Klusch,[‡] Bonnie J. Murphy,[‡] Sebastian Balser,[†] Alexander Neuhaus,[‡] Volker Zickermann,[§] Werner Kühlbrandt,[‡] Andreas Terfort,^{*,†} and Daniel Rhinow^{*,‡}

[†]Department of Chemistry, Institute of Inorganic and Analytical Chemistry, Goethe-University, Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt, Germany

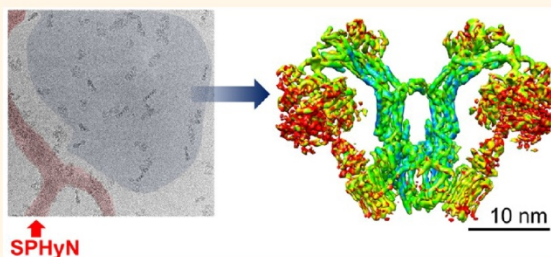
[‡]Department of Structural Biology, Max Planck Institute of Biophysics, Max-von-Laue-Str. 3, 60438 Frankfurt, Germany

[§]Structural Bioenergetics Group, Institute of Biochemistry II, Medical School, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: We developed a method to improve specimen preparation for electron cryo-microscopy of membrane proteins. The method features a perforated hydrogel nanomembrane that stabilizes the thin film of aqueous buffer spanning the holes of holey carbon films, while at the same time preventing the depletion of protein molecules from these holes. The membrane is obtained by cross-linking of thiolated polyglycerol dendrimer films on gold, which self-perforate upon transfer to holey carbon substrates, forming a sub-micron-sized hydrogel network. The perforated nanomembrane improves the distribution of the protein molecules in the ice considerably. This facilitates data acquisition as demonstrated with two eukaryotic membrane protein complexes.

KEYWORDS: cryo-EM, self-assembly, two-dimensional materials, biorepulsive polymer, membrane proteins



Solving the structure of biological molecules is of critical importance for understanding cellular processes and subsequent development of pharmaceutical treatments. Three-dimensional electron cryo-microscopy (cryo-EM) is a powerful method to study the structure of vitrified biological macromolecules under near-native conditions. Recently, direct electron detectors have been developed, which enable data acquisition at very high signal-to-noise ratio.^{1–4}

Despite tremendous technological advances, the most critical factor that determines the success of cryo-EM remains the specimen itself. For structural analysis by cryo-EM, biomolecules are vitrified in a thin water film spanning the holes of a holey amorphous carbon film by plunging it into liquid ethane. Alternatively, metallic glasses,⁵ graphene,^{6,7} graphene-like materials,^{8,9} and gold¹⁰ have been used as support films for cryo-EM of vitrified specimens.

Preparing vitrified specimens from detergent-solubilized membrane proteins is particularly challenging. To prevent membrane proteins from aggregating after isolation from the lipid bilayer, detergents are required to locally provide a hydrophobic environment for the membrane-embedded part of the protein. Detergents reduce the surface tension of an

aqueous solution, and this frequently results in depletion of biomolecules from the thin water film spanning the holes of holey carbon supports. Sometimes, an additional thin layer of continuous carbon film is used to improve the number and distribution of particles. However, the extra mass of the carbon film reduces image contrast and can result in preferential orientation of proteins on the film, which is undesirable for structure determination. Generally, depletion of membrane proteins from the water film onto the substrate material during specimen preparation remains a problem (Figure 1A), which can only partly be solved by either using detergents (with carbon substrates)¹¹ or self-assembled monolayers (for Au).¹²

We have developed a support film that considerably improves specimen preparation for membrane proteins and meets the following requirements: (1) It stabilizes the thin water film that contains detergent-solubilized proteins and spans the holes on a holey carbon film. (2) It interacts

Received: May 4, 2017

Accepted: June 9, 2017

Published: June 9, 2017

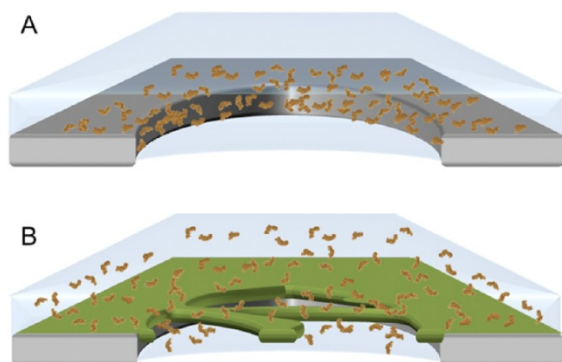


Figure 1. Distribution of membrane proteins on holey carbon films without and with SPHyNs. (A) Owing to a variety of effects, such as reduced surface tension and nonspecific adsorption, proteins are frequently accumulated on or near the carbon film and thus depleted from the thin water layer in the holey carbon film by accumulation at and near the carbon film. (B) Biorepulsive SPHyNs stabilize the thin water layer as well as cover the carbon film, thus preventing depletion of proteins from the holes and minimizing adsorption to the solid substrate.

minimally with the proteins. (3) It can be deposited on diverse specimen support substrates. In this work, we demonstrate that self-perforated hydrogel nanomembranes (SPHyNs) are suitable for stabilizing the thin water film, which improves the distribution of proteins in the ice considerably. We used SPHyNs to acquire high-resolution single-particle cryo-EM data of two large membrane protein complexes of the inner mitochondrial membrane with high efficiency. These support films enabled us to calculate an improved 3D reconstruction of

Polytomella ATP synthase from significantly fewer particles compared to previous work.

RESULTS AND DISCUSSION

To stabilize the thin water layer for the cryo-EM, we devised a method for the fabrication of SPHyNs with a thickness of ~ 2 nm by chemical cross-linking of thiolated polyglycerol (PG) dendrimer films. PG dendrimers are biorepulsive, hydrophilic, and expose a multitude of OH groups.^{13–17}

The fabrication of SPHyNs and their transfer to TEM grids are shown schematically in Figure 2.

Next, we varied the concentrations of the cross-linker Ms_2TEG from 3 to 100 mM to optimize the properties of the PG layers. The thickness of the layers did not increase significantly upon cross-linking at any concentration used. When transferred to silicon wafers, the films formed continuous membranes with a thickness of ~ 2 nm (Supporting Figure S1). In contrast, upon transfer to holey carbon substrates (Figure 2d) in a critical-point dryer, the free-standing cross-linked PG film formed perforated membranes at any concentration of Ms_2TEG . Figure 3 shows TEM images of SPHyNs, revealing a spider-web-like structure with 50–500 nm holes.

We observed an almost linear dependence of porosity of free-standing SPHyNs on the cross-linker for Ms_2TEG concentrations between 100 and 20 mM (Figure 3C). At Ms_2TEG concentrations below 20 mM, the porosity was difficult to control. We conclude that two factors determine the structure of free-standing SPHyNs: the concentration of the cross-linker as well as forces imparted to the membranes during the transfer process. Upon cross-linking, weak points in the PG membranes act as nucleation points for subsequent self-perforation of the free-standing membranes upon removal of the sacrificial PMMA layer.

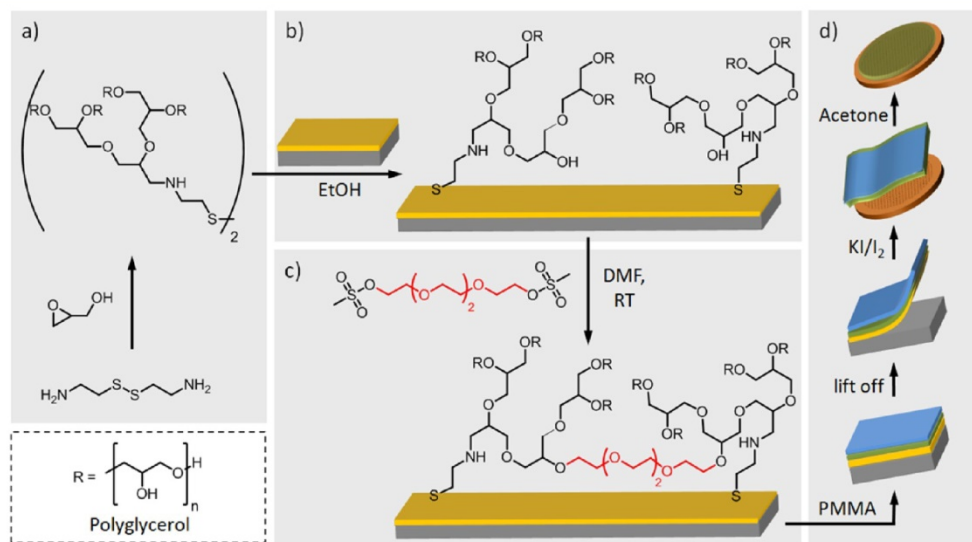


Figure 2. Fabrication of SPHyNs and their transfer to TEM grids. (a) PG-functionalized disulfide was synthesized by a polymerization reaction of glycidol with cystamine as initiator and was subsequently attached to a gold surface (b). (c) To generate free-standing membranes, the PG dendrimers were cross-linked with 1,11-di(mesyloxy)-3,6,9-trioxaundecane (Ms_2TEG), synthesized using tetraethylene glycol as starting material. (d) Transfer of the membrane (green layer) to a TEM grid: First, poly(methyl methacrylate) (PMMA) is spin-coated onto the gold substrate (blue layer). Second, the gold layer with the two polymer layers is released from the silicon wafer, followed by dissolution of the gold. Third, the sandwich consisting of PMMA and cross-linked PG is placed on a TEM grid. In the final step, PMMA is dissolved with acetone in a critical-point dryer.

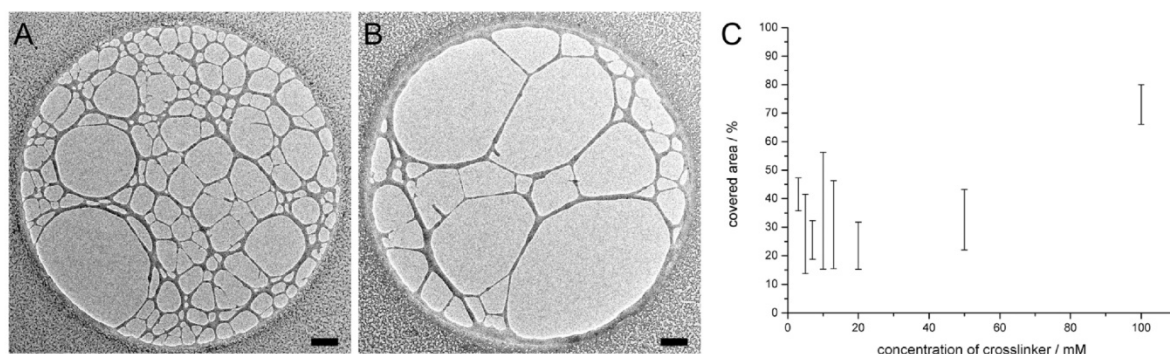


Figure 3. TEM analysis of free-standing SPHyNs. (A,B) TEM images of SPHyNs spanning holes of a Quantifoil R2/2 substrate. SPHyNs were fabricated at concentrations of 50 mM (A) or 10 mM (B) of Ms_2TEG . Scale bars are 200 nm. (C) Dependence of porosity, measured as the average area covered by SPHyNs in the holes of a Quantifoil R2/2 substrate, on cross-linker concentration. Averages were obtained from 30 independent TEM images for each concentration.

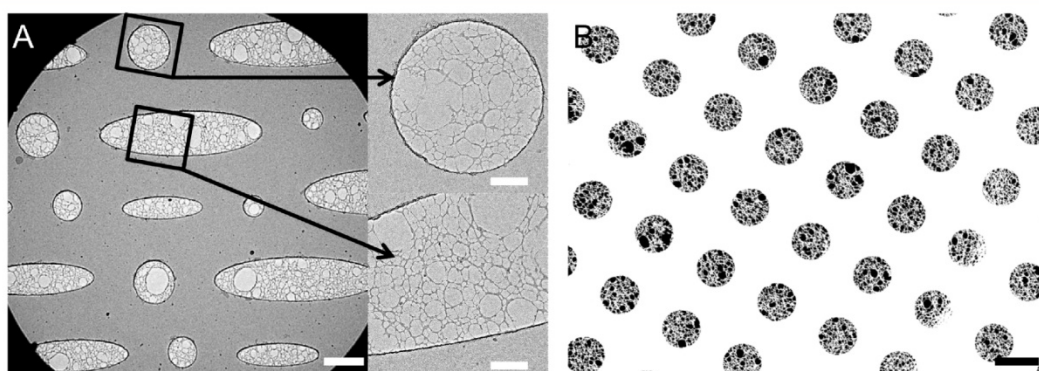


Figure 4. SPHyNs imaged by SEM and TEM. The SPHyNs were obtained with 5 mM Ms_2TEG . (A) TEM image of a SPHyN transferred to a C-flat multihole substrate. The self-perforation of the film is independent of the shape and size of the holes in the substrate. (Right) Magnified views of selected holes. Scale bars are 2 μm (left) and 500 nm (right). (B) Secondary electron SEM image of a SPHyN on a Quantifoil R2/2 substrate. No pore formation is observed on the solid substrates. The scale bar is 2 μm .

To analyze the influence of hole size and shape on the self-perforation of the cross-linked PG membranes, we transferred membranes to C-flat multihole grids with a variety of round and elliptical holes. TEM images of such SPHyNs are shown in Figure 4A. The images demonstrate that the structure of free-standing SPHyNs, formed upon transfer to holey substrates, is independent of shape and size of the holes, supporting the mechanism suggested above. Figure 4B shows an SEM image of a cross-linked PG membrane transferred to a Quantifoil R2/2 substrate. Neither SEM nor TEM indicated pore formation in the cross-linked PG films covering the solid substrate areas. This confirms the AFM results (Supporting Figure S1), which show that the cross-linked PG membranes form continuous films on solid supports.

Mild plasma treatment increased the average pore size of free-standing SPHyNs. The top of Figure 5 shows a TEM image of a SPHyN cross-linked with 10 mM Ms_2TEG . Upon glow-discharge for 45 s, the average covered area decreased from 39(\pm 3) to 10(\pm 3)% (Figure 5, bottom).

