

Miniaturisierte Synthese von kombinatorischen Arrays fluoreszierender Moleküle *via* nano3D-Laserprinting

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von
M. Sc. Andreas Klinkusch
aus
Pforzheim

1. Referent: Prof. Dr. Frank Breitling
 2. Referentin: Prof. Dr. Ute Schepers
- Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2021

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient habe. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung wissenschaftlicher Praxis habe ich beachtet. Des Weiteren erkläre ich, dass ich mich derzeit in keinem laufenden Promotionsverfahren befinde, und auch keine vorausgegangenen Promotionsversuche unternommen habe. Die elektronische Version der Arbeit stimmt mit der schriftlichen Version überein und die Primärdaten sind gemäß der Satzung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT beim Institut für Mikrostrukturtechnologie (IMT) abgegeben und archiviert.

Karlsruhe, 28.10.2021

Zusammenfassung

Hochdurchsatzverfahren sind eine Schlüsseltechnik, bei der Entwicklung und Untersuchung neuer Stoffe. Bei der Entwicklung neuer Medikamente, in der Materialforschung oder in der Katalysatorforschung kommen Hochdurchsatzsyntheseverfahren zum Einsatz¹⁻⁵. Die Evaluation dieser Stoffbibliotheken wird oft in Form von Molekülarrays^{3, 6} durchgeführt. Häufig werden die zu untersuchenden Stoffe in automatisierten Parallelsynthesen hergestellt und über Roboter auf den Array-Träger aufpipettiert. Ein weiterer Ansatz zur Herstellung solcher Arrays ist die *in situ*-Synthese kombinatorischer Stoffbibliotheken auf dem Array-Träger. Hierbei können verschiedene Linkersysteme benutzt werden um die zu synthetisierenden Stoffe bis zu ihrer Untersuchung an Ort und Stelle zu verankern.³⁻⁶ Droplet-Microarrays erlauben hingegen eine *in-situ*-Synthese ohne eine kovalente Anknüpfung an die Syntheseoberfläche.⁷⁻⁹

Diese Arbeit befasst sich mit einem neuartigen Konzept zur linkerfreien *in situ*-Synthese von hochdichten Molekülarrays. Zu diesem Zweck wurden die einzelnen Reaktanden per Laserimpuls in Nanoschichten auf die Arrayoberfläche übertragen. Auf diese Weise ist es möglich Molekülarrays mit einer Spotdichte von bis zu 17.000 Spots/cm² herzustellen.¹⁰⁻¹¹ Pro Spot werden bei der Synthese dieser Arrays nur wenige Piko-bis Femtomol der jeweiligen Stoffe übertragen, was zusätzlich zur Material- und Kosteneffizienz der vorgestellten Methode beiträgt.^{10, 12}

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der laserinduzierte Materialtransfer genauer untersucht. Es wurde unter anderem der Zusammenhang zwischen angewandter Transferenergie und übertragenem Materialvolumen betrachtet. Um die übertragene Materialmenge sowie das Spotvolumen an verschiedenste Anwendungen besser anpassen zu können wurden des Weiteren verschiedene Methoden untersucht, die eine zusätzliche Modulation des Materialübertrags erlauben. Des Weiteren wurden versucht anhand verschiedener Stoffeigenschaften eine Abhängigkeit des materialspezifischen Transfervolumens nachzuweisen.

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Anwendung des nano3D-Lasersystems zur chemischen Synthese von Fluorophoren. Unter Beachtung der im ersten Teil gewonnenen Erkenntnisse wurde gezeigt, dass es möglich ist hochdichte Molekülarrays ohne Verwendung von Linkersystemen über einen laserinduzierten Materialtransfer herzustellen. Die durchgeführten Reaktionen konnten mittels Fluoreszenzanalyse verifiziert werden. Auf diese Weise ist es möglich kombinatorisch hochdichte Arrays herzustellen und zu analysieren. Anschließend wurden verschiedene Syntheseparameter optimiert und ein kombinatorischer Fluorophor-Array als *proof of concept* synthetisiert.

Im dritten Teil wurde gezeigt, dass es möglich ist die durchgeführten Reaktionen ohne Verlust der Ortsinformation mithilfe orts aufgelöster, Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisierung (MALDI) Massenspektroskopie (MS) nachzuweisen. Auf diese Weise

können auch nicht fluoreszierende Moleküle identifiziert werden. Des Weiteren können Reaktionsprodukte mit ähnlichen Fluoreszenz-spektroskopischen Eigenschaften klar getrennt analysiert werden. Durch die Optimierung der Prozessparameter war es somit möglich die Synthese verschiedene Fluorophore im Array-Format auf einer modifizierten Glasoberfläche nachzuweisen. Durch den laserinduzierten Übertrag verschiedener Matrixmaterialien konnte zudem die verwendete MALDI-Matrix lokal variiert werden. Die freie Variation der MALDI-Matrix in individuellen Synthesespots erlaubt eine optimierte Analyse verschiedenster Stoffe, was den weitreichenden Einsatz des nano3D-lasersystems zur Kombinatorischen Synthese von Molekülarrays ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Theoretische Grundlagen	2
2.1.	Kondensationsreaktionen	2
2.1.1.	Chemische Peptidsynthese	2
2.1.2.	KNOEVENAGEL-Kondensation	4
2.2.	Festphasensynthese	5
2.3.	Hochdurchsatzsynthese	7
2.3.1.	Parallelsynthese	7
2.3.2.	Split-and-mix-Synthese	8
2.3.3.	Molekülarrays	9
2.4.	Analysemethoden hochdichter Molekülarrays	10
2.4.1.	Rasterelektronenmikroskopie	10
2.4.2.	Rasterkraftmikroskopie	12
2.4.3.	Vertikale Scanninginterferometrie	13
2.4.4.	MALDI-MS-Imaging	14
2.5.	Nano3D-Lasersystem	15
2.6.	Beschichtungsmethoden zur Donorherstellung	17
2.6.1.	Rotationsbeschichtung	18
2.6.2.	Rakelbeschichtung	19
2.7.	Fluoreszenz	20
2.7.1.	Exciplex und Excimer	23
3.	Ziel der Arbeit	25
4.	Hauptteil	26
4.1.	Untersuchung des Materialtransfers	26
4.1.1.	Vorarbeiten	26
4.1.2.	Ermittlung eines geeigneten Transferenergie-Bereichs	28
4.1.3.	Untersuchung der übertragenen Materialmengen	32
4.1.4.	Einfluss der Donor-Beschichtung auf die übertragene Materialmenge	36
4.1.4.1.	Einfluss der Zusammensetzung der Transferschicht	36
4.1.4.2.	Einfluss der Filmdicke der Transferschicht	39
4.1.4.3.	Donorbeschichtung <i>via</i> Rakeltechnik	42
4.1.5.	Wiederholter Materialtransfer	44
4.1.6.	Transfer verschiedener Materialien	48
4.2.	Kombinatorische Fluorophor-Synthese <i>via</i> laserinduzierten Materialtransfer	55
4.2.1.	Vorarbeiten	55
4.2.1.1.	Reaktionsanforderungen	64
4.2.2.	Synthese der Referenzfluorophore	65
4.2.3.	Laserunterstützte Synthese von DiPhABI	69

4.2.4.	Überprüfung der Homogenität	78
4.2.5.	Optimierung der Reaktionsbedingungen:	82
4.2.5.1.	Optimierung der Reaktionszeit	82
4.2.5.2.	Reaktionsführung im Lösungsmitteldampf	85
4.2.5.3.	Untersuchung der Abhängigkeit der Reaktionsqualität von der übertragenen Materialmenge	88
4.2.6.	Materialtransfer unter Verwendung definierter Abstände zwischen Donor und Akzeptor ⁹⁰	
4.2.7.	Kombinatorische Synthese zur Herstellung eines Arrays fluoreszierender Moleküle	97
4.3.	Reaktionsnachweis über orts aufgelöste Massenspektrometrie	106
4.3.1.	Vorarbeiten	106
4.3.2.	Nachweis anknüpfungsfreier Reaktionen	107
4.3.3.	Identifikation geeigneter Akzeptoroberflächen für einen orts aufgelösten Massenachweis	108
4.3.4.	Massenspektroskopischer Nachweis der laserunterstützten Synthese von Fluorophoren	114
4.3.5.	Massenspektroskopischer Reaktionsnachweis durch laserinduzierten Übertrag der MALDI-Matrix	117
5.	Zusammenfassung und Ausblick	122
5.1.	Laserinduzierter Materialtransfer	122
5.2.	Anknüpfungsfreie kombinatorische Fluorophorsynthese	123
5.3.	Reaktionsnachweis über orts aufgelöste Massenspektrometrie	124
5.4.	Ausblick	124
6.	Experimentaltteil	128
6.1.	Analytik und Geräte	128
6.2.	Lösungsmittel, Chemikalien und Synthesoberflächen	130
6.3.	Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	131
6.4.	Versuchsbeschreibungen	136
6.4.1.	Synthese und Charakterisierung verwendeter Fluorophore	136
6.4.2.	Synthesevorschriften und Charakterisierung eingesetzter Edukte	138
6.4.3.	Laser-basierte Synthesen	140
7.	Lebenslauf	142
8.	Danksagung	144
9.	Abkürzungsverzeichnis	145
10.	Literaturverzeichnis	149
11.	Anhang	156

1. Einleitung

Kohlenstoffdioxid (CO₂) gilt als eine der wichtigsten Verbindungen bei der Diskussion des Klimawandels bzw. des dafür verantwortlichen Treibhauseffekts. Allein 2019 wurden weltweit mehr als 35 Milliarden Tonnen CO₂ ausgestoßen, wobei allein die Emission in Deutschland ca. 700 Millionen Tonnen CO₂ betrug.¹³⁻¹⁵ Auch wenn die freigesetzte Menge an CO₂ in Deutschland seit Jahren sinkt, nimmt der weltweite Ausstoß hingegen weiterhin kontinuierlich zu.¹³⁻¹⁴ Technologischer Fortschritt und alternative Energie-Gewinnung, wie z.B. bessere Verbrennungsmotoren in Fahrzeugen oder ein Umstieg auf Elektromobilität oder ein Ersatz von Kohlekraftwerken durch Windparks und Photovoltaik sind ein erster wichtiger Schritt um die schlimmsten Folgen des Klimawandels zu antizipieren. Auf der anderen Seite verhindern Abholzung und Artensterben vor allem bei Pflanzen jedoch die aktive Reduzierung der CO₂-Konzentration der Atmosphäre, sodass sich dieses trotz allen Maßnahmen zur Eindämmung der CO₂-Emissionen in der Erdatmosphäre anreichert.¹⁶

2019 veröffentlichten Hepburn *et al.* einen Artikel¹⁷, in welchem verschiedene Ansätze zur Speicherung und Umwandlung von CO₂ vorgestellt wurden. Auch wenn viele der genannten Ansätze vielversprechende Hoffnungen wecken, wird oft deutlich, dass zur allgemeinen Umsetzung der vorgestellten Ideen noch viele technische Hürden zu meistern sind. Eine der im Artikel diskutierten Ideen zur Reduktion der atmosphärischen CO₂-Konzentration behandelt die chemische Umsetzung von CO₂ in Biokraftstoffe, Polymere oder andere chemische Ausgangsstoffe.

Bei der chemischen Umsetzung von CO₂ stellt dessen Stabilität und somit niedrige Reaktivität in vielen Fällen eine besondere Herausforderung dar, welche oftmals durch die Wahl geeigneter Katalysatoren überwunden werden kann.¹⁸ In vielen Fällen wird CO₂ elektrochemisch gebunden, jedoch existieren auch verschiedene enzymatische oder photokatalytische Ansätze, sowie Verbindungen verschiedener Ansätze zur Fixierung des Moleküls¹⁸.