To demonstrate that SPHyNs improve the distribution of detergent-solubilized membrane proteins in the thin water films used for cryo-EM, we prepared vitreous samples of complex I and ATP synthase dimers, two eukaryotic membrane protein complexes, for which it has been difficult to obtain cryo-

specimens with the large number of particles per unit area required for high-resolution data collection.^{18,19} Mitochondrial complex I is a multisubunit complex involved in electron transfer from NADH to ubiquinone to transfer protons across the inner mitochondrial membrane.²⁰ Obtaining vitrified samples of complex I from *Yarrowia lipolytica* with a homogeneous distribution of particles in the holes of a holey carbon film is a bottleneck for structural analysis. Cryo-EM images of complex I from *Y. lipolytica* vitrified on Quantifoil R2/2 substrates as well as on lacey carbon films mounted on Quantifoil R2/2 substrates reveal particles aggregated on the carbon surfaces, although in both cases, the carbon was made hydrophilic by glow-discharge (Supporting Figure S2). The reduced surface tension caused by the detergent dodecyl maltoside (DDM), used to solubilize complex I, depleted particles from the water film, creating a bottleneck for single-particle analysis.

Figure 1B is a schematic sketch of a protein sample vitrified on SPHyNs. Cryo-EM images of complex I vitrified on SPHyNs routinely revealed more than 60 individual protein particles per image suitable for single-particle cryo-EM (Figure 6A,B). Because the film is biorepulsive, adsorption of protein molecules to SPHyNs is minimized. In contrast, protein aggregation on the carbon surfaces precluded particle picking

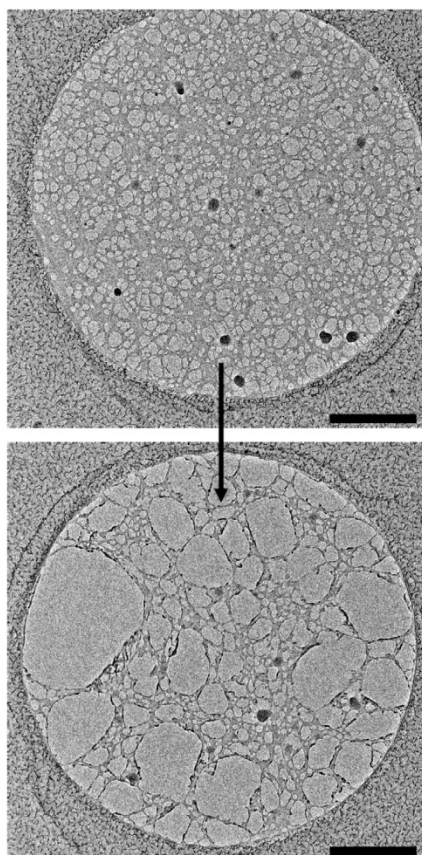


Figure 5. Converting SPHyNs with small holes to SPHyNs with a larger average hole size. (Top) TEM image of a SPHyN cross-linked with 10 mM Ms₂TEG. (Bottom) Same membrane after 45 s plasma treatment. Scale bars are 500 nm.

from Quantifoil R2/2 grids (Supporting Figure S2). Using 7138 particles from 123 images, we performed a gold-standard refinement and calculated a map of complex I with a resolution of 8.1 Å (Fourier shell correlation (FSC) criterion²¹ = 0.143) (Figure 6D,E and Supporting Figure S3). The map shows all elements of secondary structure known from previous work¹⁸ and well-resolved iron–sulfur clusters (Figure 6E).

To demonstrate that the method is broadly applicable in cryo-EM of membrane proteins, we prepared vitrified samples of mitochondrial ATP synthase from *Polytomella* sp. on SPHyNs. Although the structure of *Polytomella* ATP synthase dimers has been analyzed by cryo-EM with a resolution of 6.2 Å in former work,¹⁹ obtaining vitrified samples of this F-type ATP synthase suitable for high-resolution structure determination remains difficult, as in the case of complex I. Figure 7A demonstrates that SPHyNs prevent the depletion of ATP synthase dimers from the holes of Quantifoil R2/2 substrates, allowing efficient acquisition of cryo-EM images.

We used 23 200 particles from 2096 images to calculate a 3D reconstruction of dimeric *Polytomella* ATP synthase with a resolution of 6.4 Å (Figure 7C,D and Supporting Figure S4). Compared to previous work, in which 37 238 dimer images were averaged to obtain a map with a resolution of 6.2 Å,¹⁹ we required 14 000 fewer particles (38% less) to calculate a 3D

reconstruction with a similar resolution. This is explained by the fact that ATP synthase dimer samples vitrified on SPHyNs were picked from areas where the amorphous ice layer was thin, whereas in former work, particles were preferentially located in areas in the corners of the grid square, where the ice is thicker.¹⁹

Apart from stabilizing the thin film of aqueous buffer spanning the holes, cross-linked PG-membranes form a continuous biorepulsive layer on the carbon support. We assume that adsorption of proteins to the solid substrate areas is minimized, which contributes to the improved distribution of protein molecules in the holes, as observed in this work and previous work on gold substrates functionalized with self-assembled monolayers.¹² An important advantage of our approach is the fact that SPHyNs can be transferred to substrates other than amorphous carbon, such as gold¹⁰ or titanium–silicon films.⁵

CONCLUSIONS

We have demonstrated that SPHyNs improve the distribution of proteins in the thin water film in specimen preparation for cryo-EM, thus facilitating the acquisition of large data sets of high-quality single-particle images. The advantages of SPHyNs are three-fold. First, owing to the hydrophilic nature of the hydrogel, aqueous samples can be applied to the grid without prior glow-discharge. This prevents protein adsorption to the reverse side of the film, in contrast to glow-discharged conventional carbon film. Second, the network stabilizes the thin water film and thus suppresses the formation of a meniscus and the concomitant depletion of proteins from the holes. Third, SPHyNs are protein-repellent, which minimizes the interaction between the support film and the membrane proteins. All three effects ensure a homogeneous distribution of the protein molecules in the thin layer of vitrified buffer. Therefore, SPHyNs on holey carbon supports may find application in automated data collection.²² SPHyNs hold great promise to obtaining high-quality vitrified membrane protein samples with an abundance of protein molecules conveniently located in thin ice areas.

MATERIALS AND METHODS

PG Monolayer Formation and Characterization. Gold substrates for PG monolayer deposition were prepared by electron beam evaporation. First, 2.5 nm of titanium followed by 200 nm of gold was deposited onto polished single-crystal silicon wafers with (100) orientation (Wacker Siltronic AG, Germany). For the preparation of the PG nanomembranes, 200 nm of gold was deposited onto polished single-crystal silicon wafers with (100) orientation without an adhesion layer.

Ethanol (99% with 1% petroleum ether) was refluxed for 6 h and freshly distilled before use. The gold substrates were cleaned from the wafer, rinsed with ethanol, and cleaned with H₂ plasma in a Harrick PDC-32G plasma cleaner (high level, pressure of 5×10^{-1} mbar, 2 min). For SAM deposition, the clean substrates were immersed in 5 μ M solutions of disulfide PG (see Supporting Information for synthesis) in ethanol at room temperature. After at least 48 h, the samples were rinsed with water and ethanol and dried in a nitrogen stream.

Cross-Linking of PG Monolayers. Cross-linking of the PG monolayer was performed by the immersion of the substrate in a solution consisting of Ms₂TEG²³ at the desired concentration and 1.2 equiv of pyridine in *N,N*-dimethylformamide under argon. The substrates were incubated for 24 h at room temperature, washed with water and ethanol, and dried in a stream of nitrogen.

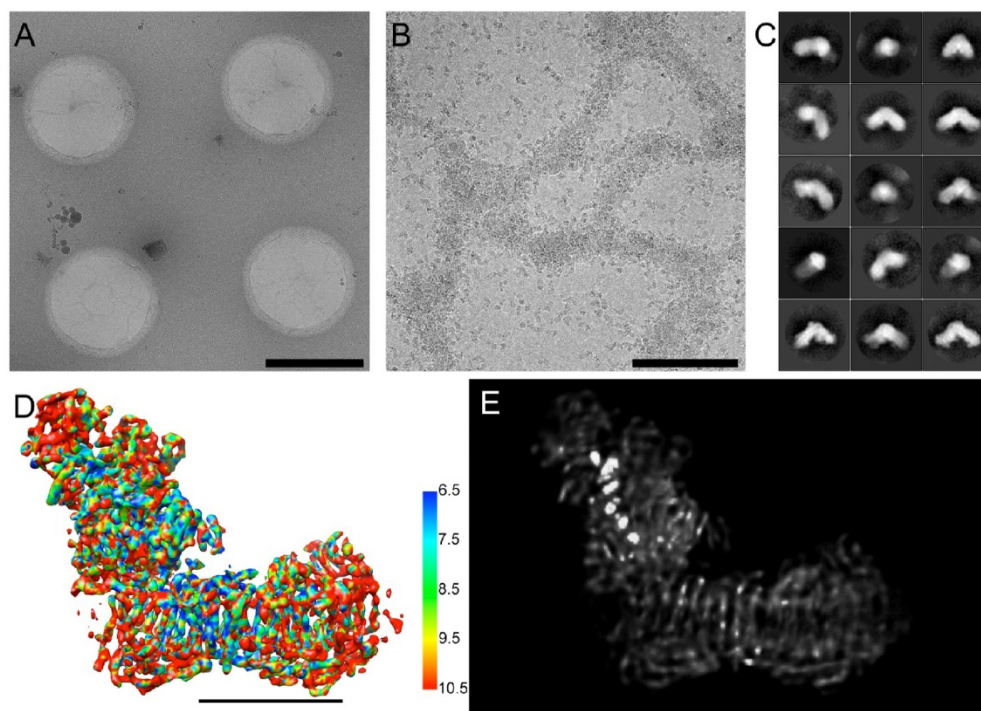


Figure 6. Cryo-EM of complex I from *Y. lipolytica* vitrified on SPHyNs. (A) Cryo-EM image of a vitrified sample revealing the SPHyN spanning the holes of a Quantifoil R2/2 substrate. (B) High-resolution cryo-EM image showing vitrified complex I and the SPHyN. (C) Two-dimensional class averages. (D) Electron density of complex I at 8.1 Å resolution using the local resolution result for coloring. The color scale is given in Å. (E) Representation of the electron density map of complex I, revealing the iron–sulfur clusters in the soluble part of the protein. Scale bars: 2 μm (A), 200 nm (B), 10 nm (D).

Transfer of Cross-Linked PG Membranes. For the transfer of PG nanomembranes to TEM grids or single-crystal silicon wafers, cross-linked PG monolayers were prepared on 200 nm of gold deposited onto polished single-crystal silicon wafers without any adhesion layer. First, the cross-linked PG film was protected by spin-coating PMMA on the film. Afterward, the gold was exfoliated by angular dipping of the substrate into water. The floating gold film was transferred to the different solutions with a piece of silicon. The gold was etched by placing the floating gold film on an iodine solution (2.5 wt % iodine, 10 wt % potassium iodide in water). Afterward, the PMMA-protected membrane was placed on an aqueous potassium iodide solution (10 wt % potassium iodide in water). In the case of free-standing membranes, the PMMA was removed by immersion in acetone for 2 h, followed by critical-point drying. On silicon wafers, the PMMA was removed by immersion in acetone for 2 h and drying in a stream of nitrogen.

Analysis of PG Membranes by SEM and TEM. SEM analysis of SPHyNs was performed with a Zeiss Auriga operating at an accelerating voltage of 5 kV. SPHyNs were analyzed at room temperature in a FEI Tecnai Spirit transmission electron microscope operating at an accelerating voltage of 120 kV. Images were acquired using a Gatan 4k \times 4k CCD camera. Images were analyzed using ImageJ.²⁴

Cryo-EM and 3D Reconstruction of Complex I from *Y. lipolytica*. Complex I was purified as described previously.²⁵ Three microliters of a complex I sample at a concentration of approximately 2 mg/mL was applied to Quantifoil R2/2 holey carbon grids coated with SPHyNs without glow-discharge. The grids were blotted for 9 s at 70% humidity and 16 $^{\circ}\text{C}$ in an FEI Vitrobot plunge-freezer. Cryo-EM images were recorded on a FEI Tecnai Polara operating at 300 kV equipped with a Gatan K2 back-thinned direct detector operating in movie mode. Images were collected manually at a nominal

magnification of 115 000 \times , corresponding to a sampling density of 1.83 Å/pixel. Videos were collected for 8 s with a total of 40 frames with a calibrated dose of about 0.5 $e^{-}/\text{Å}^2$ per frame, at defocus values between -1.1 and $-3.9 \mu\text{m}$. A set of 154 micrographs was collected, and the frames were aligned by the algorithm of Li *et al.*³ Particles were picked using the semiautomatic procedure of EMAN Boxer,²⁶ and the micrograph-based CTF was determined with CTFIND3²⁷ in the RELION workflow.²⁸ The initial data set contained a total of 7630 particle images from 123 selected micrographs and were extracted using a box of 240 pixels. The particles were subjected to an initial two-dimensional reference-free classification in RELION to discard imperfect particles. Visual selection of particle classes with interpretable features resulted in a data set of 7138 particle images for 3D consensus refinement. A map based on the cryo-EM map of *Y. lipolytica* complex I¹⁸ was low-pass-filtered to 50 Å and used as an initial model for the 3D gold standard refinement in RELION. The postprocessing procedure implemented in RELION was applied to the final maps for B-factor sharpening and resolution validation.²⁹ The local resolution of the map was estimated by ResMap.³⁰ The complex I crystal structure (pdb code 4WZ7) was rigid-body-fitted, and figures were drawn in Chimera.³¹

Cryo-EM and 3D Reconstruction of *Polytomella* ATP Synthase Dimers. Mitochondria were isolated from *Polytomella* sp. cells (198.80, E.G. Pringsheim) as described previously.³² A 3 μL sample with a concentration of 1.5 mg/mL was applied to Quantifoil R2/2 grids coated with SPHyNs without glow-discharge treatment. Samples were blotted in an FEI Vitrobot Mark IV at 4 $^{\circ}\text{C}$ and 100% humidity for 10 s and plunged into liquid ethane. Data acquisition was carried out on a JEM-3200FSC equipped with an in-column energy filter and K2 Summit detector operated in counting mode. Micrographs were collected as 9 s movies of 0.2 s/frame with a dose rate of 11 $e^{-}/\text{pixel}/\text{s}$ and a pixel size of 1.14 Å. Motion between

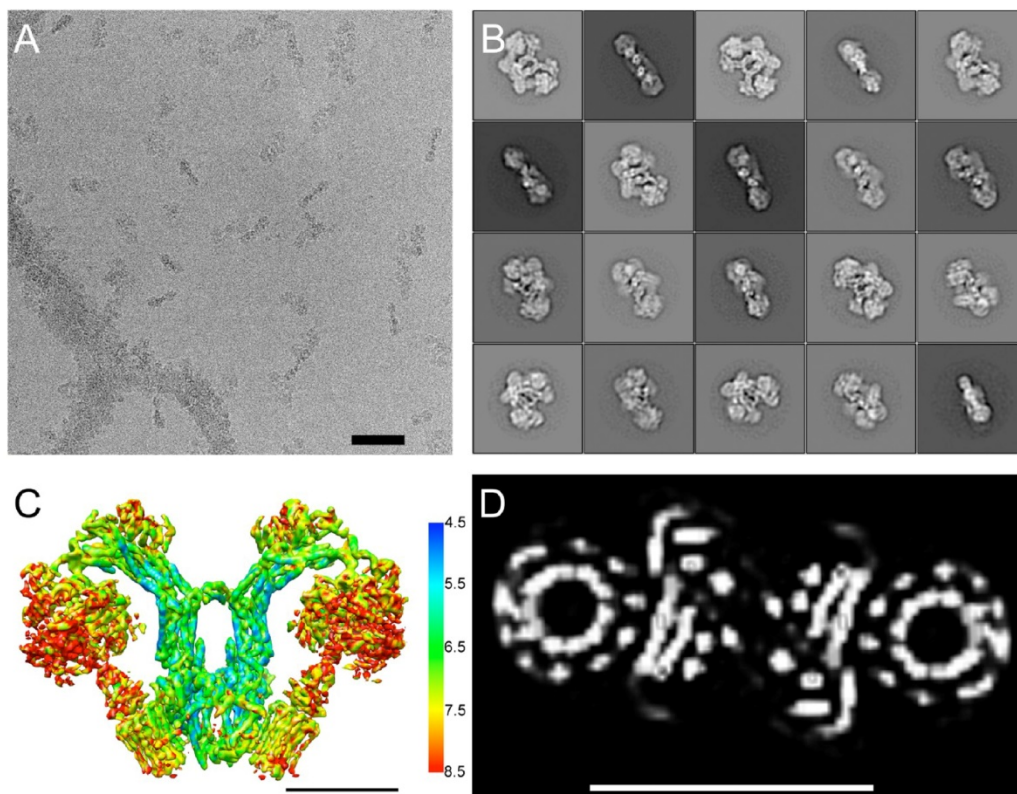


Figure 7. Cryo-EM of ATP synthase from *Polytomella* sp. vitrified on SPHyNs. (A) Cryo-EM image of vitrified *Polytomella* ATP synthase dimers and the SPHyN. (B) Two-dimensional class averages. (C) Structure of the ATP synthase dimer at a resolution of 6.4 Å using the local resolution result for coloring. The color scale is given in Å. (D) Horizontal section through the F_o part revealing the c_{10} rotor rings, six membrane-spanning α -helices per protomer, and the hairpin of long horizontal a-subunit helices. Scale bars: 50 nm (A), 10 nm (C,D).

frames was corrected by running Unblur^{33,34} without dose-filtering, followed by MotionCor2, with dose-filtering.³⁵ CTF estimation was carried out using CTFFind4³⁶ within the RELION workflow and was carried out on non-dose-filtered movie frames, summing 1, 2, or 4 frames. For each micrograph, defocus values from the run giving the best “Resolution to which Thon rings are fit” value were used. Micrographs for which this resolution was 7 Å or worse were discarded. All subsequent processing steps were carried out in Relion2 beta version.^{28,37} The summed images were used to extract hand-picked particles at a box size of 480 pixels, which were down-sampled to a box size of 240. The 3D refinement was carried out against a 40 Å low-pass-filtered starting model based on previous work¹⁹ using C_2 symmetry and a soft mask including the entire dimeric protein. Local resolution estimation was carried out using ResMap²⁹ within the Relion 2.0beta workflow. Figures were generated in Chimera.³¹

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsnano.7b03099.

Additional experimental details on the synthesis of monolayer-forming molecules, analysis of SPHyNs by AFM, cryo-EM images of complex I on other substrates, and cryo-EM validation are provided (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: aterfort@chemie.uni-frankfurt.de

*E-mail: daniel.rhinow@biophys.mpg.de

ORCID

Andreas Terfort: 0000-0003-2369-5151

Notes

The authors declare the following competing financial interest(s): A patent on the presented material is pending (EP 17169372.4).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Karin Siegmund for assistance with complex I purification, Deryck Mills for assistance with specimen preparation, and Özkan Yıldız and Juan F. Castillo-Hernández for computer support. The help of Niklas Döring and Marion Basoglu by providing access to the critical-point dryer is gratefully acknowledged. This work was funded by the German Research Council (DFG) Cluster of Excellence “Macromolecular Complexes” Frankfurt to W.K., DFG Grant TE 247/14-1 to A.T., and DFG Grant RH 134/1-1 to D.R.

REFERENCES

- (1) McMullan, G.; Chen, S.; Henderson, R.; Faruqi, A. R. Detective Quantum Efficiency of Electron Area Detectors in Electron Microscopy. *Ultramicroscopy* **2009**, *109*, 1126–1143.

- (2) Milazzo, A.-C.; Cheng, A.; Moeller, A.; Lyumkis, D.; Jacovetty, E.; Polukas, J.; Ellisman, M. H.; Xuong, N.-H.; Carragher, B.; Potter, C. S. Initial Evaluation of a Direct Detection Device Detector for Single Particle Cryo-Electron Microscopy. *J. Struct. Biol.* **2011**, *176*, 404–408.
- (3) Li, X.; Mooney, P.; Zheng, S.; Booth, C. R.; Braunfeld, M. B.; Gubbens, S.; Agard, D. A.; Cheng, Y. Electron Counting and Beam-Induced Motion Correction Enable Near-Atomic Resolution Single-Particle Cryo-EM. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 584–590.
- (4) Kühlbrandt, W. The Resolution Revolution. *Science* **2014**, *343*, 1443–1444.
- (5) Rhinow, D.; Kühlbrandt, W. Electron Cryo-Microscopy of Biological Specimens on Conductive Titanium-Silicon Metal Glass. *Ultramicroscopy* **2008**, *108*, 698–705.
- (6) Pantelic, R. S.; Suk, J. W.; Magnuson, C. W.; Meyer, J. C.; Wachsmuth, P.; Kaiser, U.; Ruoff, R. S.; Stahlberg, H. Graphene: Substrate Preparation and Introduction. *J. Struct. Biol.* **2011**, *174*, 234–238.
- (7) Russo, C. J.; Passmore, L. A. Controlling Protein Adsorption on Graphene for Cryo-EM Using Low-Energy Hydrogen Plasmas. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 649–652.
- (8) Rhinow, D.; Vonck, J.; Schranz, M.; Beyer, A.; Götzhäuser, A.; Hampp, N. Ultrathin Conductive Carbon Nanomembranes as Support Films for Structural Analysis of Biological Specimens. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 4345–4350.
- (9) Pantelic, R. S.; Meyer, J. C.; Kaiser, U.; Baumeister, W.; Plitzko, J. M. Graphene oxide: A Substrate for Optimizing Preparations of Frozen-Hydrated Samples. *J. Struct. Biol.* **2010**, *170*, 152–156.
- (10) Russo, C. J.; Passmore, L. A. Ultrastable Gold Substrate for Electron Cryo-Microscopy. *Science* **2014**, *346*, 1377–1379.
- (11) Cheung, M.; Kajimura, N.; Makino, F.; Ashihara, M.; Miyata, T.; Kato, T.; Namba, K.; Blocker, A. J. A Method to Achieve Homogeneous Dispersion of Large Transmembrane Complexes Within the Holes of Carbon Films for Electron Microscopy. *J. Struct. Biol.* **2013**, *182*, 51–56.
- (12) Meyerson, J. R.; Rao, P.; Kumar, J.; Chittori, S.; Banerjee, S.; Pierson, J.; Mayer, M. L.; Subramaniam, S. Self-Assembled Monolayer Improve Protein Distribution on Holey Carbon Cryo-EM Supports. *Sci. Rep.* **2015**, *4*, 7084.
- (13) Khan, M.; Huck, W. T. Hyperbranched Polyglycidol on Si/SiO₂ Surfaces via Surface-Initiated Polymerization. *Macromolecules* **2003**, *36*, 5088–5093.
- (14) Siegers, C.; Biesalski, M.; Haag, R. Self-Assembled Monolayers of Dendritic Polyglycerol Derivatives on Gold That Resist the Adsorption of Proteins. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10*, 2831–2838.
- (15) Kainthan, R. K.; Zou, Y.; Chiao, M.; Kizhakkepathy, J. N. Self-Assembled Monothiol-Terminated Hyperbranched Polyglycerols on a Gold Surface: A Comparative Study on the Structure, Morphology, and Protein Adsorption Characteristics with Linear Poly(ethylene Glycol)s. *Langmuir* **2008**, *24*, 4907–4916.
- (16) Wyszogrodzka, M.; Haag, R. Synthesis and Characterization of Glycerol Dendrons, Self-Assembled Monolayers on Gold: A Detailed Study of Their Protein Resistance. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1043–1054.
- (17) Weber, T.; Bechthold, M.; Winkler, T.; Dauselt, J.; Terfort, A. Direct Grafting of Anti-Fouling Polyglycerol Layers to Steel and Other Technically Relevant Materials. *Colloids Surf., B* **2013**, *111*, 360–366.
- (18) D'Imprima, E.; Mills, D. J.; Parey, K.; Brandt, U.; Kühlbrandt, W.; Zickermann, V.; Vonck, J. Cryo-EM Structure of Respiratory Complex I Reveals a Link to Mitochondrial Sulfur Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2016**, *1857*, 1935–1942.
- (19) Allegretti, M.; Klusch, N.; Mills, D. J.; Vonck, J.; Kühlbrandt, W.; Davies, K. M. Horizontal Membrane-Intrinsic α -Helices in the Stator α -Subunit of an F-type ATP Synthase. *Nature* **2015**, *521*, 237–240.
- (20) Hirst, J. Mitochondrial Complex I. *Annu. Rev. Biochem.* **2013**, *82*, 551–575.
- (21) Scheres, S. H.; Chen, S. Preventing Overfitting in Cryo-EM Structure Determination. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 853–854.
- (22) Suloway, C.; Pulokas, J.; Fellmann, D.; Cheng, A.; Guerra, F.; Quispe, J.; Stagg, S.; Potter, C. S.; Carragher, B. Automated Molecular Microscopy: The New Legion System. *J. Struct. Biol.* **2005**, *151*, 41–60.
- (23) Perepichka, I. F.; Besbes, M.; Levillain, E.; Salle, M.; Roncali, J. Hydrophilic Oligo(oxyethylene)-Derivatized Poly(3,4-ethylenedioxythiophenes): Cation-Responsive Optoelectrochemical Properties and Solid-State Chromism. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 449–457.
- (24) Rasband, W. S. *ImageJ*, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland; <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2016.
- (25) Kashani-Poor, N.; Kerscher, S.; Zickermann, V.; Brandt, U. Efficient Large-scale Purification of His-Tagged Protein Translocating NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from the Strictly Aerobic Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2001**, *1504*, 363–370.
- (26) Ludtke, S. J.; Baldwin, P. R.; Chiu, W. EMAN: Semiautomated Software for High-Resolution Single-Particle Reconstructions. *J. Struct. Biol.* **1999**, *128*, 82–97.
- (27) Mindell, J. A.; Grigorieff, N. Accurate Determination of Local Defocus and Specimen Tilt in Electron Microscopy. *J. Struct. Biol.* **2003**, *142*, 334–347.
- (28) Scheres, S. H. W. RELION: Implementation of a Bayesian Approach to Cryo-EM Structure Determination. *J. Struct. Biol.* **2012**, *180*, 519–530.
- (29) Chen, S.; McMullan, G.; Faruqi, A. R.; Murshudov, G. N.; Short, J. M.; Scheres, S. H. W.; Henderson, R. High-Resolution Noise Substitution to Measure Overfitting and Validate Resolution in 3D Structure Determination by Single Particle Electron Cryomicroscopy. *Ultramicroscopy* **2013**, *135*, 24–35.
- (30) Kucukelbir, A.; Sigworth, F. J.; Tagare, H. D. Quantifying the Local Resolution of Cryo-EM Density Maps. *Nat. Methods* **2013**, *11*, 63–65.
- (31) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera—a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- (32) van Lis, R.; Mendoza-Hernández, G.; Groth, G.; Atteia, A. New Insights into the Unique Structure of the F0F1-ATP Synthase from the Chlamydomonas Algae *Polytomella* sp. and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **2007**, *144*, 1190–1199.
- (33) Brilot, A. F.; Chen, J. Z.; Cheng, A.; Pan, J.; Harrison, S. C.; Potter, C. S.; Carragher, B.; Henderson, R.; Grigorieff, N. Beam-Induced Motion of Vitri-fied Specimen on Holey Carbon Film. *J. Struct. Biol.* **2012**, *177*, 630–637.
- (34) Campbell, M. G.; Cheng, A.; Brilot, A. F.; Moeller, A.; Lyumkis, D.; Pan, J.; Harrison, S. C.; Potter, C. S.; Carragher, B.; Grigorieff, N. Movies of Ice-Embedded Particles Enhance Resolution in Electron Cryo-Microscopy. *Structure* **2012**, *20*, 1823–1828.
- (35) Zheng, S. Q.; Palovcak, E.; Armache, J.-P.; Verba, K. A.; Cheng, Y.; Agard, D. A. MotionCor2: Anisotropic Correction of Beam-Induced Motion for Improved Cryo-Electron Microscopy. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 331–332.
- (36) Rohou, A.; Grigorieff, N. CTFIND4: Fast and Accurate Defocus Estimation from Electron Micrographs. *J. Struct. Biol.* **2015**, *192*, 216–221.
- (37) Scheres, S. H. W. A Bayesian View on Cryo-EM Structure Determination. *J. Struct. Biol.* **2012**, *180*, 406–418.