Bei der Suche nach geeigneten Katalysatoren spielen Hochdurchsatzsynthese und -screening eine wichtige Rolle.^{1, 19-20} Diese Techniken erlauben es zahlreiche Reaktionen in kürzester Zeit durchzuführen und die gebildeten Produkte zu analysieren. Durch die Publikation erfolgreicher Reaktionen können Datenbanken generiert werden, welche wiederum von Simulationsprogrammen dazu verwendet werden mithilfe von künstlicher Intelligenz Vorhersagen in Bezug auf bislang unbekannte Reaktionen zu treffen. Lin *et al.* beispielsweise kritisierten jedoch, dass überwiegend erfolgreiche Reaktionen bzw. Katalysen unter Verwendung von einfachen Modellsystemen publiziert und in entsprechende Datenbanken aufgenommen würden²¹. Dies habe zur Folge, dass die jeweiligen Simulationen von Reaktionen unter Verwendung von strukturell anspruchsvollen Ausgangsstoffen nur

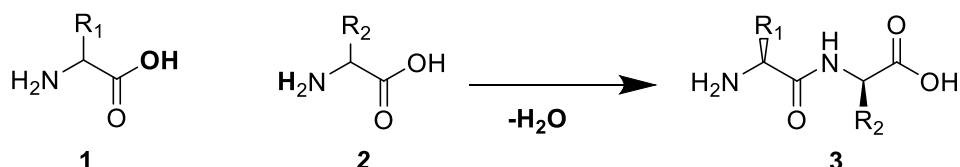
unzureichend berechnet werden könnten, da der strukturelle Einfluss der Moleküle nicht in die Berechnungen mit aufgenommen werden könne.²¹⁻²² Des Weiteren seien die Reaktionen nicht unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt und publiziert was weiter zur Problematik einer guten Simulation beitrage. Die Etablierung einer einheitlichen Syntheseplattform könnte diesen Problemen entgegenwirken.²¹

Der am Institut für Mikrotechnologie entwickelte nano3D-Laserdrucker stellt eine solche Syntheseplattform dar.^{10, 12} In der Vergangenheit wurde das System überwiegend zur Synthese von Peptidarrays mit einer Spotdichte von mehreren tausend Spots/cm² verwendet.¹⁰ In dieser Arbeit soll anhand einer KNOEVENAGEL-Kondensation untersucht werden, ob das Lasersystem auch für einen allgemeinen Einsatz zur chemischen Synthese verschiedener Substanzen genutzt werden kann.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Kondensationsreaktionen

Eine Kondensationsreaktion bezeichnet die Verbindung zweier Moleküle unter Abspaltung eines kleineren Moleküls wie Wasser, Ammoniak oder auch CO₂.²³ In der Natur können Kondensationsreaktionen bei der Biosynthese von Makromolekülen wie Peptiden, Lipiden, sowie (Desoxy)Ribonukleinsäuren (DNA bzw. RNA) beobachtet werden.

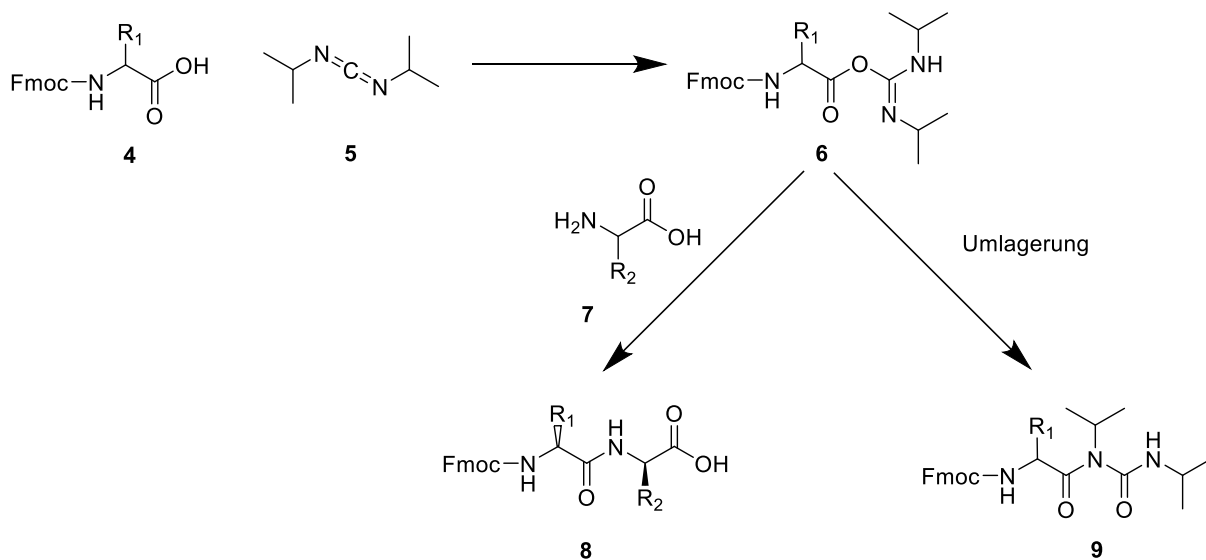


Schema 1: Kondensation zweier Aminosäuren **1** und **2** zur Bildung des Dipeptids **3**.

2.1.1. Chemische Peptidsynthese

Bei der chemischen Peptidsynthese werden einzelne Aminosäuren über Kondensationsreaktionen miteinander zu einem Makromolekül verknüpft. Im Gegensatz zur biologischen Peptidsynthese erfolgt die Syntheserichtung bei der chemischen Peptidsynthese vom C- zum N-Terminus.²⁴ Um eine unkontrollierte Polymerisation, sowie Nebenreaktionen mit funktionellen Gruppen an Seitenketten der eingesetzten Aminosäuren zu verhindern werden Schutzgruppenkonzepte angewandt.²⁵⁻²⁶ Bei der sogenannten Fmoc-Schutzgruppenstrategie wird die N- α -Aminogruppe über eine basenlabile

9H-Flouren-9-ylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Gruppe geschützt.²⁷⁻²⁹ Die Seitenketten der Aminosäuren werden orthogonal mit säurelabilen Schutzgruppen wie Trityl (Trt) oder *tert*-Butyl (tBu)-Gruppen geschützt.³⁰ Eine alternative Schutzgruppenstrategie besteht in der Boc-Peptidsynthese. In diesem Fall wird die *N*- α -Aminogruppe der Aminosäuren über eine säurelabile *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-Gruppe geschützt. Hier erfolgt die Entschützung der Seitenketten in der Regel mit Fluorwasserstoff (HF).²⁴ Zur Kupplung zweier Aminosäuren werden Aktivierungsreagenzien eingesetzt. Als Kupplungsreagenzien werden Carbodiimide wie *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid **5** (DIC), *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid **10** (DCC) eingesetzt.³¹ Durch die Reaktion der Carboxyl-Gruppe der Aminosäure **4** mit dem Diimid **5** entsteht ein O-Acylharnstoff-Intermediat, welches mit der Aminogruppe einer zweiten Aminosäure **7** reagiert und so eine Peptidbindung ausbildet.



Schema 2: Kupplung zweier Aminosäuren 1 und 2 unter Verwendung von DIC als Kupplungsreagenz.

Zur Unterdrückung unerwünschter Nebenreaktionen wie einer Umlagerung zu einer *N*-Acylharnstoff Verbindung kann die aktivierte Aminosäure zunächst in einen Aktivester überführt werden.³² Dies geschieht beispielsweise durch die Überführung in einen Pentafluorophenyl (OPfp)-Ester. Weitere Aktivierungsmethoden sind die Überführung in einen Hydroxybenzotriazolyl-(HOBt)-Ester oder die Verwendung von Aktivierungsreagenzien wie *O*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphat (HBTU) **13**³³ oder (Benzotriazol-1-yl)oxy)tripyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat (PyBOP) **14**.³² Die Strukturformeln der Aufgeführten Aktivierungsreagenzien sind in Abbildung 1 dargestellt.

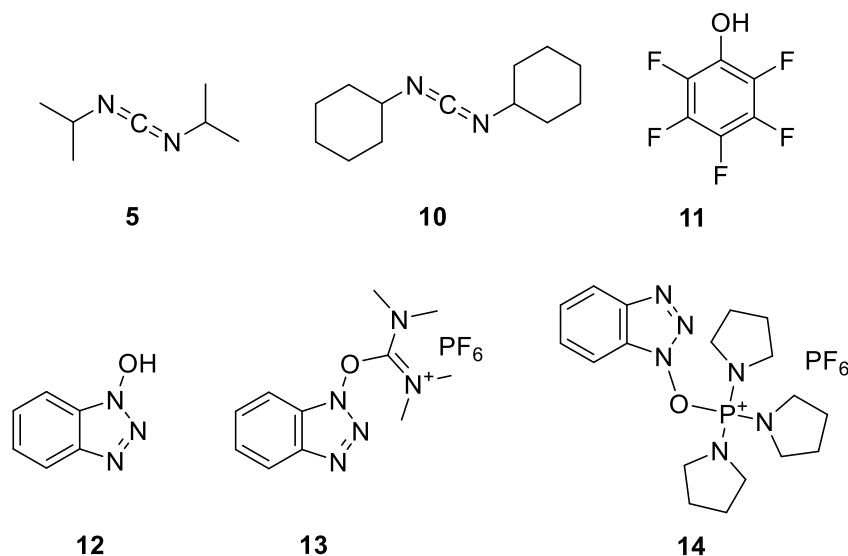
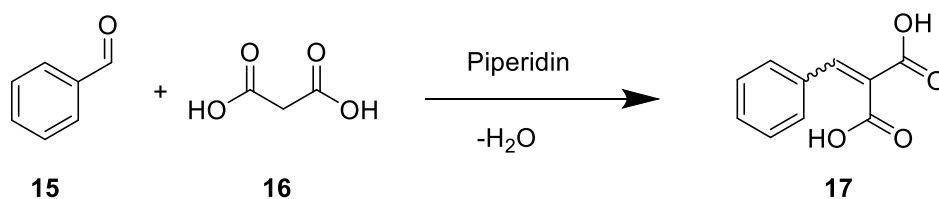


Abbildung 1: Kupplungsreagenzien in der chemischen Peptidsynthese. DIC **5**, DCC **10**, Pentafluorphenol **11**, HOBt **12**, HBTU **13** und PyBOP **14**

2.1.2. KNOEVENAGEL-Kondensation

Die nach dem deutschen Chemiker Emil Knoevenagel benannte Kondensationsreaktion ist ein Spezialfall der Aldol-Kondensation.³⁴ Bei dieser Reaktionsform reagieren ein Aldehyd und eine CH-azide Verbindung unter Wasserabspaltung zu α - β -ungesättigten Olefinverbindungen (s. Schema 3)³⁴⁻³⁶.

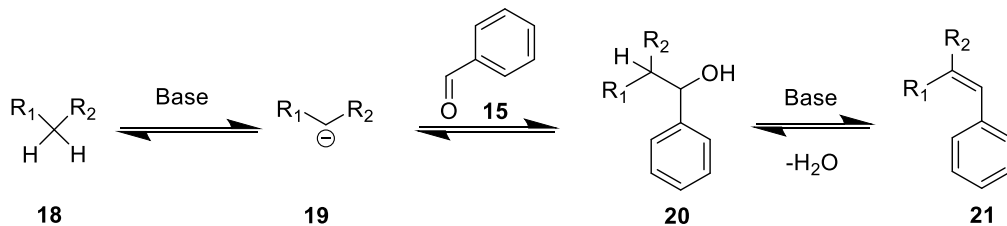


Schema 3: Von E. Knoevenagel publizierte Kondensation von Benzaldehyd **15** mit Malonsäure **16** unter Verwendung von Piperidin als Basenkatalysator. Als Produkt konnte 2-Benzyliden-malonsäure **17** isoliert werden.³⁴

Die Reaktivität hängt unter anderem stark von den jeweils verwendeten Katalysatoren ab. In der Regel werden Amin basierte Basen wie Pyridin, Piperidin, Diisopropylethylamin (DIPEA) oder Diazabicycloundecen (DBU) verwendet. Auch anorganische Basen wie

Ammoniumacetat, Natriumhydroxid oder Hexamethylsilazan können bei der Durchführung der KNOEVENAGEL-Reaktion verwendet werden³⁵⁻³⁷.

Der Reaktionsmechanismus ist in Schema 4 dargestellt. Bei der Reaktion wird zunächst die CH-azide Verbindung **18** deprotoniert. Es folgt ein nucleophiler Angriff des so erzeugten Anions **19** an den Carbonyl-Kohlenstoff des Aldehyds **15**. durch die Abspaltung von Wasser wird das entsprechende KNOEVENAGEL-Produkt **21** gebildet.³⁷



Schema 4: Reaktionsmechanismus der KNOEVENAGEL-KONDENSATION.