Reprinted with permission from

**Noncovalent Functionalization of Carbon Substrates with Hydrogels
Improves Structural Analysis of Vitrified Proteins
by Electron Cryo-Microscopy**

Julian Scherr, Alexander Neuhaus, Kristian Parey, Niklas Klusch, Bonnie J.
Murphy, Volker Zickermann, Werner Kühlbrandt, Andreas Terfort,
and Daniel Rhinow

ACS Nano **2019 Article ASAP**
DOI: 10.1021/acsnano.9b02651

Copyright 2019 American Chemical Society.

Noncovalent Functionalization of Carbon Substrates with Hydrogels Improves Structural Analysis of Vitrified Proteins by Electron Cryo-Microscopy

Julian Scherr,^{†,⊥} Alexander Neuhaus,^{‡,⊥} Kristian Parey,[‡] Niklas Klusch,[‡] Bonnie J. Murphy,[‡] Volker Zickermann,[§] Werner Kühlbrandt,[‡] Andreas Terfort,^{*,†,⊥} and Daniel Rhinow^{*,†,⊥}

[†]Department of Chemistry, Institute of Inorganic and Analytical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Str. 7, 60438 Frankfurt, Germany

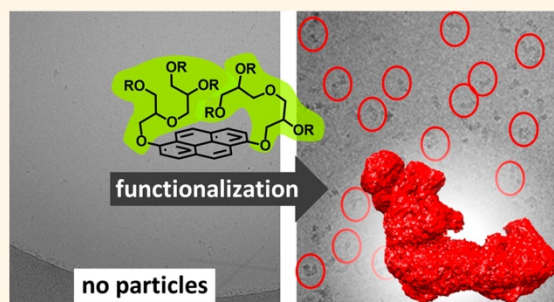
[‡]Department of Structural Biology, Max Planck Institute of Biophysics, Max-von-Laue-Str. 3, 60438 Frankfurt, Germany

[§]Structural Bioenergetics Group, Institute of Biochemistry II, Medical School, Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: In electron cryo-microscopy, structure determination of protein molecules is frequently hampered by adsorption of the particles to the support film material, typically amorphous carbon. Here, we report that pyrene derivatives with one or two polyglycerol (PG) side chains bind to the amorphous carbon films, forming a biorepulsive hydrogel layer so that the number of protein particles in the vitreous ice drastically increases. This approach could be extended by adding a hydrogel-functionalized carbon nanotube network (HyCaNet, the hydrogel again being formed from the PG-pyrene derivatives), which stabilized the protein-containing thin ice films during imaging with the electron beam. The stabilization resulted in reduced particle motion by up to 70%. These substrates were instrumental for determining the structure of a large membrane protein complex.

KEYWORDS: cryo-EM, self-assembly, membrane protein, biorepulsive, detergent



Electron cryo-microscopy (cryo-EM) of vitrified specimens is a powerful tool in structural biology. The method has benefited greatly from recent technological developments, such as direct electron detectors, which enable data acquisition with high signal-to-noise ratio,^{1–4} facilitating structure determination of biomolecules at near-atomic resolution. With these advances in data acquisition at hand, obtaining vitrified samples with sufficient quality and accessibility of the biomolecules for the electron beam now becomes the bottleneck for efficient structure determination. For cryo-EM, the specimens are immobilized in a thin layer of vitreous ice spanning the holes of a microstructured, nanometer-thin substrate, such as a holey carbon film. A recurrent problem is the depletion of biomolecules from the thin water layer owing to irreversible binding to the substrate film. The use of surfactants⁵ is not sufficient to solve this problem. Membrane proteins are particularly prone to adhesion, for example, to the frequently used amorphous carbon substrates. Furthermore, the presence of detergents,

which are used to keep membrane proteins in the aqueous solution, reduces the surface tension of the aqueous layer, resulting in water films that are extremely thin in most of the hole but thick around the edge, so that the biomolecules are pushed toward the carbon film.

Here, we present a method for the functionalization of amorphous carbon films to render them hydrophilic and biorepulsive and thus significantly improving the abundance of proteins in the ice film spanning the holes of the substrate. In extension, we use the same surface chemistry to deposit a network of biorepulsive single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) onto the substrates, resulting in an additional stabilization of the aqueous films. We also show that the SWCNTs reduce beam-induced movements of vitrified

Received: April 6, 2019

Accepted: May 21, 2019

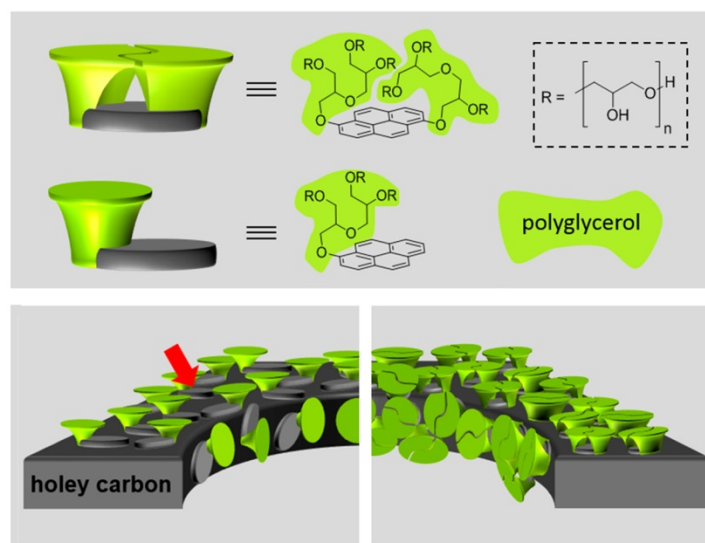


Figure 1. Graphic representation of the molecules used in this study and how they adsorb onto a holey film of amorphous carbon. Whereas, in case of $(\text{PG-O})_2$ -pyrene (top molecule), the dendrimeric polyglycerol unit (green) completely covers the surface, the data suggest that for the PG-O-pyrene derivative the hydrogel layer contains holes (red arrow in lower left panel), resulting in less efficient biorepulsive properties.

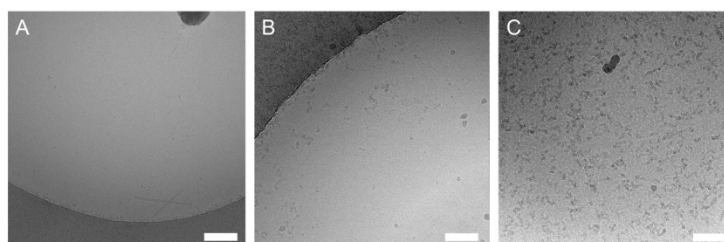


Figure 2. Cryo-EM images of mitochondrial complex I from *Yarrowia lipolytica* vitrified on carbon substrates that were treated by glow-discharge (A) or noncovalently functionalized with biorepulsive PG-O-pyrene (B) and $(\text{PG-O})_2$ -pyrene (C). Scale bars are 100 nm.

specimens because of their high mechanical stability and electrical conductivity, which further facilitates data acquisition.

RESULTS AND DISCUSSION

Amorphous carbon is a difficult substrate for surface modification, as it is disordered and exposes many sp^3 -hybridized carbon atoms. Treatment with air-based plasma, for example, by glow discharge introduces keto and carbinol groups, rendering the surface hydrophilic but not protein-repulsive. It has been reported that transmission electron microscopy (TEM) grids based on amorphous carbon have been modified by the noncovalent attachment of detergents consisting of an aliphatic moiety and a polar headgroup.⁵ Although this improves the wettability of the carbon films, it has not been conclusively shown that the film becomes biorepulsive. In an alternative approach, cross-linked hydrogel films have been prepared and transferred physically to the TEM grids.^{6,7} These hydrogels were obtained by cross-linking of films based on dendrimeric polyglycerol (PG), a polymer that has frequently been employed to attain biorepulsive surfaces.^{8–10} In a systematic study, we have found that PG derivatives of pyrene are well suited for the functionalization of

amorphous carbon surfaces. Previously, pyrene derivatives have already been used extensively for the surface modification of sp^2 -hybridized carbon derivatives, such as graphene or carbon nanotubes (CNTs).^{11–14}

The molecules used in this study were synthesized by a polymerization reaction of glycidol (2,3-epoxy-1-propanol) using either 1-hydroxypyrene or 1,6-dihydroxypyrene as an initiator, resulting in the formation of 1-(polyglyceroloxo)-pyrene (PG-O-pyrene, average molar weight 4300 g mol^{-1}) and 1,6-bis(polyglyceroloxo)pyrene ($(\text{PG-O})_2$ -pyrene, average molar weight 7100 g mol^{-1}), respectively. To confirm that they bind to amorphous carbon, we recorded infrared reflection absorption (IRRA) spectra of amorphous carbon films before and after incubation with aqueous solutions of $(\text{PG-O})_2$ -pyrene or PG-O-pyrene. In both cases, similar spectra of surface-bound PG groups were obtained (see Figure S2 in the Supporting Information). However, ellipsometric analysis demonstrated that the deposition of $(\text{PG-O})_2$ -pyrene leads to higher film thicknesses ($6.7 \pm 0.2 \text{ nm}$) as compared to those with PG-O-pyrene ($1.1 \pm 0.1 \text{ nm}$). When these layers were exposed to solutions of bovine serum albumin (BSA) as a test protein, their thickness increased by $0.06 \pm 0.06 \text{ nm}$ ($(\text{PG-O})_2$ -pyrene) and $0.7 \pm 0.1 \text{ nm}$ (PG-O-pyrene). This

B

DOI: 10.1021/acsnano.9b02651
ACS Nano XXXX, XXX, XXX–XXX

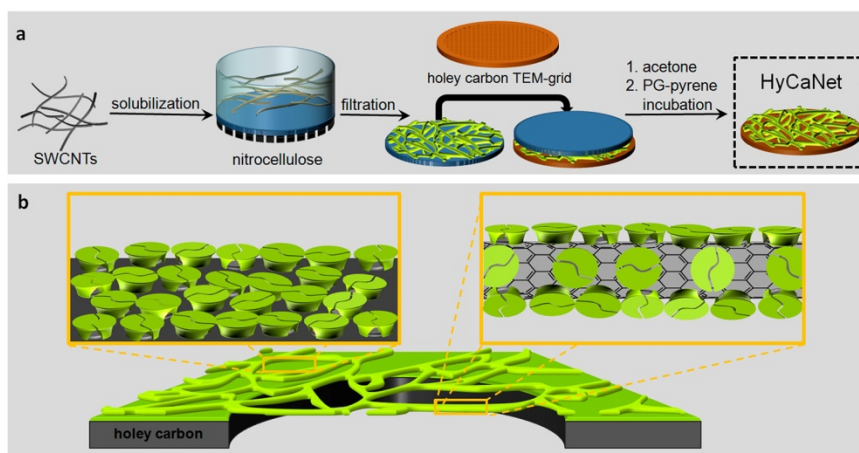


Figure 3. (a) Fabrication of hydrogel-functionalized carbon nanotube networks (HyCaNets). First, single-walled carbon nanotubes are solubilized using the PG-pyrene derivatives and then deposited onto a nitrocellulose filter. Next, the membrane is mounted on a holey carbon substrate, and the nitrocellulose membrane is removed by being dissolved in acetone. Finally, the complete assembly is once more incubated in a PG-pyrene solution. (b) Sketch of the final HyCaNet assembly, where the biorepulsive polyglycerol-terminated pyrene ((PG-O)₂-pyrene) noncovalently binds to the holey carbon film and the SWCNTs. This biorepulsive structure prevents the adsorption of the proteins while stabilizing the water film in the holes mechanically and, during imaging of vitrified samples, by dissipation of the electrical charge.

demonstrated that the (PG-O)₂-pyrene layer was completely biorepulsive, but the PG-O-pyrene layer was only partly biorepulsive, which might be explained by an incomplete coverage of the surfaces by the PG dendrimers if only one per pyrene unit is applied (compare Figure 1, lower left panel). Therefore, functionalization of holey carbon films with (PG-O)₂-pyrene should render them biorepulsive, leading to a higher protein concentration in the aqueous film spanning the holes. To test this central hypothesis, we prepared cryogenic samples of *Yarrowia lipolytica* mitochondrial complex I, a hydrophobic membrane protein complex, on amorphous carbon films with 2 μm holes (Quantifoil R2/2 grids) that had been treated with either aqueous solutions of (PG-O)₂-pyrene, PG-O-pyrene, or by glow discharge. The respective cryo-EM images are shown in Figure 2 and clearly demonstrate the expected trend: whereas almost no protein particles were found in the holes of the carbon film treated by glow discharge (Figure 2A), some isolated particles were present in the holes of the film covered with PG-O-pyrene (Figure 2B) and many more in the one treated with (PG-O)₂-pyrene (Figure 2C).

Quantitative evaluation revealed that within a typical cryo-EM image of 679 nm × 679 nm, the area concentration of individual protein particles in the holes of the (PG-O)₂-pyrene-treated grids is more than twice as high (31.2 per image) as that for the PG-O-pyrene-covered ones (14.5 per image). This is in accordance with the results obtained by ellipsometric measurements, IRRAS, and the biorepulsivity test mentioned above. The PG-O-pyrene derivative covers the amorphous carbon substrate less effectively (see red arrow in Figure 1) compared to the (PG-O)₂-pyrene molecule, leading to diminished biorepulsive characteristics. Although the intermediate behavior of the PG-O-pyrene might be considered a disadvantage, the differences in the particle distribution for PG-O-pyrene and (PG-O)₂-pyrene can be used to tune the number of particles in the holes when dilution of the protein solution is problematic.