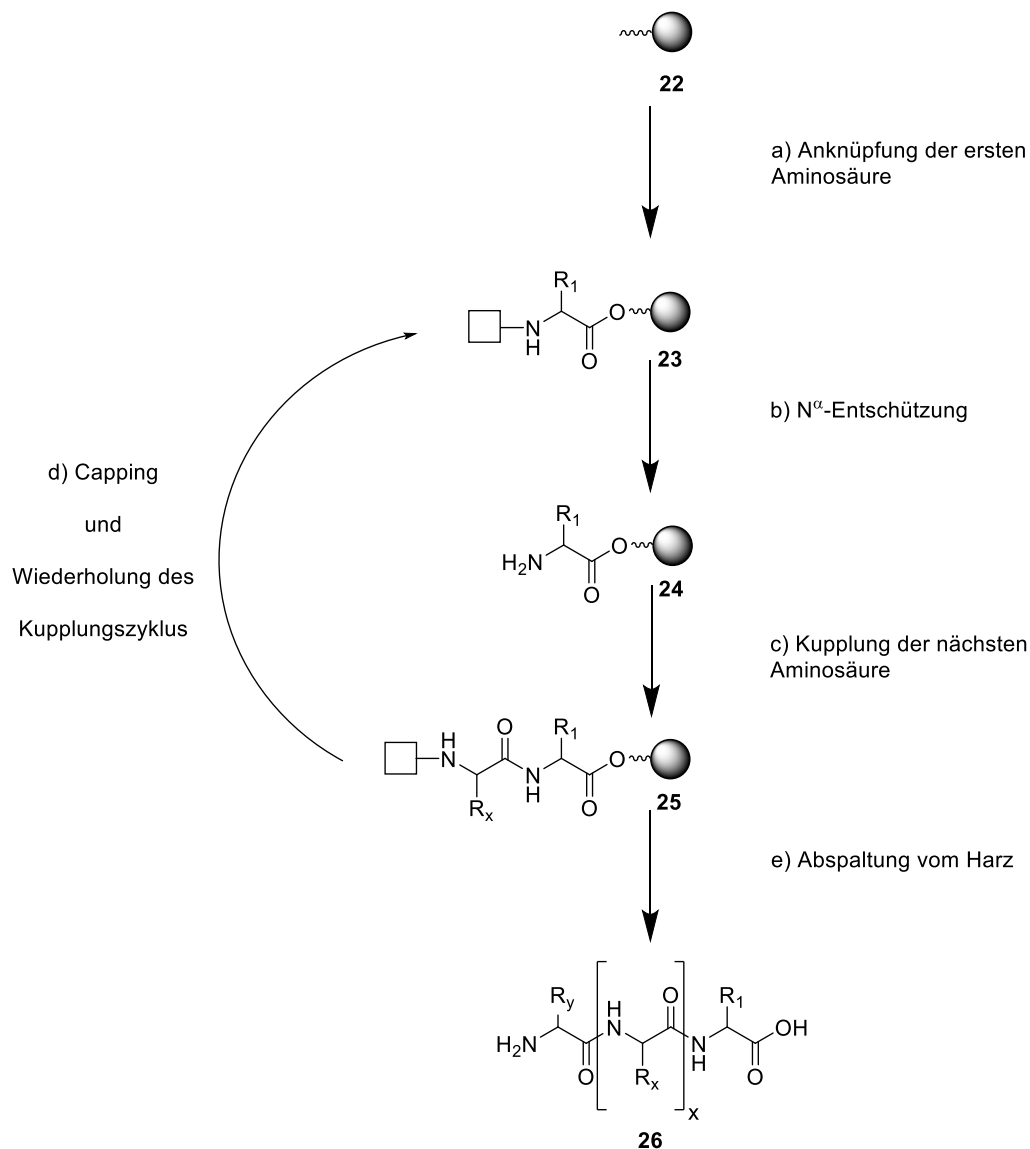
Durch die Entfernung des während der Reaktion entstehenden Wassers wird das Reaktionsgleichgewicht zusätzlich auf die Seite der Produkte verlagert. Dies kann z.B. durch Destillation oder die Verwendung von Molekularsieben erzeugt werden.³⁵

In der Regel werden Knoevenagel-Reaktionen in organischen Lösungsmitteln bei höheren Temperaturen durchgeführt. In modernen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass im Zuge des Gedankens der *green chemistry* Knoevenagel-Kondensationen auch unter Verwendung von ionischen Flüssigkeiten oder eutektischen Lösungsmitteln erfolgreich durchgeführt werden konnten. Aufgrund der breiten Anwendung der Knoevenagel-Kondensation kann diese Modifikation einen wichtigen Schritt in Richtung nachhaltiger Syntheseführung darstellen.

2.2. Festphasensynthese

Die Entwicklung der Festphasensynthese von Peptiden durch R.B. Merrifield 1963 gilt als einer der wichtigsten Durchbrüche der kombinatorischen Chemie. Aus diesem Grund wurde Merrifield 1984 mit dem Chemie-Nobelpreis für seine Entwicklung ausgezeichnet.³⁸ Bei der Festphasensynthese von Peptiden (SPPS, engl.: *solid phase peptide synthesis*) dient ein während der Synthese unlösliches Polystyrol-Harz als feste Phase. Über eine Funktionalisierung des Harzes z.B. via Chlorbenzylgruppen ist es möglich Aminosäuren kovalent an das Harz zu binden und in repetitiven Kupplungszyklen von Aminosäuren schrittweise die entsprechenden Peptidsequenzen zu synthetisieren.²⁶ Ein Kupplungszyklus der SPPS besteht in der Regel aus 3 Schritten²⁴⁻²⁶(vgl. Schema.: 5): zunächst wird die

N- α -Schutzgruppe der am Harz immobilisierten Peptidketten abgespalten. Anschließend erfolgt die Kupplung einer weiteren Aminosäure unter Verwendung von Kupplungsreagenzien. Vor allem bei der Synthese von Bibliotheken oder Arrays ist es wichtig, dass eine Durchmischung verschiedener Sequenzen unterbunden wird.^{24, 26} Aus diesem Grund werden nicht reagierte Aminogruppen an der festen Phase in einem dritten Schritt acetyliert.²⁶ Dieser Schritt wird auch als capping bezeichnet und blockiert den entsprechenden Syntheseort für sämtliche weiteren Kupplungszyklen. Somit wird gewährleistet in jedem Syntheseansatz nur die gewünschte Zielsequenz bzw. die jeweiligen Abbruchsequenzen synthetisiert werden.



Schema 5: Schematischer Ablauf einer SPPS: a) Anknüpfen der ersten Aminosäure an die feste Phase, b) Abspaltung der N- α -Schutzgruppe, c) Kupplung der nächsten Aminosäure unter Verwendung von Kupplungsreagenzien, d) Capping nicht reagierter Aminogruppen und Wiederholung der Schritte b) und c) bis zur gewünschten Kettenlänge. E) Abspaltung des Peptids **26** von der festen Phase²⁴⁻²⁶

2.3. Hochdurchsatzsynthese

Ein wichtiger Schritt auch in Zukunft stetig die Synthese neuer Materialien zu ermöglichen ist die Entwicklung und Verbesserung von Hochdurchsatzverfahren. Das Grundprinzip von Hochdurchsatzverfahren besteht darin, dass möglichst viele Reaktionen oder Arbeitsschritte gleichzeitig durchgeführt werden können, um den individuellen Zeitaufwand für die einzelne Reaktion so gering wie möglich zu halten.^{1, 39} Darüber hinaus werden bei den meisten dieser Methoden Reagenzien wie Edukte oder Lösungsmittel eingespart, indem z.B. Waschschriffe parallel durchgeführt werden können. Durch die Parallelisierung und Vereinheitlichung der Syntheseprotokolle können viele dieser Reaktionen mittlerweile maschinell durch Syntheseroboter übernommen werden.⁴⁰ Mithilfe dieser Verfahren können in kürzester Zeit eine Vielzahl an verschiedenen Substanzen synthetisiert werden.^{19, 41} Die Gesamtheit dieser Substanzen wird als Bibliothek bezeichnet. Zur Herstellung von Hochdurchsatzbibliotheken werden generell zwei Syntheseprinzipien angewandt: Einerseits kann vor allem bei rückgrat- oder gerüstbasierten Bibliotheken die sogenannte Split-and-Mix-Methode angewandt werden.⁴² Auf der anderen Seite wird die Parallel-Synthese vor allem zur Synthese von Arrays eingesetzt.⁴³

2.3.1. Parallelsynthese

Bei der klassischen Parallelsynthese werden ebenfalls möglichst viele Reaktionen gleichzeitig durchgeführt. Je nach Wahl der Reaktion, sowie des Reaktionsgefäßes sind sowohl Festphasensynthesen als auch Synthesen in Lösung durchführbar. Die Synthese erfolgt hierbei in separaten Reaktionsgefäßes. Durch entsprechende Roboter kann die Generierung von Substanzbibliotheken größtenteils automatisiert werden.⁴⁴⁻⁴⁵ Limitierende Faktoren bei der Herstellung großer Bibliotheken sind dabei üblicherweise die Menge der eingesetzten Materialien, sowie der von der synthetisierten Bibliothek eingenommene Platz. Diese Problematik wird an einem Rechenbeispiel veranschaulicht: bei der kombinatorischen Synthese eines Peptids unter Verwendung der 20 proteinogenen Aminosäuren kann die Gesamtzahl der zu synthetisierenden Sequenzen mithilfe der Formel $n = 20^x$ berechnet werden. Dabei entspricht n der Anzahl der möglichen Sequenzen bei einer Sequenzlänge x . Bei der kombinatorischen Synthese eines Tetramers ($x = 4$) beträgt die Anzahl der zu synthetisierenden Verbindungen bereits 160.000. Würde für jede Synthese lediglich ein totales Lösungsmittelvolumen von 10 mL benötigt, müssten zur Herstellung der kombinatorischen Bibliothek 1.600 Liter Lösungsmittel aufgewendet werden. Zusätzlich würden bei einer Synthese in 96-Well-Platten die benötigten Platten eine Fläche von über 18 m² bedecken⁴⁶. Aus diesem Grund wurden Variationen der Parallelsynthese entwickelt, um die Handhabung

vieler Reaktionsansätze effizienter zu gestalten. Beispiele solcher Methoden sind die Split-and-Mix-Synthese, sowie die Herstellung von Arrays.

2.3.2. Split-and-mix-Synthese

Bei der Split-and-Mix-Synthese (auch: Split-and-combine) werden die Produkte an einem festen Träger synthetisiert. Als Trägermaterial werden oftmals Partikel (Beads) aus Polymerharzen verwendet, an welchen die zu synthetisierenden Stoffe über Linker immobilisiert werden. An jedem individuellen Bead werden im Verlauf der Synthese nur Moleküle derselben Struktur synthetisiert (One-Bead-one-Compound-Synthese)⁴⁷. Nach einer Vorbereitung der Beads werden diese auf verschiedene Reaktionslösungen aufgeteilt, in denen ein jeweils unterschiedlicher Synthesebaustein angeknüpft wird. Nach der Kupplungsreaktion werden die Beads wieder vereint. Waschschrte beispielsweise können so für die Gesamtheit der Bibliothek gemeinsam durchgeführt werden, was zu einer enormen Einsparung an Lösungsmitteln führt. Nachdem die Beads für die nächste Kupplungsreaktion vorbereitet wurden, werden diese wieder auf entsprechende Reaktionslösungen aufgeteilt. Durch eine zyklische Wiederholung des Aufteilens (split) und des wieder Vereinens (mix) können so in kürzester Zeit eine Vielzahl von unterschiedlichen Molekülen generiert werden.

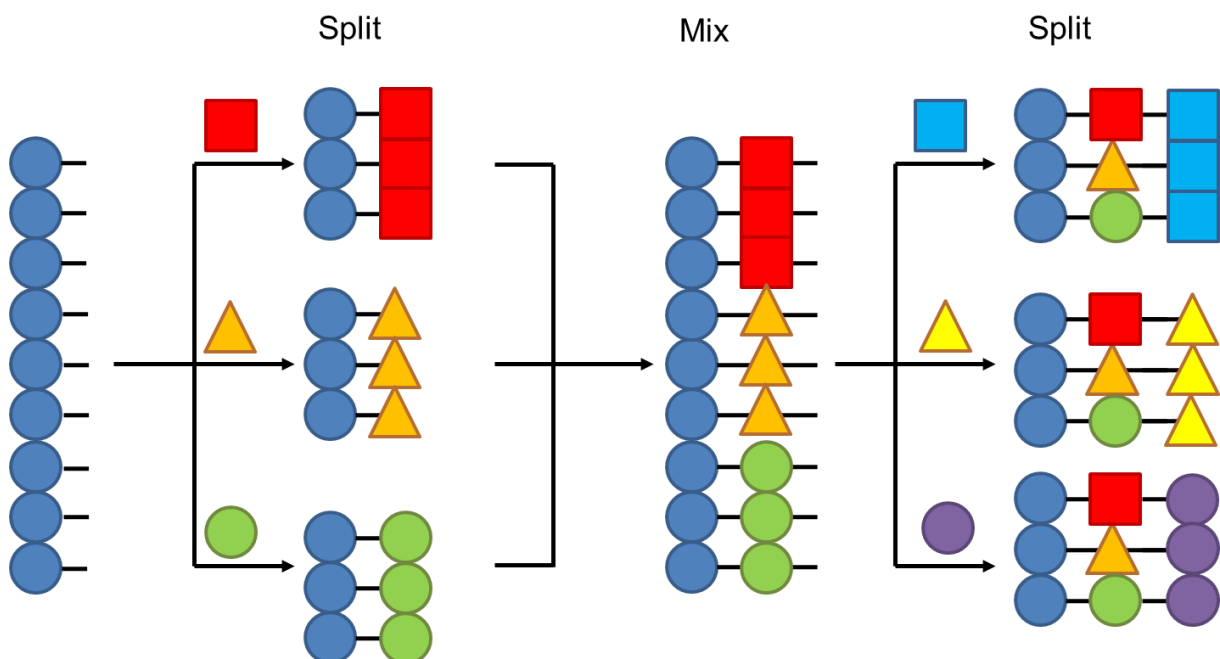


Abbildung 2: schematische Durchführung einer Split-and-Mix-Synthese.