A fundamental problem in cryo-EM is the beam-induced movement of the particles during image acquisition.¹⁵ Although beam-induced movement of particles can be partially compensated by postprocessing of cryo-EM micrographs,³ it remains a problem that causes contrast loss at high resolution. We tested whether SWCNTs, which have a very high mechanical stiffness and are highly conductive depending on their chirality,^{16–18} can be used to stabilize the particles in thin films of vitrified water. To render these nanomaterials biorepulsive as the rest of the system, we tested again PG-O-pyrene and (PG-O)₂-pyrene, as the binding of pyrene derivatives to (SW)CNTs is well established.¹¹ Indeed, a couple of PG-derived amphiphiles have been explored for the modification of SWCNTs before, mainly with the goal of solubilizing them in water-based solvents.^{19–21} However, the only reported combination of a pyrene unit with a PG headgroup showed just a poor solubilization efficiency for the SWCNTs.¹⁹ We therefore tested the ability of (PG-O)₂-pyrene and (PG-O)-pyrene to render SWCNTs hydrophilic, using a number of detergents used in membrane protein biochemistry as benchmarks. We found that (PG-O)₂-pyrene has a very good solubilization efficiency comparable to that of dodecyl maltoside (DDM), whereas PG-O-pyrene solubilizes SWCNTs less effectively (see Figure S3 in the Supporting Information). By adapting a procedure from Wu *et al.*,²² the PG-stabilized SWCNT dispersions were first filtered onto a nitrocellulose carrier forming an interconnected nanotube network, the density of which could be adjusted by varying the initial nanotube concentration. The functionalized SWCNT network was then transferred onto a holey carbon TEM grid by bringing the nitrocellulose filter into contact with the carbon film and then dissolving the filter membrane in acetone (see Figure 3a). To also render the carbon film biorepulsive, the complete grid was incubated in a solution of the pyrene derivative (Figure 3b). Figure 4 shows a TEM image of such a hydrogel-functionalized carbon nanotube network (HyCaNet) mounted on a Quantifoil R2/2 substrate.

C

DOI: 10.1021/acsnano.9b02651
ACS Nano XXXX, XXX, XXX–XXX

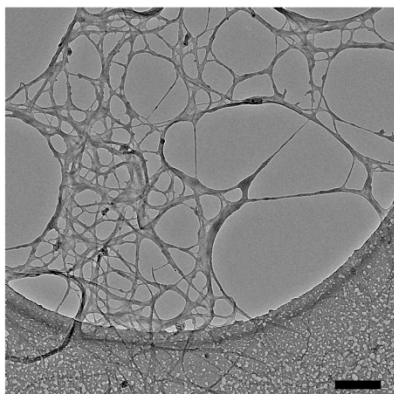


Figure 4. TEM image of a HyCaNet. The hydrogel-functionalized nanotubes were deposited onto a Quantifoil R2/2 substrate. Scale bar is 200 nm.

To verify that the HyCaNets indeed reduce the motion of the particles in the vitreous ice film, we used an established protocol²³ to determine the time-dependent movement of gold nanoparticles during image acquisition. For this, the relative positions of a number of gold nanoparticles in the ice film were measured with respect to a gold nanoparticle adherent to the carbon film (Figure 5A, black line). To also observe movements in the z direction (perpendicular to the film plane), the grids were tilted by 45° around the axis indicated in red in Figure 5A.

Figure 5B demonstrates that HyCaNets considerably reduce beam-induced movements of the particles in the vitrified specimens. Whereas at longer measuring time, the movement is reduced by about 50%, in the critical first few frames, beam-induced movement is even reduced by ~70%. This significantly improves the acquisition of high-resolution cryo-EM images, where beam-induced movements can only partly be removed by postprocessing.

To confirm that HyCaNets improve the abundance of particles in the ice, vitrified samples of complex I from *Y. lipolytica* were analyzed by cryo-EM. For the HyCaNets prepared with (PG-O)₂-pyrene, on average, 25.6 isolated particles per image were found, whereas those grids prepared with PG-O-pyrene exposed only 12.6 particles per image (Figure 6A). These numbers are slightly lower than those observed with the hydrogel-covered carbon films without HyCaNets. This can be explained by the fact that the HyCaNets cover about 10–20% of the hole aperture. The subdivision of 2 μm holes into smaller holes by the presence of the HyCaNets improves the homogeneous distribution of the protein complexes, further facilitating data acquisition. Very similar results were obtained with the membrane protein ATP synthase from *Polytomella* sp. (Figure 6B), which is difficult to analyze by cryo-EM as it has a strong tendency to adsorb to the carbon film.²⁴

To demonstrate that HyCaNets are useful for determining the 3D structure of a large protein complex, we used complex I from *Y. lipolytica* as a test specimen. By using 1463 particles, we obtained a 3D electron density map at a resolution of 25 Å (Figure 7) that shows details of the quaternary structure of this protein complex.²⁵

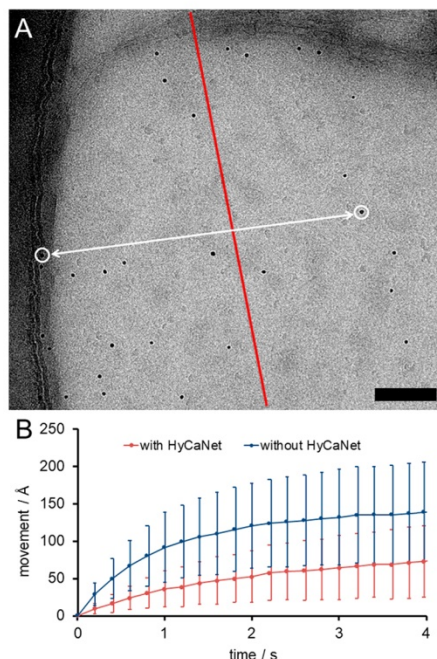


Figure 5. Movement of gold nanoparticles in vitreous ice with and without HyCaNets. (A) TEM image of gold nanoparticles in vitrified ice acquired at 45° tilt, with the tilt axis indicated in red. The distances between pairs of nanoparticles were analyzed, which included one nanoparticle attached to the carbon substrate and the other in the free-standing ice film. The scale bar is 100 nm. (B) Dose-dependent movements of nanoparticles with HyCaNets and glow-discharge-treated Quantifoil R2/2 grids. Average values were calculated from 21 image stacks with and 20 image stacks without HyCaNets. The measured displacements consist of movements in the x – y plane as well as in the z direction. The electron dose was 2 e^- /(pixel × frame).

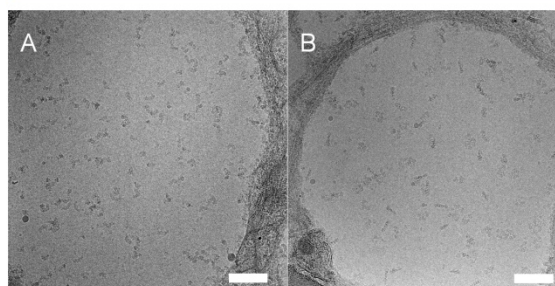


Figure 6. High-resolution cryo-EM image of mitochondrial complex I from *Y. lipolytica* (A) and *Polytomella* ATP synthase (B) vitrified with HyCaNets mounted on Quantifoil R2/2 grids. Scale bars are 100 nm.

CONCLUSIONS

We demonstrate that the noncovalent functionalization of holey carbon films with biorepulsive hydrogels by pyrene derivatives facilitates specimen preparation for cryo-EM, in particular, for detergent-solubilized membrane proteins. The functionalization significantly improves the distribution of the proteins in the film of vitrified water spanning the holes of the

D

DOI: 10.1021/acsnano.9b02651
ACS Nano XXXX, XXX, XXX–XXX

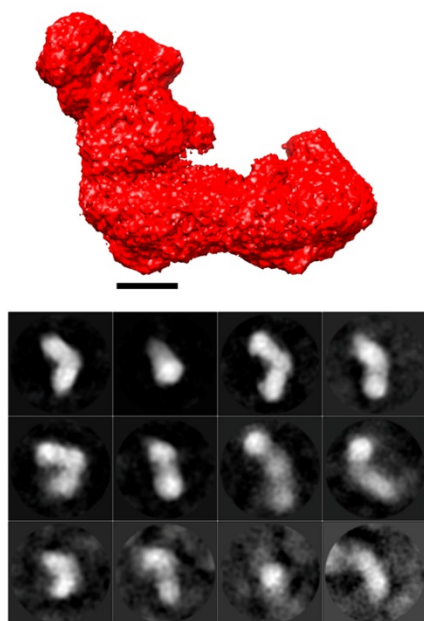


Figure 7. (Top) 3D density map of complex I from *Y. lipolytica* at 25 Å resolution. Scale bar is 5 nm. (Bottom) Selected 2D class averages.

carbon film, as the hydrogel prevents depletion of the proteins by suppressing unspecific adsorption to the amorphous carbon film. Further improvement was achieved by depositing a network of SWCNTs, modified by the same pyrene derivatives, which mechanically stiffens the amorphous ice film and dissipates charge induced by the electron beam. With these HyCaNets, the beam-induced particle movement is reduced by up to 70%, improving the acquisition of high-resolution cryo-EM images. Together, a better distribution of particles in the holes and reduced beam-induced movement accelerate the structure determination of proteins (and presumably other particles) by cryo-EM, saving time and costs.

EXPERIMENTAL SECTION

Functionalization of Amorphous Carbon Films. Quantifoil R2/2 grids were incubated in 0.1% solutions of the pyrene derivative (PG-O-pyrene or (PG-O)₂-pyrene) in water for at least 3 h, briefly washed in water, and dried. Cryo-EM images were recorded and processed as described previously.⁷

Solubilization of SWCNTs. SWCNTs (electric arc discharge method, Sigma 750492) were solubilized at concentrations of 0.5 or 1 mg/mL in aqueous solutions (0.5 or 1%) of the pyrene derivative or the detergent (see the Supporting Information for details) using a tip sonifier (Branson Digital Sonifier 250D, 10% intensity, 90 min, 3 s on, 1 s off). Nonsolubilized and clustered SWCNTs were removed by centrifugation at 4000g for 10 min and 122000g (rotor: TLA120.2) for 30 min, respectively.

Preparation of HyCaNet Grids. Thin SWCNT networks were prepared using a modified procedure adapted from Wu *et al.*²² Solubilized CNTs were diluted with a solution of 0.05% of the respective pyrene derivative or detergent to a concentration with OD₆₀₀ = 0.01. For the preparation of HyCaNets, (PG-O)₂-pyrene was used to solubilize SWCNTs. A total of 10–20 mL of the diluted SWCNTs was filtered through a nitrocellulose carrier, semidried, and washed with doubly distilled H₂O.

Chloroform-washed Quantifoil R2/2 grids were placed carbon side up on a filter paper. A small piece of nitrocellulose with filter-deposited SWCNTs was placed on top of the grid with the SWCNTs facing the carbon film. The whole assembly was placed in an acetone atmosphere until the nitrocellulose was dissolved. The grids were washed excessively in several acetone baths and finally in methanol. The resulting HyCaNet grids were incubated in 0.1% (PG-O)₂-pyrene for at least 3 h, briefly washed in water, and dried.

Analysis of HyCaNet Grids by TEM. HyCaNet grids were analyzed at room temperature in a FEI Tecnai Spirit transmission electron microscope operating at an accelerating voltage of 120 kV. Images were acquired using a Gatan 4k*4k CCD camera.

Preparation of Cryo-Samples and Cryo-EM. Mitochondrial complex I from *Y. lipolytica* and ATP synthase dimers from *Polytomella* sp. were purified as described previously.⁷ Samples for cryo-EM were prepared as described previously⁷ with the difference that the grids (Quantifoil R2/2) with and without HyCaNet were incubated in 0.1% (PG-O)₂-pyrene for at least 3 h followed by washing with water. Cryo-EM images were recorded and processed as described previously.⁷

Evaluation of Beam-Induced Movement. Dose fractionation movies of a vitrified sample with gold fiducials were recorded using an FEI Tecnai Polara equipped with a Gatan K2 direct electron detector. Movies were collected at 45° tilt with 40 frames in 8 s and a dose rate of approximately 0.5 e⁻/Å².

To exclude stage movement, dose-dependent distances between pairs of nanoparticles within a single image stack were measured (Figure 5A). Gold fiducials close to image corners at the left (carbon) and the right (ice) were selected and manually tracked in each frame of the movies. The absolute change of distance between two particles based on the first frame was calculated for every frame, and the average for all pairs of nanoparticles was calculated for horizontal and vertical distances. Only horizontal distances were included. Error bars indicate the standard deviation.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsnano.9b02651.

Synthesis and characterization of (PG-O)₂-pyrene and PG-O-pyrene, adsorption results on amorphous carbon films, solubilization of SWCNTs by different surface-active compounds (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: aterfort@chemie.uni-frankfurt.de.

*E-mail: daniel.rhinow@biophys.mpg.de.

ORCID

Volker Zickermann: 0000-0001-8461-8817

Andreas Terfort: 0000-0003-2369-5151

Daniel Rhinow: 0000-0003-4266-086X

Author Contributions

[†]J.S. and A.N. contributed equally to this project.

Notes

The authors declare the following competing financial interest(s): A patent on this method has been filed.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the German Research Council (DFG) with Grant No. TE 247/14-1 to A.T. and Grant No. RH 134/1-1 to D.R.