Eine Markierung der Beads erlaubt die Identifikation einzelner Reaktionen zu jedem Zeitpunkt der Synthese. Um die Reaktionsausbeute und die Handhabung des Syntheseprozesses zu verbessern, entwickelten Houghten *et al.* 1985 die sogenannte Teabag-Methode⁴². In dieser auf der Split-and-Mix-Synthese basierenden Reaktionsführung werden mehrere Harzbeads in ein Reaktionsgefäß gegeben, welches einerseits eine Diffusion der Bausteine und entsprechenden Lösungen in das Gefäß zulässt, andererseits undurchlässig für die entsprechenden Harz-Beads ist, ähnlich einem Teebeutel. Diese Synthesemethode erleichtert außerdem die Identifizierung der einzelnen Reaktionsansätze, da die Reaktionsgefäße per Radiofrequenz- oder QR-Code markiert werden können.

2.3.3. Molekülarrays

Ein Array ist eine Substanzbibliothek, bei der verschiedene Reaktionen in einem räumlich definierten Bereich auf einer Trägeroberfläche durchgeführt werden. Die individuellen Reaktionsräume werden als Spots bezeichnet. Durch die orts aufgelöste Synthese ist es möglich, dass in jedem Spot nur gleichartige Moleküle synthetisiert werden. Bereits 1991 gelang Stephen Fodor eine orts aufgelöste Synthese von Peptidarrays durch lithographische Methoden.⁴⁸ 1992 entwickelte Ronald Frank die SPOT-Synthese, welche unter Verwendung der Fmoc-Schutzgruppenstrategie die Synthese und Analyse von Peptidsequenzen auf einer Zellulosemembran ermöglichte.⁴⁹ Während bei einer lithographischen Arraysynthese hohe Spotdichten von bis zu einer Million Spots pro Quadratzentimeter erreicht werden können⁵⁰, ist diese Art der Arrayherstellung mit einem hohen Zeit- und Materialaufwand verbunden.⁵¹ Bei der SPOT-Synthese hingegen können nur geringe Spotdichten von teils unter 100 Spots/cm² erreicht werden.^{43, 51} Nach ihrer Entwicklung fanden Arrays überwiegend in der DNA- und Genomik-Forschung Anwendung.^{3, 6} Bei der Herstellung von Arrays können die zu untersuchenden Moleküle im Vorfeld synthetisiert und anschließend auf dem Array-Träger immobilisiert werden. Diese Herstellungsmethode ist jedoch mit einem hohen Zeit-, Kosten- und Materialaufwand verbunden.^{6, 43} Um diesen Nachteil zu umgehen können die Moleküle auch in situ auf der Arrayoberfläche synthetisiert werden^{3, 5, 43}. Auf diese Weise können zwar große Mengen verwendeter Lösungsmittel und Bausteine eingespart werden, jedoch ist die Aufreinigung der Syntheseprodukte nicht möglich oder nur unter besonderen Anstrengungen zu erreichen.^{11, 43} Bei Droplet-Arrays müssen die einzelnen Reaktionsbausteine nicht zwingend an der Arrayoberfläche immobilisiert werden. Die individuellen Reaktionen werden dabei in kleinen Lösungsmittel-Tröpfchen (engl.: droplet) aufgebracht. Die Spot-Volumina betragen in diesen Fällen wenige Nano- bis Pikoliter.^{7-9, 52} Durch Modifikationen der Arrayoberfläche wird verhindert, dass sich die einzelnen Reaktionslösungen auf der Arrayoberfläche ausbreiten und

vermischen.^{9, 53} Theoretisch sind auf diese Art Spotdichten von mehreren 1.000 – 10.000 Spots/cm² denkbar⁵⁴, jedoch limitiert die Handhabung von Volumen im Pikoliter-Bereich (besonders im Falle leicht flüchtiger Stoffe) die tatsächlich mögliche Spotdichte.⁵³

2.4. Analysemethoden hochdichter Molekülarrays

Es existieren verschiedene Methoden, mit denen Arrayoberflächen analysiert werden können. Je nach Art des Arrays liegt die Untersuchung der Spotzusammensetzung oder die Spottopographie im Vordergrund der Analyse. Vor allem bei solchen Arrays, welche mithilfe des nano3D-Lasersystems hergestellt werden müssen sowohl die Topographie eines Spots genauer analysiert werden, um die Qualität des Materialübertrags zu bewerten, als auch die Spotzusammensetzung, um die durchgeführten Reaktionen nachzuweisen. Zur Analyse der Oberflächentopographie eines Arrays eignen sich vor allem Rasterelektronenmikroskopie (REM, engl.: scanning electron microscopy SEM), Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic force microscopy, AFM), sowie Interferenz-Techniken, wie beispielsweise die Weißlicht- oder Vertikale Scanning Interferometrie (VSI). Bei der chemischen Analyse einzelner Spots kommen orts aufgelöste Nachweismethoden wie Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Massenspektroskopie (engl.: matrix assisted Laser desorption/ionisation mass spectroscopy MALDI-MS) zum Einsatz. Auch im Bereich der Analyse von Arrays via Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance NMR) konnten in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt werden. Je nach Array können außerdem Methoden wie UV/Vis- oder Fluoreszenz-Untersuchungen der Arrayoberfläche hinzugezogen werden.

2.4.1. Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterkraftelektronenmikroskopie wird ein Elektronenstrahl über magnetische Linsen gebündelt und über das zu untersuchende Substrat geleitet. Die Elektronen des Strahls, welcher auf die Substratoberfläche geleitet werden, bezeichnet man als Primärelektronen⁵⁵⁻⁵⁶. Die beim Auftreffen der Primärelektronen auf das Substrat werden Elektronen aus der Probe emittiert und detektiert. Die aus der Probe emittierten Elektronen werden als Sekundärelektronen bezeichnet. Sekundärelektronen besitzen eine geringere kinetische Energie als die eintreffenden Primärelektronen und können über eine Saugspannung zum Detektor geleitet werden⁵⁷. Ähnlich wie bei der Lichtmikroskopie hängt die mögliche Auflösung des Mikroskopbildes von der Wellenlänge der einfallenden Strahlung ab. Während bei gewöhnlichen Lichtmikroskopen nur Auflösungen von ca. 200 nm erreicht werden können,

erlaubt die kurze Wellenlänge des Elektronenstrahles eines Elektronenmikroskops eine Auflösung von bis zu 0.5 nm.⁵⁵⁻⁵⁶ Um die Bildqualität einer REM-Aufnahme zu verbessern können die zu untersuchenden Proben mit einer wenigen Nanometer-dicken Schicht aus leitenden Materialien wie Gold, Silber oder Platin überschichtet werden. Diese Schicht wird üblicherweise per Sputter-Beschichtung erzeugt. Vor allem bei nichtleitenden Oberflächen hat sich das Besputtern der zu untersuchenden Probe bewährt um ein Ableiten der beim Elektronenbeschuss auftretenden Spannung zu gewährleisten.⁵⁸ Das Beschichten der zu untersuchenden Probe mit einem leitenden Material weist jedoch den Nachteil auf, dass weitere Untersuchungen der Oberfläche oft nicht mehr möglich sind.

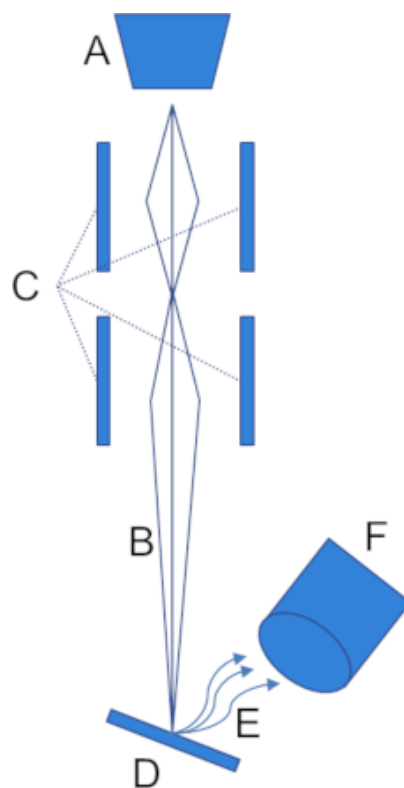


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines REM. Aus einer Elektronenquelle A wird ein Elektronenstrahl B über verschiedene magnetische Linsensysteme C auf die Probenoberfläche D fokussiert. Die beim Einschuss aus der Oberfläche herausgelösten Sekundärelektronen E werden über eine Saugspannung zu einem Detektor F geleitet. Aus der Intensität der der detektierten Elektronenströme wird so ein Bild der Oberfläche moduliert.⁵⁷

2.4.2. Rasterkraftmikroskopie

Zur Untersuchung einer Probe per AFM wird die Probenoberfläche mit einer mikroskopischen Nadel mechanisch abgetastet.⁵⁹⁻⁶⁰ Die Messnadel ist dabei an einer speziellen Biegefeder, dem sogenannten Cantilever befestigt. Beim Abtasten der Probenoberfläche wird die Spitze des Cantilevers verschiedene Kräfte unterschiedlich stark angezogen oder abgestoßen⁶⁰⁻⁶¹. Durch die Detektion der Auslenkung des Cantilevers kann ein dreidimensionales Modell der Oberfläche berechnet werden. Die Position des Cantilevers kann über verschiedene Methoden bestimmt werden. Eine der häufigsten und einfachsten Methoden die Bewegung des Cantilevers zu verfolgen, besteht in einem auf die Rückseite des Cantilevers fokussierten Lasers. Von diesem Punkt wird der Laserstrahl reflektiert und von einer Photodiode detektiert. Die Auslenkung des Cantilevers führt so zu einer Positionsänderung des Laserstrahls in der Photodiode. Durch die Stärke der Positionsänderung des Lasers können topographische Informationen des Substrats im Subnanometerbereich ermittelt werden⁶⁰⁻⁶². Da die AFM-Analyse einer Oberfläche lediglich auf dem Abtasten derselben beruht können auch nichtleitende Oberflächen ohne weitere Vorbereitung untersucht werden.⁵⁹⁻⁶⁰ Ohne einen beträchtlichen Mess- und Zeitaufwand können per AFM jedoch nur kleine Bereiche einer Oberfläche von wenigen Quadratmikrometern untersucht werden. Somit eignet sich eine AFM-Messung lediglich zur Analyse einzelner Spots und nicht zu einer flächigen Analyse eines gesamten Arrays.

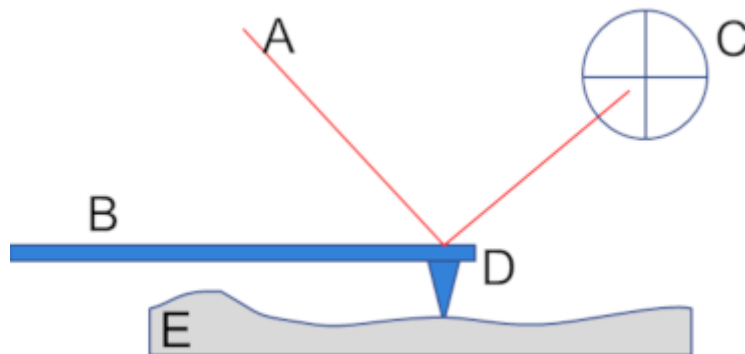


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer AFM-Messung. Ein Laserstrahl A wird auf die Rückseite des Cantilevers B fokussiert und reflektiert. Der reflektierte Laserstrahl wird von einer Photodiode C detektiert. Durch ein Abtasten der Probenoberfläche E durch mithilfe einer Nadel D kommt es zur Auslenkung des Cantilevers und somit zu einer Positionsänderung des reflektierten Laserstrahls in der Messdiode.

2.4.3. Vertikale Scanninginterferometrie

Die Vertikale Scanninginterferometrie ist eine kontaktfreie Profilometrie-Messung, ähnlich der Laser- oder Weißlichtinterferometrie. Bei der VSI-Messung passiert ein Lichtstrahl ausgehend von einer Weißlichtquelle zunächst einen Strahlenteiler. Hier wird der eintreffende Lichtstrahl in zwei Teilstrahlen gespalten. Ein Teilstrahl wird auf einen Referenzspiegel geleitet und reflektiert. Der zweite Teilstrahl wird über ein Objektiv auf die zu untersuchende Probe fokussiert. Je nach Oberflächentopografie der Probe, kommt es bei der Reflexion zu einer Phasenverschiebung gegenüber dem Referenzstrahl. Bei der Wiedervereinigung der beiden Strahlen bilden sich so Interferenzmuster (sog. fringes) aus, welche von einer Kamera detektiert und einem Computerprogramm ausgewertet werden (Abb. 5).⁶³⁻⁶⁴

Durch die Verwendung einer Weißlichtquelle, kann bei einer VSI-Messung eine vertikale Auflösung von ca. 0.1 nm, sowie eine laterale Auflösung von mehreren hundert Nanometern erreicht werden⁶⁴. Durch die Verwendung entsprechender Objektive kann bei einer VSI-Messung ein verhältnismäßig großer Messbereich von mehreren Quadratmillimetern abgedeckt werden. Dieser Messbereich erlaubt es in vergleichsweise kurzer Zeit ganze Arrays zu analysieren.