REFERENCES

- (1) McMullan, G.; Faruqi, A. R.; Henderson, R.; Guerrini, N.; Turchetta, R.; Jacobs, A.; van Hofen, G. Experimental Observation of the Improvement in MTF from Backthinning a CMOS Direct Electron Detector. *Ultramicroscopy* **2009**, *109*, 1144–1147.
- (2) Milazzo, A. C.; Cheng, A.; Moeller, A.; Lyumkis, D.; Jacovetty, E.; Polukas, J.; Ellisman, M. H.; Xuong, N. H.; Carragher, B.; Potter, C. S. Initial Evaluation of a Direct Detection Device Detector for Single Particle Cryo-Electron Microscopy. *J. Struct. Biol.* **2011**, *176*, 404–408.
- (3) Li, X.; Mooney, P.; Zheng, S.; Booth, C. R.; Braunfeld, M. B.; Gubbens, S.; Agard, D. A.; Cheng, Y. Electron Counting and Ebeam-Induced Motion Correction Enable Near-Atomic-Resolution Single-Particle Cryo-EM. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 584–590.
- (4) Kühlbrandt, W. The Resolution Revolution. *Science* **2014**, *343*, 1443–1444.
- (5) Quispe, J.; Damiano, J.; Mick, S.; Nackashi, D.; Fellmann, D.; Ajero, T.; Carragher, B.; Potter, C. An Improved Holey Carbon Film for Cryo-Electron Microscopy. *Microsc. Microanal.* **2007**, *13*, 365–371.
- (6) Meyerbröker, N.; Zharnikov, M. Ultraflexible, Freestanding Nanomembranes Based on Poly(Ethylene Glycol). *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3328–3332.
- (7) Scherr, J.; Parey, K.; Klusch, N.; Murphy, B. J.; Balsler, S.; Neuhaus, A.; Zickermann, V.; Kühlbrandt, W.; Terfort, A.; Rhinow, D. Self-Perforated Hydrogel Nanomembranes Facilitate Structural Analysis of Proteins by Electron Cryo-Microscopy. *ACS Nano* **2017**, *11*, 6467–6473.
- (8) Khan, M.; Huck, W. T. S. Hyperbranched Polyglycidol on Si/SiO₂ Surfaces via Surface-Initiated Polymerization. *Macromolecules* **2003**, *36*, 5088–5093.
- (9) Wyszogrodzka, M.; Haag, R. Synthesis and Characterization of Glycerol Dendrons, Self-Assembled Monolayers on Gold: A Detailed Study of Their Protein Resistance. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1043–1054.
- (10) Weber, T.; Bechthold, M.; Winkler, T.; Dauselt, J.; Terfort, A. Direct Grafting of Anti-fouling Polyglycerol Layers to Steel and Other Technically Relevant Materials. *Colloids Surf., B* **2013**, *111*, 360–366.
- (11) Chen, R. J.; Zhang, Y. G.; Wang, D. W.; Dai, H. J. Noncovalent Sidewall Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Protein Immobilization. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3838–3839.
- (12) Pantelic, R. S.; Fu, W.; Schoenenberger, C.; Stahlberg, H. Rendering Graphene Supports Hydrophilic with Non-Covalent Aromatic Functionalization for Transmission Electron Microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **2014**, *104*, 134103–134107.
- (13) Simmons, T. J.; Bult, J.; Hashim, D. P.; Linhardt, R. J.; Ajayan, P. M. Noncovalent Functionalization as an Alternative to Oxidative Acid Treatment of Single Wall Carbon Nanotubes with Applications for Polymer Composites. *ACS Nano* **2009**, *3*, 865–870.
- (14) Georgakilas, V.; Otyepka, M.; Bourlinos, A. B.; Chandra, V.; Kim, N.; Kemp, K. C.; Hobza, P.; Zboril, R.; Kim, K. S. Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6156–6214.
- (15) Brilot, A. F.; Chen, J. Z.; Cheng, A.; Pan, J.; Harrison, S. C.; Potter, C. S.; Carragher, B.; Henderson, R.; Grigorieff, N. Beam-Induced Motion of Vitrified Specimen on Holey Carbon Film. *J. Struct. Biol.* **2012**, *177*, 630–637.
- (16) Treacy, M. M. J.; Ebbesen, T. W.; Gibson, J. M. Exceptionally High Young's Modulus Observed for Individual Carbon Nanotubes. *Nature* **1996**, *381*, 678–680.
- (17) Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A. Carbon Nanotubes—the Route Toward Applications. *Science* **2002**, *297*, 787–792.
- (18) Tans, S. J.; Devoret, M. H.; Dai, H. J.; Thess, A.; Smalley, R. E.; Geerligs, L. J.; Dekker, C. Individual Single-Wall Carbon Nanotubes as Quantum Wires. *Nature* **1997**, *386*, 474–477.
- (19) Popeney, C. S.; Setaro, A.; Mutihac, R.; Bluemmel, P.; Trappmann, B.; Vonneman, J.; Reich, S.; Haag, R. Polyglycerol-Derived Amphiphiles for the Solubilization of Single-Walled Carbon Nanotubes in Water: A Structure-Property Study. *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 203–211.
- (20) Setaro, A.; Popeney, C. S.; Trappmann, B.; Datsyuk, V.; Haag, R.; Reich, S. Polyglycerol-Derived Amphiphiles for Single Walled Carbon Nanotube Suspension. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *493*, 147–150.
- (21) Setaro, A.; Popeney, C. S.; Witt, M. U.; Bluemmel, P.; Glaeske, M.; Haag, R.; Reich, S. Chiral Selectivity of Polyglycerol-Based Amphiphiles Incorporating Different Aromatic Cores. *Phys. Status Solidi B* **2015**, *252*, 2536–2540.
- (22) Wu, Z.; Chen, Z.; Du, X.; Logan, J. M.; Sippel, J.; Nikolou, M.; Kamaras, K.; Reynolds, J. R.; Tanner, D. B.; Hebard, A. F.; Rinzler, A. G. Transparent, Conductive Carbon Nanotube Films. *Science* **2004**, *305*, 1273–1276.
- (23) Russo, C. J.; Passmore, L. A. Ultrastable Gold Substrates for Electron Cryomicroscopy. *Science* **2014**, *346*, 1377–1380.
- (24) Allegretti, M.; Klusch, N.; Mills, D. J.; Vonck, J.; Kühlbrandt, W.; Davies, K. M. Horizontal Membrane-Intrinsic α -Helices in the Stator a-Subunit of an F-Type ATP Synthase. *Nature* **2015**, *521*, 237–240.
- (25) D'Imprima, E.; Mills, D. J.; Parey, K.; Brandt, U.; Kühlbrandt, W.; Zickermann, V.; Vonck, J. Cryo-EM Structure of Respiratory Complex I Reveals a Link to Mitochondrial Sulfur Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2016**, *1857*, 1935–1942.

Reprinted with permission from

**Multicomponent patterned ultrathin carbon nanomembranes
by laser ablation**

Natalie Frese, Julian Scherr, André Beyer, Andreas Terfort, Armin
Gölzhäuser,
Norbert Hampp, Daniel Rhinow

Applied Surface Science **2018**, 427, 126-130

DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.07.303

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



Full Length Article

Multicomponent patterned ultrathin carbon nanomembranes by laser ablation



Natalie Frese^a, Julian Scherr^b, André Beyer^a, Andreas Terfort^b, Armin Götzhäuser^a, Norbert Hampp^c, Daniel Rhinow^{d,*}

^a University of Bielefeld, Faculty of Physics, Universitätsstr. 25, D-33615, Bielefeld, Germany

^b Goethe-University Frankfurt, Department of Chemistry, Max-von-Laue-Str. 9, D-60438, Frankfurt, Germany

^c Philipps-University Marburg, Department of Chemistry, Hans-Meerwein-Str. 4, D-35032, Marburg, Germany

^d Max Planck Institute of Biophysics, Department of Structural Biology, Max-von-Laue-Str. 3, D-60438, Frankfurt, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 May 2017

Received in revised form 25 July 2017

Accepted 31 July 2017

Available online 5 August 2017

Keywords:

Two-dimensional materials

Scanning electron microscopy

Helium ion microscopy

X-ray photoelectron spectroscopy

Self-assembly

Laser patterning

ABSTRACT

Carbon nanomembranes (CNMs) are a class of two-dimensional materials, which are obtained by electron beam-induced crosslinking of aromatic self-assembled monolayers (SAMs) on solid substrates. CNMs made from a single type of precursor molecule are uniform with homogeneous chemical and physical properties. We have developed a method for the fabrication of internally patterned CNMs resembling a key feature of biological membranes. Direct laser patterning is used to obtain multicomponent patterned SAMs on gold, which are subsequently crosslinked by electron irradiation. We demonstrate that the structure of internally patterned CNMs is preserved upon transfer to different substrates. The method enables rapid fabrication of patterned 2D materials with local variations in chemical and physical properties on the micrometer to centimeter scale.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A technologically interesting feature of biological membranes is the formation of complex patterns by two-dimensional self-assembly of biomolecular building blocks in a 5 nm thin lipid matrix [1]. Self-assembled monolayers (SAMs) of thiols on gold have been studied extensively as model systems for self-assembly and pattern formation in two dimensions [2,3]. A variety of techniques has been used to pattern SAMs including UV lithography [4,5], microcontact printing [6], dip pen lithography [7], electron beam lithography [8,9], and direct laser patterning [10–15]. Direct laser patterning (DLP) of SAMs enables rapid fabrication of multicomponent surface structures with lateral dimensions in the micrometer to centimeter range [13], which is particularly useful for the fabrication of protein-surface [16] and cell-surface interfaces [17]. However, patterned thiol SAMs are not stable in the absence of the gold support, which precludes their transfer as a continuous membrane to another substrate.

It has been shown that SAMs of aromatic thiols can be crosslinked by irradiation with low-energy electrons [18]. Upon removal of the gold substrate, 1 nm thin free-standing carbon nanomembranes (CNMs) were obtained [19–21]. Depending on the aromatic precursor molecule, thickness and mechanical properties of CNMs can be tuned [22]. Owing to their low thickness, CNMs have been successfully applied as support films for transmission electron microscopy of biological specimens [23,24]. Furthermore, chemically patterned CNMs have been used as templates for the fabrication of nanostructures such as polymer carpets [25] or bio-hybrid assemblies [26].

CNMs made from a single precursor molecule are in principle uniform. Selective electron beam-induced crosslinking of aromatic SAMs, followed by exchange of thiols in the non-exposed areas and subsequent crosslinking of the heterogeneous SAM has been applied to fabricate chemically patterned CNMs [27]. A disadvantage of this method is the fact that crosslinked areas cannot be patterned multiple times. In this work, we used DLP to fabricate internally patterned CNMs and transferred them to different substrates. DLP enables rapid fabrication of chemically patterned aromatic SAMs, which are subsequently crosslinked to form internally patterned ultrathin CNMs with locally varying chemical and physical properties. Internally patterned CNMs were analyzed by X-

* Corresponding author.

E-mail address: daniel.rhinow@biophys.mpg.de (D. Rhinow).

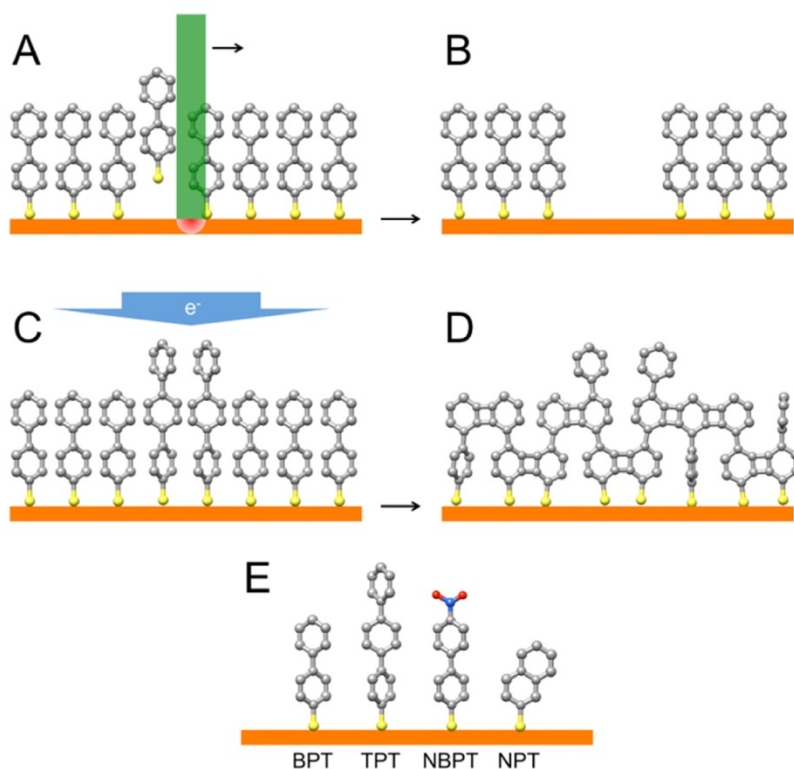


Fig. 1. Fabrication of internally patterned CNMs by direct laser patterning. (A) A SAM of aromatic thiols is formed on a gold surface. The SAM consists of BPT molecules. A focused laser beam ($\lambda = 532$ nm) is used to impart thermal energy to a confined area on the gold substrate causing desorption of aromatic thiols (B). (C) The gaps are filled with a second thiol, in this case TPT. Irradiation with low-energy electrons causes crosslinking of the aromatic thiols. (D) Internally patterned CNM. (E) Aromatic thiols used for the fabrication of patterned CNMs. BPT: 1'-Biphenyl-4-thiol; TPT: [1''',4',1',1]-terphenyl-4-thiol; NBPT: 4'-nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol; NPT: naphthalene-2-thiol. Owing to the generation of hydrogen radicals during crosslinking, the nitro groups of NBPT are converted to amino groups (4'-amino-1,1'-biphenyl-4-thiol: ABPT) [29].

ray photoelectron microscopy (XPS), scanning electron microscopy (SEM) and helium ion microscopy (HIM).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

1,1'-Biphenyl-4-thiol (BPT), [1''',4',1',1]-terphenyl-4-thiol (TPT), and naphthalene-2-thiol (NPT) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), 4'-nitro-1,1'-biphenyl-4-thiol (NBPT) was purchased from Taros Chemicals. Gold on silicon with titanium adhesion layer was purchased from Georg Albert PVD (Silz, Germany). Gold substrates suitable for subsequent transfer of patterned CNMs were made by depositing 200 nm of gold onto polished (100) silicon wafers. SAMs were formed by immersion in 10 mM solutions of aromatic thiols in organic solvents at room temperature. We used acetone (BPT, TPT, NPT), heptane (BPT), toluene (BPT, TPT), and dimethylformamide (NBPT) as solvents.

2.2. Direct laser patterning

DLP of aromatic thiols on gold was accomplished with a frequency-doubled Nd:YVO₄ diode pumped solid state laser (Explorer XP 532-5, Newport, USA) emitting 6 ns pulses (FWHM) with a 50 kHz repetition rate at a wavelength of $\lambda = 532$ nm. Photons of this wavelength are absorbed by the gold surface only. The laser beam was focused to a spot diameter of 15 μ m. In previous work, the optimum energy deposited to the sample was deter-

mined to 111 MW/cm² [11]. The energy deposited to the sample was adjusted with a polarizing beam splitter coupled to a polarizer. To optimize the patterning result, SAMs were patterned with decreasing laser power. After laser irradiation, patterned SAMs were immersed in a solution of the second thiol at room temperature.

2.3. Transfer of patterned CNMs

Damage-free transfer of CNMs was accomplished as described previously [20]. For the transfer of the patterned CNM, the film was protected with a double-layer of poly(methylmethacrylate) (PMMA) by spin-coating. Then the gold was exfoliated by angular dipping of the silicon wafer into water. The floating film on water was transferred to different solutions using a piece of silicon wafer. The gold was etched by placing the thin gold film on an aqueous iodine solution (10 wt% potassium iodide, 2.5 wt% iodine in water). Afterwards the PMMA-protected patterned CNM was placed on an aqueous potassium iodide solution (10 wt% potassium iodide in water). Finally, the film was transferred to a substrate (silicon or gold), the PMMA was removed by immersion in acetone for 2 h, and the substrate was dried in a stream of nitrogen.

2.4. Scanning electron microscopy (SEM)

Samples were analyzed in a Zeiss Auriga at an acceleration voltage of 5 kV using the in-lens detector for secondary electrons.

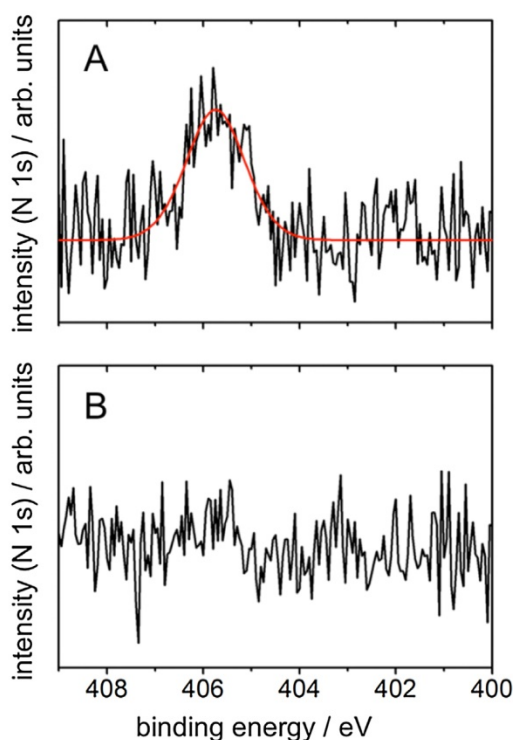


Fig. 2. Incorporation of NBPT into a BPT SAM with and without DLP. (A) XP spectrum obtained from a BPT SAM after laser irradiation and subsequent immersion in a solution containing NBPT for 72 h. The spectrum reveals the N 1s peak at 405.7 eV indicating the incorporation of NBPT. (B) XP spectrum of a BPT sample, which was immersed in a solution containing NBPT for 72 h. The N 1s peak is absent.

2.5. Helium ion microscopy (HIM)

Samples were imaged in a Zeiss Orion Plus at acceleration voltages between 30 and 36 kV and currents between 0.4–4 pA. An electron floodgun was used to mitigate electrostatic charging while secondary electrons were detected with an Everhart-Thornley detector.

2.6. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

Samples were analyzed in an Omicron Multiprobe UHV system using monochromatic Al K α irradiation, a Sphera electron analyzer with a resolution of 0.9 eV and an emission angle of 20°.

3. Results and discussion

Fig. 1 illustrates the use of DLP to fabricate internally patterned CNMs consisting of crosslinked aromatic SAMs on a gold surface. This approach enabled us to fabricate patterned CNMs from a variety of aromatic precursor molecules (Fig. 1E).

To confirm that laser irradiation leads to spatially selective desorption of aromatic thiols by photothermal cleavage of the gold-sulfur bond (Fig. 1A and B), we analyzed the incorporation of NBPT into a BPT SAM with and without prior laser irradiation.

Fig. 2A shows XP spectra of a BPT SAM, which was irradiated with a focused laser beam ($\lambda = 532$ nm) and subsequently immersed in a solution containing NBPT. The XP spectrum reveals the N 1s signal at a binding energy of 405.7 eV, indicating the incorporation of NBPT molecules into gaps formed by photothermal desorption of BPT molecules. Our experiments are in accordance with previous

results obtained with DLP of NBPT SAMs [28]. Without prior laser irradiation, immersion of a BPT SAM on gold in a solution containing NBPT does not lead to incorporation of NBPT as confirmed by XPS (Fig. 2B). This demonstrates that self-exchange of aromatic thiols at room temperature is negligible at the time scale of a few days.

It is of critical importance that the structure of patterned SAMs is preserved after electron beam-induced crosslinking. We analyzed a patterned BPT SAM, consisting of TPT lines written into a BPT SAM, by HIM before (Fig. 3A) and after (Fig. 3B) crosslinking with electrons. Fig. 3C shows an SEM image of the same sample after crosslinking. Our experiments reveal that structure and chemical contrast of patterned aromatic thiol SAMs are preserved after crosslinking by electron irradiation.

Our experiments reveal that structure and chemical contrast of patterned aromatic thiol SAMs are preserved after crosslinking by electron irradiation. Furthermore, our analysis enables a direct comparison of HIM and SEM as tools for imaging patterned SAMs. SEM is suitable for the analysis of patterned SAMs as thiols produce chemical contrast in the secondary electron image in dependence of chain length, terminal groups, and acceleration voltage [30–33]. Recently, HIM has been used to analyze monolayers on solid substrates [34,35]. Interestingly, the same pattern appears with different contrast in HIM and SEM SE images. The TPT lines appear with a dark center and a bright rim in the HIM image (Fig. 3B), whereas in the SEM image TPT lines appear uniformly darker than the BPT matrix. This could be explained by the fact that in the SEM most secondary electrons (SE) are generated in the gold substrate and their contrast is determined by a stronger attenuation in TPT, as compared to BPT. Conversely, contrast in the HIM images is largely determined by SE generated in the organic film and is more influenced by the film's thickness and topography. On the other hand, it may also be that local heating of the gold substrate during DLP causes subtle rearrangements in the gold, which cause changes in SE contrast in HIM images only, owing to the high sensitivity of HIM towards surface chemistry. More work on charge-particle interaction in molecular films is needed to understand the subtle differences in the contrasts of HIM and SEM images.

The formation of mechanically stable membranes was confirmed by successful transfer of internally patterned CNMs to other substrates. Fig. 4A shows wetting patterns on a patterned CNM after transfer to a gold substrate, observed by light microscopy upon exposing the sample to humid air. Although quantitative description of wetting patterns is difficult, wetting is a fast method to visualize chemical patterns by light microscopy. Areas containing ABPT and BPT can be clearly distinguished in HIM (Fig. 4B) and SEM (Fig. 4C) SE images of the same sample.

It has been shown earlier that DLP can be used to fabricate patterned SAMs of arbitrary complexity [13]. We applied DLP to fabricate internally patterned CNMs consisting of three different types of aromatic molecules (Fig. 4D). Fig. 4D shows a SEM image of a transferred patterned CNM consisting of patterns of BPT, TPT, and NPT, which demonstrates that DLP enables the fabrication of multicomponent patterned CNM. In difference to SE images of crosslinked patterned SAMs, acquired before transfer to other substrates (Fig. 3B and C), transferred membranes produce identical contrast in HIM and SEM images (Fig. 4B and C). The mechanisms behind contrast generation in HIM SE images of monolayers on solid substrates require further elucidation.

4. Conclusions

We have demonstrated that DLP is a versatile tool for the fabrication of internally patterned CNMs. Like biological membranes, patterned CNMs consist of distinct chemical domains, which cause

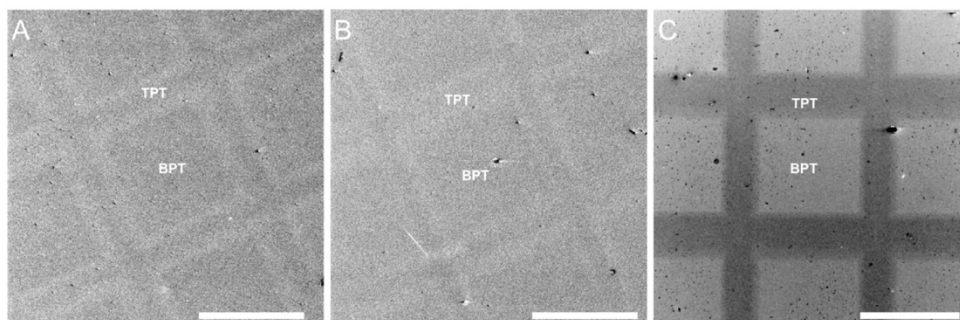


Fig. 3. Analysis of patterned aromatic SAMs by HIM and SEM. Secondary electron (SE) HIM images of a patterned SAM before (A) and after (B) crosslinking by electron irradiation. Apart from a small loss in contrast, the patterns are preserved. (C) SE SEM image of the sample after crosslinking. Scale bars are 100 μm .

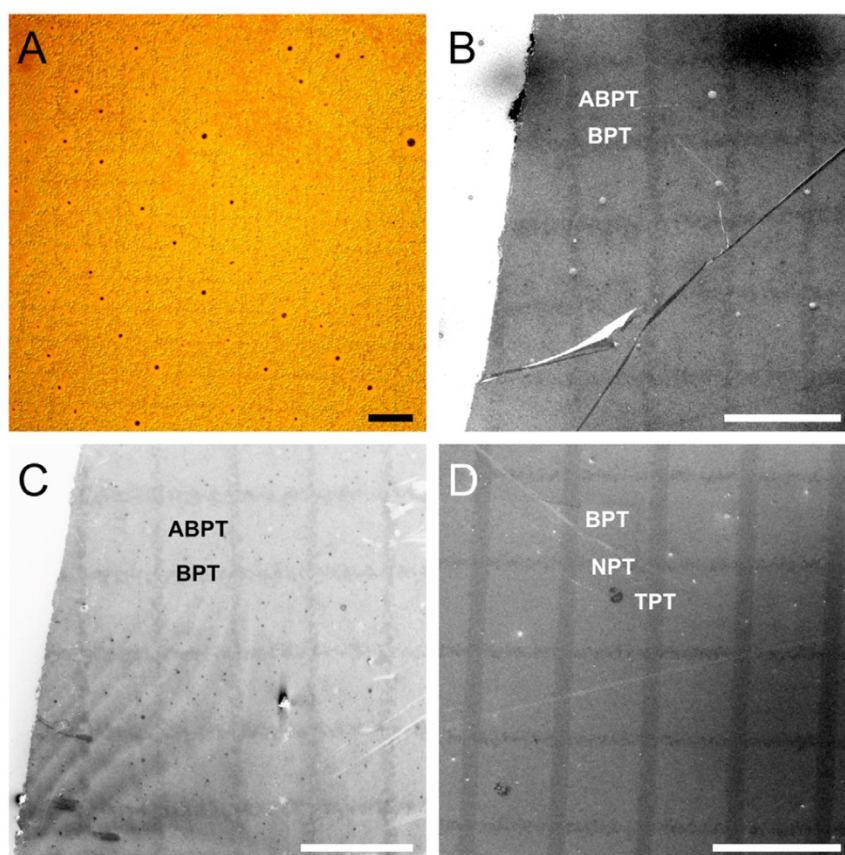


Fig. 4. Structural analysis of patterned CNMs transferred to different substrates. (A) Wetting patterns observed by light microscopy after transfer to a gold substrate. The CNM has been obtained by crosslinking of a NBPT SAM containing lines of BPT. Upon crosslinking, NBPT molecules were converted to amino-terminated molecules (ABPT) [29]. (B) The same sample imaged by HIM and SEM (C). Shown are SE images acquired at the edge of internally patterned CNMs. BPT lines appear darker than the ABPT matrix. (D) SEM image of a patterned CNM, consisting of three aromatic precursor molecules, after transfer to a silicon substrate. Scale bars are 200 μm .

local variation of physical and chemical properties. Future work should address the analysis of mechanical properties of patterned CNM. This could be accomplished by methods, which enable local determination of mechanical properties, such as atomic force microscopy. Combining DLP of SAMs on a solid substrate with subsequent crosslinking resembles a universal scheme for the rapid fabrication of chemically patterned 2D materials with patterns from the biologically relevant micrometer up to the centimeter

scale thus widening the spectrum of available nanomembranes [36] with technologically interesting properties.

Acknowledgements

We thank Werner Kühlbrandt for support and a critical reading of the manuscript. This work was funded by German Research Council (DFG) Cluster of Excellence “Macromolecular Complexes”

Frankfurt, DFG grant GO 918/14-1 to AG, DFG grant HA 2906/9-1 to NH, DFG grant TE 247/14-1 to AT, and DFG grant RH 134/1-1 to DR.