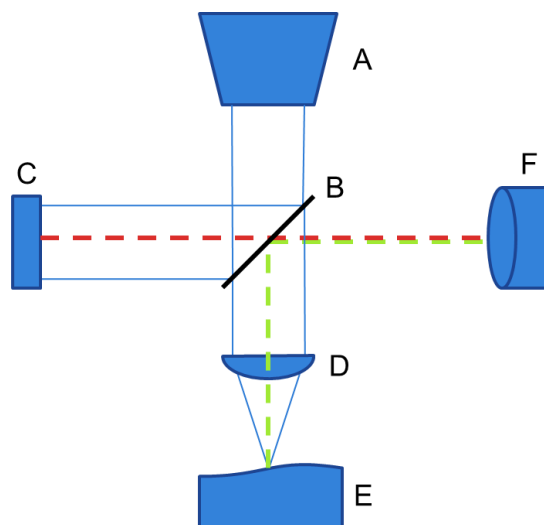


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines vertikalen Scanninginterferometers. Der Lichtstrahl einer Strahlenquelle A trifft auf einen Strahlenteiler B. Hier wird ein Teil des Strahls auf einen Referenzspiegel C gelenkt und reflektiert (rote Linie). Ein zweiter Teil des Strahls wird über ein Objektiv D auf die Probenoberfläche E gelenkt. Durch die Reflexion des Probenstrahls (grüne Linie) und die Wiedervereinigung der beiden Strahlen kommt es aufgrund einer Phasenverschiebung des Probenstrahls zu Interferenzmustern, welche von einer Kamera F detektiert und per Computerprogramm ausgewertet werden.⁶³⁻⁶⁴

2.4.4. MALDI-MS-Imaging

MALDI-MS-Imaging (auch: MALDI-MSI) ist eine Analysemethode, mit der die räumliche Verteilung ausgewählter Moleküle in einer Probe anhand ihres Molekulargewichts verifiziert werden kann.⁶⁵ MALDI-MSI ist eine markierungsfreie Analysemethode, welche auf dem Prinzip der MALDI-TOF-Massenspektroskopie basiert.⁶⁵⁻⁶⁷ Anders als bei einer herkömmlichen MALDI-TOF-Messung wird bei MALDI-MSI die zu untersuchende Probe in einem zweidimensionalen Raster abgetastet und vermessen. Hier werden für alle X- und Y-Koordinaten Massenspektren erstellt. Die so aufgenommenen Spektren werden anschließend für ein oder mehrere definierte Molekulargewichtswerte analysiert und entsprechend auf einer Art *heat map* visualisiert. Auf diese Weise wird das Vorkommen und die Position bestimmter Stoffe in der Probe orts aufgelöst dargestellt (vgl. Abb.: 6).⁶⁵⁻⁶⁹ Diese orts aufgelöste Darstellung in Verbindung mit der Empfindlichkeit der Massenspektroskopie erlaubt es einzelne Spots auf der Arrayoberfläche nach ausgewählten Massezahlen zu untersuchen.⁶⁸ In der Regel werden bei einer MALDI-MSI-Untersuchung die zu analysierenden Proben auf einer leitenden Oberfläche immobilisiert um den notwendigen Elektronenfluss zu gewährleisten. Anschließend wird die Probe mit einer dünnen Schicht der verwendeten MALDI-Matrix überschichtet und im Massenspektrometer vermessen.^{65, 67}

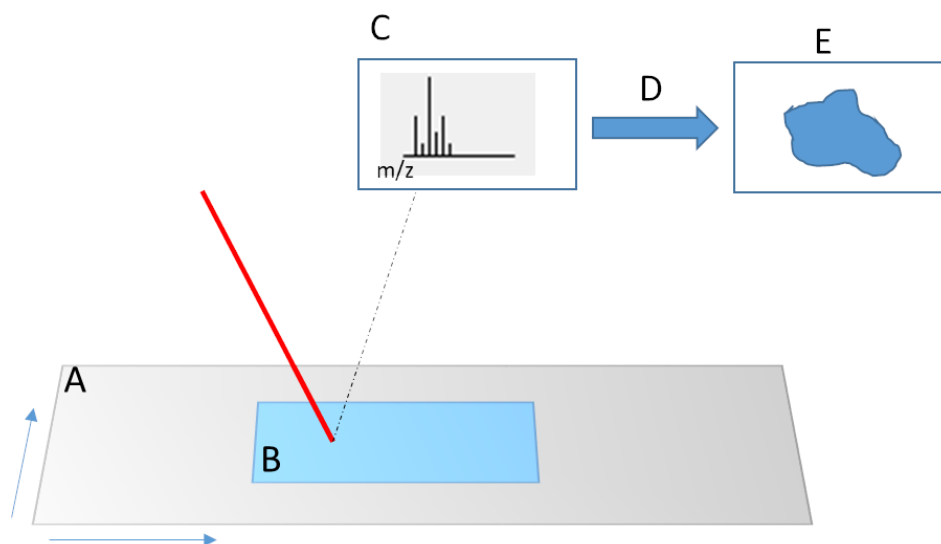


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer MALDI-MSI-Messung. Eine auf einem Target A immobilisierte Probe B, wird über MALDI-TOF für jede X/Y-Position vermessen und entsprechende Massenspektren C aufgezeichnet. Im Anschluss kann aus der Gesamtheit der aufgenommenen Spektren das lokale Vorkommen bestimmter Massezahlen in der Probe über sogenannte *Ion Images* E dargestellt werden.⁶⁵

2.5. Nano3D-Lasersystem

Eine neuartige Methode zur Erstellung von Molekülarrays wurde 2016 von Felix Löffler und Tobias Förtsch am Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) des KIT publiziert.¹⁰ Dieses auch als cLIFT (engl.: *combinatorial Laser Induced Forward Transfer*) bezeichnete Verfahren basiert auf einem Laserimpuls, der dazu verwendet wird, um kleine Materialspots aus einer sogenannten Donoroberfläche auszustanzten und auf den Arrayträger zu übertragen.

Als Donoren werden Glasobjektträger bezeichnet, welche mit einer selbsthaftenden Polyimid-Folie (Kapton®, DuPont) beklebt werden. Auf diese Kapton-Folie wird in einem zweiten Schritt ein Dünnschicht aufgebracht, welcher sich aus einer Mischung aus dem Matrixpolymer S-LEC (modifiziertes Styrol-co-Acryl-Polymer, S-LEC-P LT 7552, Sekisui) sowie den entsprechenden Transferbausteinen zusammensetzt (Abb.: 7).

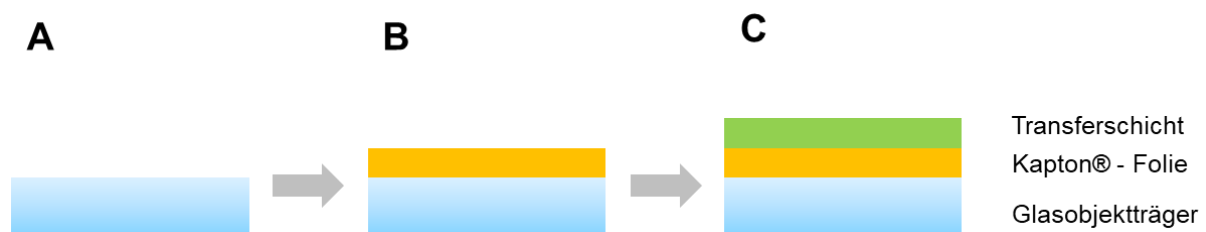


Abbildung 7: Schematische Donorherstellung. Auf einen gereinigten Glasobjektträger (A) wird zunächst eine selbsthaftende Kapton®-Folie aufgebracht (B). Auf diese Donor-Rohlinge wird in einem weiteren Schritt ein Dünnschicht aus Matrixmaterial und Transferbausteinen aufgebracht (C).

Als Syntheseträger des zu generierenden Arrays können, je nach Array-Typ, eine Vielzahl an Oberflächen verwendet werden. So wurden beispielsweise zum Aufbau von Peptidarrays Glasträger verwendet, welche mit einem NH_2 - β -Ala-PEGMA-co-MMA-Polymerfilm funktionalisiert wurden.^{10, 70} Des Weiteren können Iridium-Zinnoxid-beschichtete Glasträger (ITO-Glas) als Syntheseträger verwendet werden. Auch normale Glasobjektträger aus Kalknatron-Glas können als Array-Träger dienen.⁷¹ Im Folgenden werden diese Syntheseträger auch als Akzeptoren bezeichnet.

Für den Lasertransfer wird ein Donor mit der beschichteten Seite nach unten auf einen vorbereiteten Akzeptor gelegt. Anschließend wird ein Laserimpuls von oben auf den Donor abgegeben. Die Laserenergie wird von der Kaptonschicht absorbiert und in Hitze umgewandelt.^{10, 12, 71} Durch die entstehende Hitze dehnt sich das Kapton blasenförmig nach unten aus. Tritt die Transferschicht infolge der Ausdehnung der Kaptonschicht in Kontakt mit dem Akzeptor, bleibt bei der Rückbildung der Hitzeblase eine nanometerdicke Materialschicht auf dem Akzeptor zurück (Abb.: 8).¹⁰ Die Schichtdicke der so generierten Spots ist proportional zur zuvor absorbierten Laserenergie. Dadurch können Spots mit einer Höhe von 1.00 bis zu

80.0 nm generiert werden.^{10, 12} Durch eine geeignete Kombination aus Laserleistung und Laserzeit kann diese resultierende Spothöhe variabel angepasst werden.

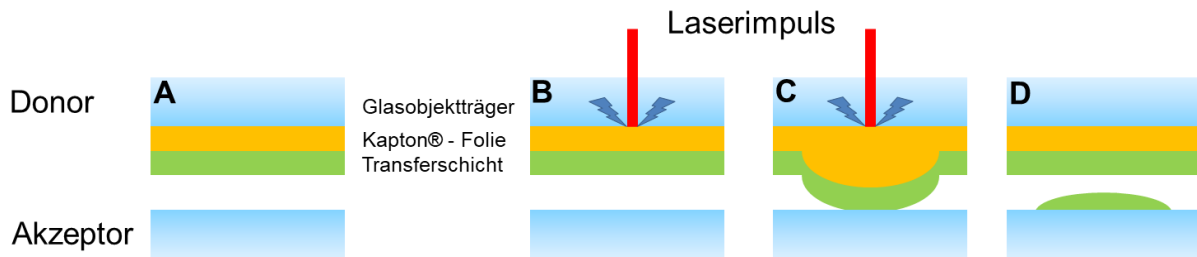


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Transfervorgangs. A: Transfersandwich aus Donor und Akzeptor. B: Ein einfallender Laserimpuls wird von der Kaptonschicht des Donors absorbiert. C: Durch die Absorption der Laserenergie erwärmt sich die Kapton-Folie und dehnt sich blasenförmig aus. Dadurch kommt die Transferschicht des Donors in Kontakt mit dem darunterliegenden Akzeptor. D: Nach der Rückbildung der Kaptonblase verbleibt eine dünne Materialschicht auf der Akzeptoroberfläche.

Durch den Wechsel verschiedener Donoren und einem darauffolgenden Lasertransfer kann auf diese Weise ein Array generiert werden. Es kann dabei eine Spotdichte von über 10.000 Spots/cm² erzeugt werden.^{10, 70}

Der von Löffler und Foertsch entwickelte Laseraufbau besteht aus einem Dioden-gepumpten Dauerstrich-Laser (DPSS-Laser) der Wellenlänge 532 nm, welcher in einen akkusto-optischen Modulator (AOM) geleitet wird. Der AOM ist in der Lage den Laserstrahl zu modulieren und dient so zur Einstellung der Pulsdauer oder auch Laserzeit. Vom AOM wird der Laserstrahl über Spiegel in einen Scanhead gelenkt. Der Scanhead verfügt über ein weiteres, internes Spiegelsystem und lenkt den Laserstrahl zu den jeweiligen X/Y-Koordinaten auf der Arrayoberfläche. Ein dem Scanhead nachgeschaltetes f θ -Objektiv erzeugt eine planare Fokus-Ebene, in welcher der Donor-Slide positioniert wird (Abb. 9A).

Eine Variante des Lasersystems verwendet einen LED-Laser mit einer Wellenlänge von 405 nm. Der verwendete LED-Laser kann im Gegensatz zum DPSS-Laser direkt angesteuert werden, weshalb auf den Einsatz eines AOM verzichtet werden kann. Aus diesem Grund wird der Laserstrahl in diesem Fall direkt in den Scanhead und von dort auf die Donoroberfläche gelenkt (Abb.: 9B). Ein Vorteil dieses Aufbaus besteht in einer verstärkten Absorption des Lasers durch die Kaptonschicht des Donors.

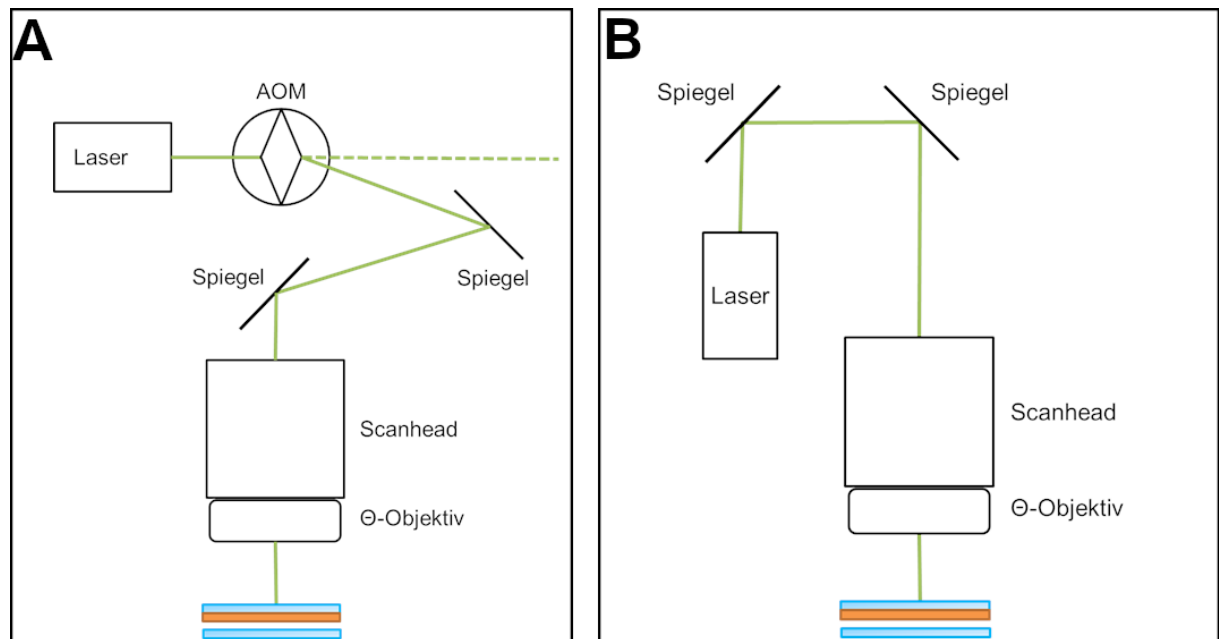


Abbildung 9: Schematischer Aufbau des von Löffler und Foertsch publizierten Lasersystems (**A**), sowie des in dieser Arbeit verwendeten Systems (**B**). **A:** Ein Dauerstrich-Laser wird in einen AOM geleitet. Dort wird der Laserstrahl moduliert anschließend von einem Scanhead mit nachgeschaltetem $f\theta$ -Objektiv auf den Donor gelenkt. Dort wird der Laserstrahl absorbiert und es kommt zum Materialtransfer. **B:** Ein LED-Laser wird über einen Scanhead mit $f\theta$ -Objektiv auf den Donor gelenkt.

2.6. Beschichtungsmethoden zur Donorherstellung

Bei der Herstellung der Donoren wird ein Dünnschicht aus den zu übertragenden Stoffe und der verwendeten Transfermatrix auf einer Kaptonbeschichtung aufgebracht. In der Praxis finden verschiedenste Methoden zur Ausbildung eines Dünnschicht Anwendung. Zur groben Einteilung dieser Beschichtungsmethoden unterscheidet man in sogenannte *self-metered* (selbst-dosierende) Methoden, sowie *pre-metered* (vordosierte) Beschichtungsmethoden.⁷² Bei allen Beschichtungsarten wird zunächst ein Nassfilm auf der zu beschichtenden Oberfläche aufgebracht, welcher durch einen Trocknungsprozess den resultierenden Dünnschicht ausbildet. Bei *self-metered* Methoden wird die Dicke des Nassfilms über verschiedene Einstellungen des Beschichtungsverfahrens kontrolliert, kann aber nur schwer im Voraus berechnet werden. Vereinfacht gesagt bestimmt der Prozess an sich die erzeugte Schichtdicke. Beschichtungsverfahren wie Tauch- oder Rotationsbeschichtung zählen zu den *self-metered* Verfahren. Hier wird die Dicke des Dünnschicht durch Parameter wie der Viskosität des Beschichtungsmediums, die Geschwindigkeit des Eintauchens/Auftauchens (Tauchbeschichtung, engl.: *Dip-coating*) bzw. der Rotationsgeschwindigkeit (Rotationsbeschichtung (engl.: *Spin Coating*) des zu beschichtenden Substrats definiert.⁷² Im Gegensatz zu den *self-metered* Verfahren stehen *pre-metered* Beschichtungsverfahren. Bei

pre-metered Beschichtungsverfahren kann die Dicke des Nassfilms vor der tatsächlichen Applikation berechnet und entsprechende Beschichtungsparameter im Voraus angepasst werden.⁷² *Pre-metered* Beschichtungsverfahren besitzen durch ihre Berechenbarkeit den Vorteil, dass diese Verfahren oftmals auf für größere Substrate skalierbar sind. Zu den *pre-metered* Beschichtungsmethoden zählt beispielsweise die Rakelbeschichtung.

2.6.1. Rotationsbeschichtung

Die Rotationsbeschichtung (oder Schleuderbelackung) zählt zu den *self-metered* Beschichtungsmethoden. Hierfür wird die zu beschichtende Oberfläche auf einem Drehteller fixiert. Die aufgetragene Beschichtungslösung wird durch die Rotation des Substrats gleichmäßig nach außen auf der Oberfläche verteilt (Abb.: 10).

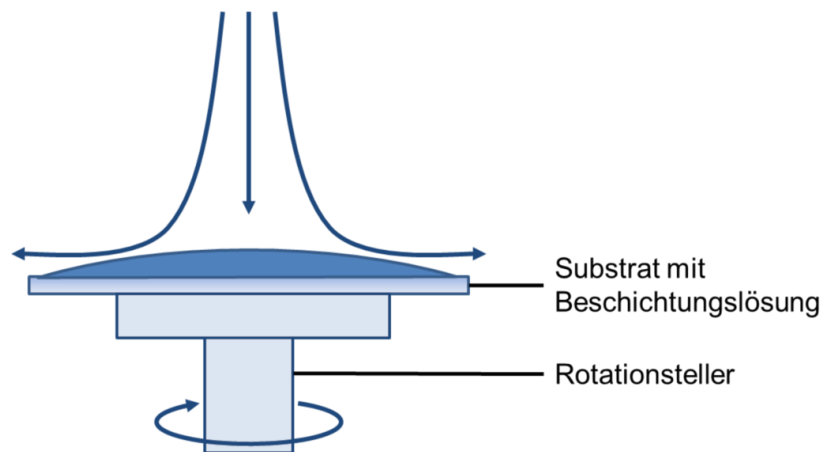


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Spincoating-Prozesses. Das Substrat wird auf dem Rotationsteller befestigt. Anschließend wird die Beschichtungslösung auf das Substrat aufgebracht und durch die Rotation gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt.

Die Schichtdicke des resultierenden Dünnsfilms ist bei dieser Beschichtungsmethode von vielen Einflüssen abhängig, welche teils nur schwer kontrolliert werden können. Die wichtigsten Parameter bei der Ausbildung des Films sind dabei die Viskosität und Konzentration der Beschichtungslösung, der Dampfdruck, bzw. die Volatilität des Lösungsmittels, sowie Prozessparameter wie die Rotationsgeschwindigkeit des Substrats während des Beschichtungsvorgangs. Die Umgebungstemperatur, sowie die Luftfeuchtigkeit beeinflussen indirekt das Verhalten der Beschichtungslösung und somit die tatsächliche Filmdicke. Bereits kleinste Veränderungen dieser Parameter können einen großen Einfluss auf die Qualität der Beschichtung, sowie die Schichtdicke ausüben. Durch die Wahl flüchtiger

Lösungsmittel bzw. entsprechenden Rotationsgeschwindigkeiten und Prozesszeiten kann auf einen zusätzlichen Trocknungsschritt oft verzichtet werden.⁷³⁻⁷⁴

Beim Aufbringen der Beschichtungslösung unterscheidet man zwischen statischer und dynamischer Dosierung. Bei der statischen Dosierungsmethode ruht das zu beschichtende Substrat während die Lösung aufpipettiert wird. Erst im Anschluss beginnt die Rotationsphase. Bei der dynamischen Dosierung hingegen wird das Substrat zunächst auf die gewünschte Rotationsgeschwindigkeit beschleunigt. Ist diese erreicht wird die Beschichtungslösung möglichst gleichmäßig mittig auf das Substrat pipettiert.

Vor allem für die Verwendung der Oberflächen im nano3D-Lasersystem ist die Homogenität der Donor-Beschichtung von großer Bedeutung. Vor allem Kristallbildung oder resultieren in einem inhomogenen Materialübertrag.⁷⁵ Diesen Problemen kann vorgebeugt werden, indem einerseits die Löslichkeit, der zu übertragenden Materialien in der Beschichtungslösung, überprüft wird.^{11, 75-76} Außerdem ist bei der Herstellung ungetesteter Substanzen zu gewährleisten, dass bei der Trocknung der Donor-Beschichtung kein Kristallwachstum festgestellt werden kann.

2.6.2. Rakelbeschichtung

Bei der Rakelbeschichtung (engl.: *Blade coating* bzw. *doctor blading*) wird die Beschichtungslösung vor einer Rakel auf die zu beschichtende Oberfläche aufgebracht. Durch eine konstante Bewegung der Rakel über das Substrat wird die Lösung bei einer konstanten Filmdicke auf der Substratoberfläche aufgetragen (Abb. 11).

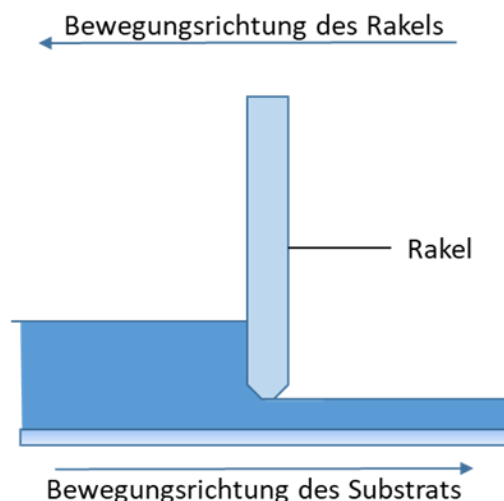


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Rakelprozesses. Durch eine gleichförmige Bewegung des Substrats bzw. der Rakelkante wird in Abhängigkeit der Dicke des Rakelspaltes ein Dünnschicht auf dem Substrat aufgebracht.