References

- [1] K. Jacobson, O.G. Mouritsen, R.G. Anderson, Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics, *Nat. Cell. Biol.* 9 (2007) 7–14.
- [2] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1103–1169.
- [3] F. Schreiber, Structure and growth of self-assembling monolayers, *Prog. Surf. Sci.* 65 (2000) 151–256.
- [4] J.Y. Huang, D.A. Dahlgren, J.C. Hemminger, Photopatterning of Self-Assembled Alkanethiolate Monolayers on Gold – a Simple Monolayer Photoresist Utilizing Aqueous Chemistry, *Langmuir* 10 (1994) 626–628.
- [5] M.E. Anderson, M. Mihok, H. Tanaka, L.P. Tan, M.W. Horn, G.S. McCarty, P.S. Weiss, Hybrid approaches to nanolithography: photolithographic structures with precise controllable nanometer-scale spacings created by molecular rulers, *Adv. Mater.* 18 (2006) 1020–1022.
- [6] A. Kumar, G.M. Whitesides, Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching, *Appl. Phys. Lett.* 63 (1993) 2002–2004.
- [7] R.D. Piner, J. Zhu, F. Xu, S.H. Hong, C.A. Mirkin, Dip-pen nanolithography, *Science* 283 (1999) 661–663.
- [8] M.J. Lercel, G.F. Redinbo, F.D. Pardo, M. Rooks, R.C. Tiberio, P. Simpson, H.G. Craighead, C.W. Sheen, A.N. Parikh, D.L. Allara, Electron-beam lithography with monolayers of alkylthiols and alkylsiloxanes, *J. Vac. Sci. Technol. B* 12 (1994) 3663–3667.
- [9] A. Golzhauser, W. Eck, W. Geyer, V. Stadler, T. Weimann, P. Hinze, M. Grunze, Chemical nanolithography with electron beams, *Adv. Mater.* 13 (2001) 803–806.
- [10] M.R. Shadnam, S.E. Kirkwood, R. Fedosejevs, A. Amirfazli, Direct patterning of self-assembled monolayers on gold using a laser beam, *Langmuir* 20 (2004) 2667–2676.
- [11] D. Rhinow, N.A. Hampp, Forming microstructured alkanethiol self-assembled monolayers on gold by laser ablation, *IEEE Trans. Nanobiosci.* 5 (2006) 188–192.
- [12] T. Balgar, S. Franzka, E. Hasselbrink, N. Hartmann, Laser-assisted fabrication of submicron-structured hydrophilic/hydrophobic templates for the directed self-assembly of alkylsiloxane monolayers into confined domains, *Appl. Phys. A* 82 (2006) 15–18.
- [13] D. Rhinow, N.A. Hampp, Solid-supported multicomponent patterned monolayers, *Adv. Mater.* 19 (2007) 1967–1972.
- [14] L. Iversen, O. Younes-Metzler, K.L. Martinez, D. Stamou, Chemically specific laser-induced patterning of alkanethiol SAMs: characterization by SEM and AFM, *Langmuir* 25 (2009) 12819–12824.
- [15] D. Rhinow, N.A. Hampp, Patterned self-assembled monolayers of alkanethiols on copper nanomembranes by submerged laser ablation, *Appl. Phys. A* 107 (2012) 755–759.
- [16] A. Schroter, S. Franzka, N. Hartmann, Photothermal laser fabrication of micro- and nanostructured chemical templates for directed protein immobilization, *Langmuir* 30 (2014) 14841–14848.
- [17] J.H. Slater, J.S. Miller, S.S. Yu, J.L. West, Fabrication of multifaceted micropatterned surfaces with laser scanning lithography, *Adv. Funct. Mater.* 21 (2011) 2876–2888.
- [18] W. Geyer, V. Stadler, W. Eck, M. Zharnikov, A. Götzhäuser, M. Grunze, Electron-induced crosslinking of aromatic self-assembled monolayers: negative resists for nanolithography, *Appl. Phys. Lett.* 75 (1999) 2401–2403.
- [19] W. Eck, A. Küller, M. Grunze, B. Völkel, A. Götzhäuser, Freestanding nanosheets from crosslinked biphenyl self-assembled monolayers, *Adv. Mater.* 17 (2005) 2583–2587.
- [20] A. Turchanin, A. Beyer, C.T. Nottbohm, X.H. Zhang, R. Stosch, A. Sologubenko, J. Mayer, P. Hinze, T. Weimann, A. Golzhauser, One nanometer thin carbon nanosheets with tunable conductivity and stiffness, *Adv. Mater.* 21 (2009) 1233–1237.
- [21] A. Turchanin, A. Golzhauser, Carbon nanomembranes from self-assembled monolayers: functional surfaces without bulk, *Prog. Surf. Sci.* 87 (2012) 108–162.
- [22] P. Angelova, H. Vieker, N.E. Weber, D. Matei, O. Reimer, I. Meier, S. Kurasch, J. Biskupek, D. Lorbach, K. Wunderlich, L. Chen, A. Terfort, M. Klapper, K. Mullen, U. Kaiser, A. Golzhauser, A. Turchanin, A universal scheme to convert aromatic molecular monolayers into functional carbon nanomembranes, *ACS Nano* 7 (2013) 6489–6497.
- [23] D. Rhinow, M. Buenfeld, N.E. Weber, A. Beyer, A. Golzhauser, W. Kuhlbrandt, N. Hampp, A. Turchanin, Energy-filtered transmission electron microscopy of biological samples on highly transparent carbon nanomembranes, *Ultramicroscopy* 111 (2011) 342–349.
- [24] D. Rhinow, J. Vonck, M. Schranz, A. Beyer, A. Golzhauser, N. Hampp, Ultrathin conductive carbon nanomembranes as support films for structural analysis of biological specimens, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 12 (2010) 4345–4350.
- [25] I. Amin, M. Steenackers, N. Zhang, R. Schubel, A. Beyer, A. Golzhauser, R. Jordan, Patterned polymer carpets, *Small* 7 (2011) 683–687.
- [26] A. Turchanin, A. Tinazli, M. El-Desawy, H. Grossann, M. Schnietz, H.H. Solak, R. Tampe, A. Golzhauser, Molecular self-assembly, chemical lithography, and biochemical tweezers: a path for the fabrication of functional nanometer-scale protein arrays, *Adv. Mater.* 20 (2008) 471–477.
- [27] A. Beyer, A. Godt, I. Amin, C.T. Nottbohm, C. Schmidt, J. Zhao, A. Golzhauser, Fully cross-linked and chemically patterned self-assembled monolayers, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (2008) 7233–7238.
- [28] A. Schroter, S. Franzka, J. Koch, B.N. Chichkov, A. Ostendorf, N. Hartmann, Femtosecond-laser processing of nitrophenylthiol self-assembled monolayers, *Appl. Surf. Sci.* 278 (2013) 43–46.
- [29] W. Eck, V. Stadler, W. Geyer, M. Zharnikov, A. Golzhauser, M. Grunze, Generation of surface amino groups on aromatic self-assembled monolayers by low energy electron beams – A first step towards chemical lithography, *Adv. Mater.* 12 (2000) 805–808.
- [30] G.P. Lopez, H.A. Biebuyck, G.M. Whitesides, Scanning electron-Microscopy can form images of patterns in self-assembled monolayers, *Langmuir* 9 (1993) 1513–1516.
- [31] A.G. Bittermann, S. Jacobi, L.F. Chi, H. Fuchs, R. Reichelt, Contrast studies on organic monolayers of different molecular packing in FESEM and their correlation with SFM data, *Langmuir* 17 (2001) 1872–1877.
- [32] N.H. Mack, R. Dong, R.G. Nuzzo, Quantitative imaging of protein adsorption on patterned organic thin-film arrays using secondary electron emission, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 7871–7881.
- [33] C. Srinivasan, T.J. Mullen, J.N. Hohman, M.E. Anderson, A.A. Dameron, A.M. Andrews, E.C. Dickey, M.W. Horn, P.S. Weiss, Scanning electron microscopy of nanoscale chemical patterns, *ACS Nano* 1 (2007) 191–201.
- [34] G. Hlawacek, V. Veligura, S. Lorbek, T.F. Mocking, A. George, R. van Gastel, H.J.W. Zandvliet, B. Poelsema, Imaging ultra thin layers with helium ion microscopy: utilizing the channeling contrast mechanism, *Beilstein J. Nanotechnol.* 3 (2012) 507–512.
- [35] A. George, M. Knez, G. Hlawacek, D. Hagedoorn, H.H.J. Verputten, R. van Gastel, J.E. ten Elshof, Nanoscale patterning of organosilane molecular thin films from the gas phase and its applications: fabrication of multifunctional surfaces and large area molecular templates for site-selective material deposition, *Langmuir* 28 (2012) 3045–3052.
- [36] J.A. Rogers, M.G. Lagally, R.G. Nuzzo, Synthesis, assembly and applications of semiconductor nanomembranes, *Nature* 477 (2011) 45–53.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation

**„Funktionelle Oberflächenbeschichtungen und
Nanomembranen zur Untersuchung von Biomolekülen“**

selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, _____, _____

(Julian Scherr)

Julian Johannes Scherr

Ackergasse 11
61440 Oberursel

julian.scherr@gmail.com

Persönliche Informationen

Geburtsdatum: 18. Juni 1989 in Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig



Beruflicher und akademischer Werdegang

04/2014 - heute	Goethe Universität Frankfurt am Main Wissenschaftlicher Mitarbeiter/ Promotion am Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Arbeitskreis von Prof. Dr. Andreas Terfort Forschungsschwerpunkte: Oberflächenchemie, Analytik, metall-/organische Synthese <ul style="list-style-type: none"> • Präparation und Charakterisierung von Nanomembranen und Metall-/Metalloxid-Oberflächen, sowie deren organische Beschichtungen • metall-/organische Synthese komplexer, organischer Moleküle und Polymere • Oberflächenanalytische Methoden: IRRAS, XPS, AFM, REM, XRD, SPR, Ellipsometrie • Analytische Methoden: TXRF, HPLC, LC, IC, IR, NMR, ESI, Maldi, GC-MS, UV-VIS, Cyclovoltammetrie • Kooperationen: <i>Drägerwerk AG & Co. KGaA, TDK-Micronas GmbH, Quantifoil Micro Tools GmbH</i>, Universitäten Kiel/Jena, Max-Planck-Institut Frankfurt
04/2014 - 07/2014 11/2012 - 02/2013 05/2012 - 08/2012	Goethe Universität Frankfurt am Main Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Anorganische und Analytische Chemie <ul style="list-style-type: none"> • Praktikum Allgemeine und Analytische Chemie, Anleitung von Studentengruppen
2006 - 2015	Alt-Oberurseler Brauhaus GmbH Aushilfskraft Gastronomie, Mitarbeiter-/Thekenmanagement

Ausbildung

04/2012 - 02/2014	Goethe Universität Frankfurt am Main Master of Science in Chemie (Abschluss: 1.0, mit Auszeichnung) Betreuer: Prof. Dr. Andreas Terfort (Note der Abschlussarbeit: 1.0)
10/2008 - 03/2012	Goethe Universität Frankfurt am Main Bachelor of Science in Chemie (Abschluss: 1.4, sehr gut) Betreuer: Prof. Dr. Alexander Heckel (Note der Abschlussarbeit: 1.0)
1999 - 2008	Gymnasium Oberursel, Oberursel (Taunus) Allgemeine Hochschulreife

Stipendien

06/2014 - 12/2014	Promotionsstipendium des Institutes für Anorganische und Analytische Chemie der Goethe Universität Frankfurt am Main
-------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Besondere Kenntnisse

Sprachkenntnisse	Deutsch (Muttersprache) Englisch (fließend in Wort und Schrift) Französisch (gute Kenntnisse, Gymnasium) Japanisch (Grundkenntnisse, Sprachschule Frankfurt)
Weiterbildungen	Projektmanagement GPM-Basiszertifikat (PM-ZERT, Januar 2019) GxP-Training (Pharmaakademie, September 2018) Writing for Natural Scientists (Goethe Universität Frankfurt, März 2016)
Arbeitstechniken	Glovebox- und Schlenktechnik, Hochdruckreaktionen (Autoklav), Hochvakuum-technik, Arbeiten im Reinraum, Arbeiten im gentechnischen Labor (S1)
EDV-Kenntnisse	MS-Office (Word, Excel, Powerpoint), Origin, ChemDraw, Omnic Specta, MestReNova, Photoshop, MS-Project
Weiteres Engagement	GDCh-JungChemikerForum Frankfurt (2011 - 2017, Regionalsprecher 2013 - 2015) - Planung und Durchführung von Vortragsreihen und Workshops - Organisation der Frankfurter Jobbörse für Naturwissenschaftler/-innen - Gestaltung der Internetpräsenz (Regionalforum und Jobbörse) Ersthelfer im Arbeitskreis Terfort und im anorganischen Praktikum Inhaltliche Konzeption und Durchführung der Weihnachtsvorlesung 2017 Mitglied im Deutschen GO-Bund e.V.

Publikationen

1. J. Scherr, A. Neuhaus, K. Parey, N. Klusch, B. J. Murphy, V. Zickermann, W. Kühlbrandt, A. Terfort, D. Rhinow „Non-Covalent Functionalization of Carbon Substrates with Hydrogels Improves Structural Analysis of Vitrified Proteins by Electron Cryo-Microscopy“ *ACS Nano* 2019 (accepted)
2. N. Frese, J. Scherr, A. Beyer, A. Terfort, A. Gölzhäuser, N. Hampp, D. Rhinow „Multicomponent patterned ultrathin carbon nanomembranes by laser ablation“ *Applied Surface Science* 2018, 427, 126-130
3. J. Scherr, K. Parey, N. Klusch, B. J. Murphy, S. Balsler, A. Neuhaus, V. Zickermann, W. Kühlbrandt, A. Terfort, D. Rhinow „Self-Perforated Hydrogel Nanomembranes Facilitate Structural Analysis of Proteins by Electron Cryo-Microscopy“ *ACS Nano* 2017, 11, 6467-6473
4. X.-J. Yu, J.-L. Zhuang, J. Scherr, T. Abu-Husein, A. Terfort „Minimization of Surface Energies and Ripening Outcompete Template Effects in the Surface Growth of Metal–Organic Frameworks“ *Angewandte Chemie International Edition* 2016, 55, 8348-8352

Konferenzbeiträge

1. J. Scherr (2018) *Self-Perforated Hydrogel Nanomembranes (SPHyNs) Facilitate Structural Analysis of Proteins by Electron Cryo-Microscopy*, EUPOC2018, Como (Italien)
2. J. Scherr (2017) *Functional Nanomembranes for electron microscopy of biological samples*, ECOF15, Dresden (Deutschland)