Durch die genaue Einstellung des Abstandes der Rakelkante zur Oberfläche, dem sogenannten Rakelspalt kann eine genaue Bestimmung der Nassfilmdicke getroffen werden. Der so aufgebrauchte Dünnfilm ist neben der Dicke des Rakelspaltes abhängig von der Ziehgeschwindigkeit der Rakel, sowie Konzentration und Viskosität der Beschichtungslösung. Durch eine genaue Kontrolle des Beschichtungsprozesses können bereits im Vorfeld verschiedene Eigenschaften gemessen werden und somit die Beschichtungsparameter berechnet werden. Somit zählt die Rakelbeschichtung zu den pre-metered Beschichtungsmethoden. Durch den Einsatz geringer Mengen der Beschichtungslösung pro Donor ($V < 100 \mu\text{L}$ pro Donor), zeichnet sich die Beschichtung von Donoroberflächen via Rakel besonders durch ihre Effizienz bei teuren Materialien aus.⁷⁷⁻⁷⁹

2.7. Fluoreszenz

Lumineszenz beschreibt den Übergang eines angeregten Teilchens in seinen Grundzustand ($M^* \rightarrow M$), bei welchem die freigesetzte Energie in Form von Licht (Photonen) an die Umwelt abgegeben wird.⁸⁰⁻⁸² Erfolgt die Anregung eines lumineszenten Moleküls durch die Absorption eines Photons, so spricht man von Fluoreszenz oder Phosphoreszenz.⁸² Das Phänomen der Fluoreszenz kann in verschiedene Schritte unterteilt werden: Absorption, interne Konversion und Emission.^{80, 83}

Bei der Absorption wird ein Molekül von einem niedrigen elektronischen Zustand (dem sog. Grundzustand oder S_0) in einen angeregten Zustand höherer Energie ($S_{1,2,\dots,n}$) versetzt.⁸⁴ Während der Anregung spielt die Energiedifferenz des höchsten, besetzten Molekülorbitals (HOMO, engl.: *Highest occupied molecular orbital*) und des niedrigsten unbesetzten Molekülorbitals (LUMO, engl.: *lowest unoccupied molecular orbital*) eine wichtige Rolle. Die Anregung eines Fluorophors erfolgt durch die Absorption eines Photons, dessen Energie dem Energieunterschied des HOMOs und des LUMOs des entsprechenden Fluorophors entspricht. Dies bedeutet, je größer der Energieunterschied zwischen HOMO und LUMO, desto niedriger ist die Wellenlänge des zu absorbierenden Photons.⁸⁰

Wird ein Photon der entsprechenden Wellenlänge absorbiert, wird ein Elektron des Fluorophors vom Grundzustand in einen angeregten Zustand, bzw. eines seiner vibronischen Niveaus gehoben. Von dort gelangt das Elektron über strahlungsfreie Energieabgabe in Form von Vibration (VR, vibronische Relaxation) in das niedrigste Niveau des entsprechenden angeregten Zustandes.^{80, 85}

Von diesem Energieniveau kann das Elektron in einem als interne Konversion (IC, engl.: *Internal Conversion*) bezeichneten Übergang, in eines der vibronischen Niveaus des Grundzustandes übergehen. Von dort fällt das Elektron durch vibronische Relaxation zurück

auf das Grundniveau. Der Verlust der Anregungsenergie durch IC und anschließender VR erfolgt, abgesehen von entstehender Wärme, emissionslos.⁸⁰

Der Übergang des Elektrons vom angeregten Zustand in den Grundzustand durch die Emission eines Photons wird als Fluoreszenz bezeichnet. Dabei ist zu beobachten, dass die Energie des emittierten Photons kleiner ist, als die des zuvor absorbierten Photons. Dies zeigt sich in einer höheren Wellenlänge und damit einer Rotverschiebung im Vergleich zur Wellenlänge der Anregung. Diese Differenz in der Wellenlänge zwischen absorbiertem und emittiertem Licht wird als *Stokes shift* bezeichnet und erklärt sich im Energieverlust des Elektrons während der IC.⁸⁴

Neben IC und Fluoreszenz stellt das sog. *Intersystem Crossing* (ISC) eine weitere Möglichkeit der Energieabgabe dar. Dabei vollzieht das angeregte Elektron einen Übergang vom S_1 - in den T_1 -Triplett-Zustand. Dieser Übergang erfolgt, wie die IC, strahlungsfrei, ist jedoch mit einer Veränderung der Multiplizität des elektronischen Zustandes verbunden. Der Übergang zwischen Zuständen verschiedener Multiplizität gilt als verboten, kann aber durch Spin-Orbit-Kupplungen erklärt werden.^{80, 84}

Erfolgt der Übergang des Elektrons in den Grundzustand durch Licht-Emission aus dem angeregten Triplettzustand, so spricht man in diesem Fall von Phosphoreszenz. Das Emissions-Spektrum der Phosphoreszenz ($T_1 \rightarrow S_0$) ist bei noch höheren Wellenlängen angesiedelt als das, der korrespondierenden Fluoreszenz ($S_1 \rightarrow S_0$). Dem liegt die Tatsache zugrunde, dass das niedrigste vibronische Niveau des T_1 -Zustandes energetisch unter dem des S_1 -Zustandes liegt.

Zu Visualisierung von photolumineszenten Vorgängen hat sich das Jablonski- oder auch Perrin-Jablonski-Diagramm bewährt (Abb. 12). Das Jablonski-Diagramm ist ein Energiediagramm, in welchem die jeweiligen elektronischen Zustände eines fluoreszenten Moleküls dargestellt werden und die jeweiligen Übergänge mit Pfeilen visualisiert sind.^{80, 82, 84-}

85

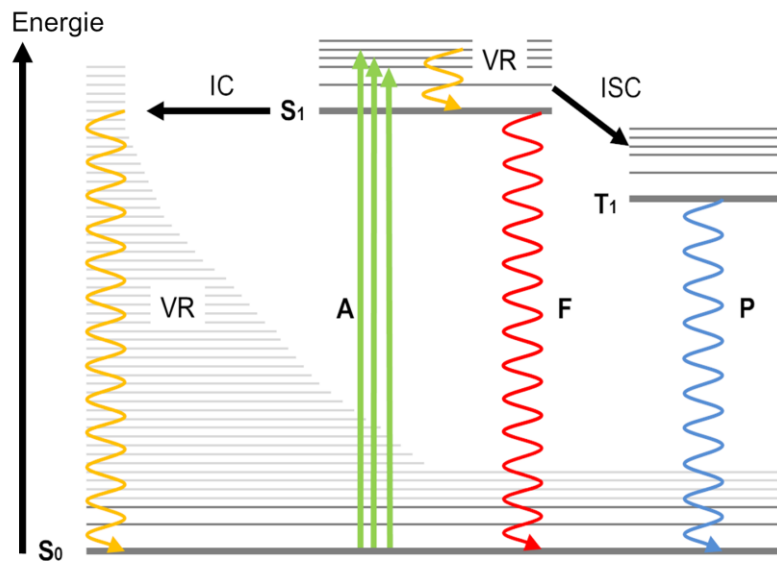


Abbildung 12: Jablonski Diagramm. Über die Absorption (A) eines Photons wird ein Elektron vom Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 angehoben. Es folgt ein Übergang in den Schwingungsgrundzustand über vibronische Relaxation (VR). Beim Übergang vom S_1 - zum Grundzustand wird die freigesetzte Energie in Form von Fluoreszenz (F) frei. Über Intersystem crossing (ISC) kann ein Übergang vom angeregten Singulettzustand S_1 in einen Triplettzustand T_1 erfolgen. Beim Übergang vom T_1 - in den Grundzustand emittiertes Licht, wird als Phosphoreszenz (P) bezeichnet. Durch interne Umwandlung (IC, engl. Internal conversion) kann ein Übergang in einen angeregten Zustand des Grundzustandes erfolgen. Von dort erfolgt der Energieausgleich strahlungsfrei über Vibration.

Betrachtet man die Zeitskalen der einzelnen Vorgänge (s. Tabelle 1), stellt man fest, dass Fluoreszenz in einem Bereich von mehreren Pikosekunden bis mehrere hundert Nanosekunden verläuft während hingegen Phosphoreszenz in einem Zeitraum von Mikrosekunden bis Sekunden stattfindet.^{80, 86} Die zeitliche Diskrepanz zwischen Anregung und Emission ist einerseits auf die interne Relaxation des angeregten Elektrons via IC oder ISC, sowie auf die Tatsache zurückzuführen, dass ein angeregtes Elektron eine gewisse Zeit im angeregten Zustand verweilt, bis es in seinen Grundzustand zurückkehrt. Die langanhaltende Emission der Phosphoreszenz hängt des Weiteren zusätzlich vom verbotenen Charakter des ISC, sowie einer höheren Verweildauer des Elektrons im Triplettzustand ab.⁸⁰

Tabelle 1: Zeitspannen der verschiedenen an Photolumineszenz beteiligten Vorgänge⁸⁵

	Zeitspanne [s]
Photon-Absorption	10^{-15}
Vibration	$10^{-12} - 10^{-10}$
IC	$10^{-11} - 10^{-9}$
Fluoreszenz	$10^{-10} - 10^{-7}$
ISC	$10^{-10} - 10^{-8}$
Phosphoreszenz	$10^{-6} - 10$

Neben der Anregung eines Moleküls durch die Absorption eines Photons, kann die Anregung über eine chemische Reaktion, wie beispielsweise die Oxidation des anzuregenden Moleküls erfolgen.⁸⁶ Wird bei der Rückkehr in den Grundzustand Energie in Form von Lichtemission an die Umgebung abgegeben, so spricht man in diesem Falle von Chemilumineszenz. Eine weitere nennenswerte Form der Lumineszenz ist die sog. Biolumineszenz. Biolumineszenz beschreibt die Fähigkeit von Lebewesen lumineszente Moleküle zu produzieren. Biolumineszenz ist zumeist eine Form der Chemilumineszenz, da die Anregung *in vivo* oftmals über eine chemische Reaktion erfolgt.

2.7.1. Exciplex und Excimer

Nach der photoelektrischen Anregung eines Moleküls existieren verschiedene Mechanismen der Rückkehr in den nicht angeregten Zustand. Einerseits kann der Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand strahlungsfrei (z.B. durch interne Konversion) oder unter Emission eines Photons (Fluoreszenz oder Phosphoreszenz) vollzogen werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Bildung von Excimeren oder Exciplexen.⁸⁰⁻⁸¹

Exciplexe (Kurzform für *excited complex*, engl.: angeregter Komplex) sind Komplexe aus zwei oder mehr Molekülen, welche durch die Bindung eines Moleküls im angeregten Zustand an ein weiteres, nicht angeregtes Molekül gebildet werden. Exciplexe sind kurzlebige Konstrukte und zerfallen wieder in ihre Monomere, sobald der angeregte Bindungspartner wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Eine Sonderform der Exciplexe sind Excimere. Excimere sind angeregte Dimere. Hierbei sind beide Bindungspartner, wie die Bezeichnung bereits erwarten lässt, molekülgleich.⁸⁰⁻⁸¹

Die Betrachtung der Fluoreszenz eines Exciplexes im Vergleich zur Fluoreszenz der einzelnen Bindungspartner zeigt eine deutliche Rotverschiebung der emittierten Strahlung. Des Weiteren zeigen Emissionsspektren von Exciplexen und Excimeren nicht die charakteristischen

vibronischen Strukturen der Monomere, sondern eine breite, formlose Emissionsbande (vgl. Abb. 13).⁸¹

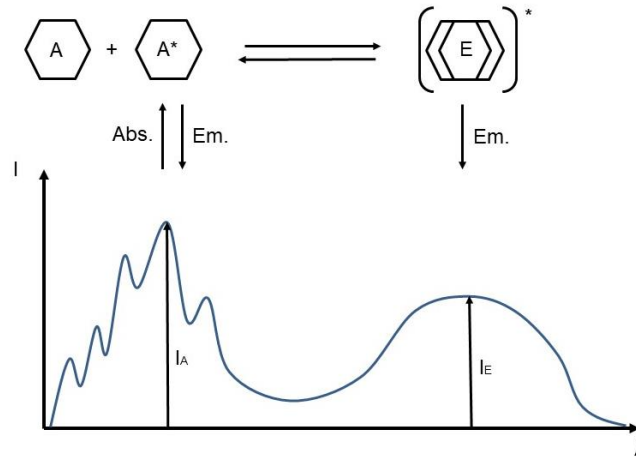


Abbildung 13: Emissionsbanden von Excimeren im Vergleich zu den Emissionsbanden des entsprechenden Monomers. Zu beobachten ist eine starke Rotverschiebung des Emissionsmaximums, sowie eine breite, Emissionsbande ohne die charakteristischen vibronischen Strukturen der Monomere.

3. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll das Anwendungsspektrum des nano3D-Lasersystems erweitert werden. Der Fokus liegt hierbei auf der generellen Durchführung chemischer Synthesen via laserinduziertem Materialtransfer.

In den letzten Jahren wurde das nano3D-Lasersystem kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert. Zuletzt wurde der ursprünglich verwendete DPSS-Laser der Wellenlänge 532 nm durch einen OLED-Laser mit 405 nm Wellenlänge ersetzt. Diese Modifikation führt zu einer veränderten Absorption des Laserimpulses durch die Donor-Beschichtung, was wiederum den so ausgelösten Materialtransfer beeinflusst. Der erste Teil der Arbeit befasst sich deshalb mit einer genaueren Untersuchung des Transferverhaltens verschiedener Stoffe, insbesondere unter Verwendung des neuen 405 nm Lasers. Ein technisches Ziel war es zunächst einen geeigneten Energiebereich zu identifizieren, welcher künftig für den Materialtransfer genutzt werden kann. Im Zuge dessen sollte außerdem die Homogenität der übertragenen Materialmenge festgestellt werden. Neben der angewandten Transferenergie kann das Transferverhalten verschiedener Materialien außerdem von diversen Eigenschaften der zu übertragenden Stoffe abhängen. Ein weiteres Ziel war es deshalb, diese Stoffeigenschaften zu ermitteln. Des Weiteren sollten Techniken entwickelt werden, die eine genauere Einstellung des übertragenen Materialvolumens ermöglichen. Somit bestanden die technischen Ziele darin, ein besseres Verständnis für den Druckvorgang zu entwickeln, um durch die Anpassung von Prozessparametern, sowie über generelle Materialeigenschaften ein besseres Druckergebnis zu erzielen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die zuvor gewonnenen Erkenntnisse dazu verwendet werden, zahlreiche Stoffe zu übertragen, diese Bausteine mit dem nano3D-Drucker übereinander zu stapeln und so räumlich definierte Syntheseorte zu schaffen. Um in Zukunft eine große Vielfalt an Reaktionen zu ermöglichen, sollten die Reaktionen ohne eine Anknüpfung an die Synthesoberfläche durchgeführt werden. Dabei gilt es zunächst Beispielreaktionen als *proof-of-concept* zu identifizieren und die Reaktionsführung zu optimieren. Aufgrund des schnellen Reaktionsnachweises mithilfe von Fluoreszenz wurde der Schwerpunkt in diesem Teil der Arbeit auf die Etablierung und Optimierung der Synthese von fluoreszierenden Molekülen gelegt. Das Hauptziel dieses Teils der Arbeit war die Herstellung eines Arrays fluoreszierender Moleküle, um so zu zeigen, dass es mithilfe des nano3D-Lasersystems möglich ist, in kürzester Zeit hochdichte, kombinatorische Molekülarrays herzustellen.

Für einen zuverlässigen Reaktionsnachweis sollte neben der Fluoreszenzanalyse auch orts aufgelöste MALDI-MS als Arrayanalyse etabliert werden. Zuletzt sollte in einer kombinatorischen Arraysynthese gezeigt werden, dass es mithilfe des nano3D-Lasersystems möglich ist, in kürzester Zeit hochdichte Molekülarrays herzustellen.

4. Hauptteil

4.1. Untersuchung des Materialtransfers

4.1.1. Vorarbeiten

In der Vergangenheit wurden am IMT verschiedene Methoden entwickelt, um hochdichte Molekülarrays herzustellen^{10, 12, 87-89}. Tobias Förtsch und Felix Löffler gelang es beispielsweise, durch den laserinduzierten Transfer von voraktivierten Aminosäuren Peptidarrays mit einer Spotdichte von bis zu 17.000 Spots/cm² aufzubauen^{10, 12, 70}. Für den Transfer der einzelnen Aminosäuren wurden sogenannte Donoren verwendet. Donoren sind Glasobjektträger, welche mit einer lichtabsorbierenden Kapton-Folie beschichtet wurden. Auf dieser Kaptonschicht wird ein Dünnschicht aus den jeweiligen Aminosäure-Aktivestern aufgebaut, welche in einer polymeren Transfermatrix eingebettet sind. Beim Transfer wird ein Laserimpuls von der Kaptonschicht des Donors absorbiert und in Wärmeenergie umgewandelt. Durch die entstehende Hitze kommt es zu einer blasenförmigen Ausdehnung der Donorbeschichtung hin zur Oberfläche des Arrays. Wird ausreichend Hitze an die Donoroberfläche geleitet, geht die Transfermatrix in einen viskosen Zustand über. Treten Donor und Akzeptor durch die Hitzeblase in Kontakt, werden nanometerdicke Materialschichten auf der Akzeptoroberfläche abgelagert.⁷¹

Der Transferprozess wurde von Tobias Förtsch genauer untersucht und optimiert. Dabei wurde festgestellt, dass die übertragene Materialmenge mit der Intensität des absorbierten Laserimpulses korreliert.¹² Das heißt, dass bei höheren Lasereinstellungen oder längeren Pulsdauern eine Zunahme des entsprechend übertragenen Materialvolumens nachgewiesen werden konnte. Beim Transferprozess konnten auf diese Weise verschiedene Grenzwerte definiert werden: Zum einen wird eine minimale Transferenergie benötigt, um einen Materialübertrag hervorzurufen. Dabei muss die bei der Absorption resultierende Hitze einerseits hoch genug sein, um die Glasübergangstemperatur (T_G) der Transfermatrix zu erreichen. Andererseits muss die Ausdehnung der auftretenden Hitzeblase groß genug sein, um einen Kontakt zwischen Donor und Akzeptor zu ermöglichen.^{12, 75, 90} Ist die bei der Absorption des Laserstrahls auftretende Hitze jedoch zu hoch, kommt es zu einer thermischen Zersetzung der Kaptonbeschichtung des Donors. In diesem Fall kann auch eine Zersetzung der zu übertragenden Stoffe, insbesondere bei besonders empfindlichen Materialien nicht ausgeschlossen werden.^{12, 75, 90-91} Bei einer weiteren Steigerung der Transferenergie kommt es unter anderem zu einem unspezifischen Übertrag der Zersetzungsprodukte.⁷⁵

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass es durch einen wiederholten Lasertransfer möglich ist, verschiedene Materialien in sogenannten *Nanostacks* übereinander zu schichten.¹² Über eine kontrollierte Durchmischung dieser Nanostacks ist es möglich, unterschiedliche Stoffe miteinander zur Reaktion zu bringen. Diese Eigenschaft des laserinduzierten Materialtransfers wurde in der Vergangenheit dazu verwendet, verschiedene

chemische Reaktionen durchzuführen (s. Kap. 4.2.1.)^{11, 70, 92} Auch zum Übertrag und Stapeln von Funktionsbausteinen in der Materialforschung wurde das Lasersystem bereits verwendet.⁷⁵ Dabei wurden verschiedene Materialien zur Herstellung von organischen Leuchtdioden (OLEDs) auf ihre Transfereigenschaften untersucht. Durch die Möglichkeit, verschiedene Materialien übereinander zu Schichten, ist es unter Umständen möglich, Elemente wie OLEDs oder Brennstoffzellen via Lasertransfer im kombinatorischen Arrayformat herzustellen und zu optimieren.

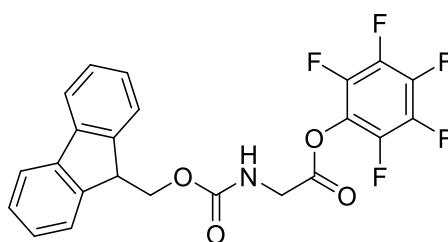
Bei der Betrachtung des Transfers von OPfp-aktivierten Aminosäuren und deren Kupplung an die Syntheseoberfläche wurde gezeigt, dass die Beschichtungsdicke der Donoren keinen nennenswerten Einfluss auf die Kupplungsqualität nimmt.¹² In anderen Prozessen von laserinduziertem Materialtransfer wie beispielsweise blasengesteuerter LIFT (BA-LIFT, engl.: *blister actuated*) kann jedoch eine Abhängigkeit der übertragenen Materialmenge und der Dicke der Donor-Beschichtung nachgewiesen werden.^{90-91, 93} Es konnte gezeigt werden, dass eine zu dicke Beschichtung der Donoren in einem verminderten Materialübertrag resultiert.^{90, 94}

Neben der Dicke der Transferschicht kann auch die Zusammensetzung der Donorbeschichtung den Materialübertrag beeinflussen. Bastian Münster untersuchte in seiner Doktorarbeit das Mischungsverhalten von der verwendeten Transfermatrix und Aminosäure-Aktivestern.⁹⁵ Münster zeigte, dass ab einem Mischungsverhältnis von mehr als 30 w% Aminosäure Entmischungserscheinungen auftreten. Yelda Nur Demirdögen zeigte in ihrer Bachelorarbeit, dass eine zu hohe Konzentration an Transfermaterial in der Donorbeschichtung zur Ausbildung von Kristallstrukturen führt, was einen inhomogenen Materialübertrag zur Folge hat.⁷⁶

4.1.2. Ermittlung eines geeigneten Transferenergie-Bereichs

Seit der Erfindung des ersten Lasersystems durch Felix Löffler und Tobias Förtsch wurden zahlreiche Optimierungen am Laseraufbau vorgenommen. Unter anderem wurde der verwendete 532 nm-DPSS-Laser durch einen OLED-Laser der Wellenlänge 405 nm ersetzt. Durch den Einsatz eines OLED-Lasers ergibt sich eine geringere Schwankung der Laserleistung, was dabei helfen sollte homogenere Spots zu erzeugen. Der Wechsel der Laserwellenlänge führt jedoch zu einem veränderten Absorptionsverhalten des Laserimpulses durch die Kaptonbeschichtung des Donors. Während bei einer Wellenlänge von 532 nm lediglich 30-40 % des eintreffenden Lichts absorbiert werden können¹², wird Licht der Wellenlänge 405 nm zu über 95 % absorbiert.⁹⁶ Daraus folgt, dass bevor der laserinduzierte Materialtransfer untersucht werden konnte, zunächst ein geeigneter Energiebereich ermittelt werden musste, welcher für einen homogenen Materialtransfer verwendet werden konnte.

In der Vergangenheit wurde das nano3D-Lasersystem überwiegend zur Synthese von Peptidarrays durch den schrittweisen Transfer der 20 verschiedenen, proteinogenen Aminosäure-Bausteinen verwendet.^{10, 12} Aus diesem Grund wurden auch frühere Untersuchungen und Optimierungen des Übertrags vorwiegend anhand von lasertransferierten Aminosäuren sowie deren Kupplung an einer Syntheseoberfläche durchgeführt. Um die Qualität des Materialtransfers unter Verwendung eines 405 nm-Lasers bewerten zu können, wurden deshalb die Versuche in den folgenden Kapiteln ebenfalls primär unter Verwendung von Fmoc-Gly-OPfp **27** als Referenz-Substanz durchgeführt.



27

Abbildung 14: Strukturformal des übertragenen Fmoc-Gly-OPfp **27**

Zur Bestimmung eines geeigneten Energiebereichs wurde zunächst die Kupplung von lasertransferiertem Fmoc-Gly-OPfp **27** an einer Syntheseoberfläche bei verschiedenen Transferbedingungen untersucht. Hierzu wurde eine Fmoc-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-funktionalisierte Glasoberfläche zunächst in einer Lösung aus 20 % Piperidin in N,N-Dimethylformamid (DMF) (v/v) entschützt. Nach dem anschließenden Lasertransfer von Fmoc-Gly-OPfp **27** wurde die übertragene Aminosäure im Ofen an die Syntheseoberfläche gekuppelt. Freie Aminogruppen wurden mit einer Lösung aus 10 % Essigsäureanhydrid (ESA)

und 20 % *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF (v/v/v) acetyliert. Zum Nachweis der gekuppelten Aminosäure wurde die Oberfläche erneut Fmoc-entschützt und mit *N*-Hydroxysuccinimid-aktiviertem 5-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA-NHS) fluoreszenzmarkiert. Beim verwendeten Lasermuster wurden Laserleistung und Laserzeit in genau definierten Schritten variiert. Das entsprechende Lasermuster ist in Abbildung 15 dargestellt. Abbildung 16 zeigt den Fluoreszenz-Scan des gekuppelten Glycins.

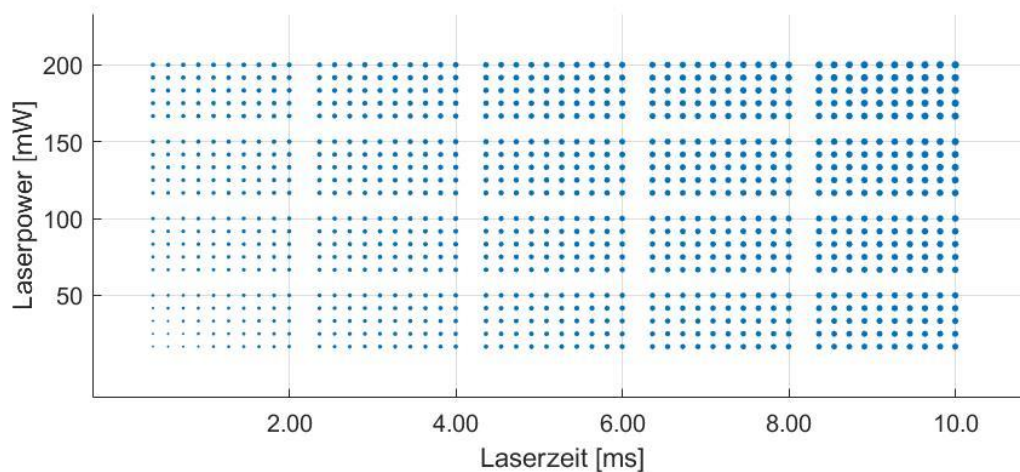


Abbildung 15: Lasermuster zur Ermittlung der Transferparameter für den laserinduzierten Materialtransfer. Variation der Laserleistung: 0.00 – 200 mW (Δ : 10 mW). Variation der Laserzeit: 0.00 – 10.0 ms (Δ : 0.20 ms). Pitch: 250 μ m.

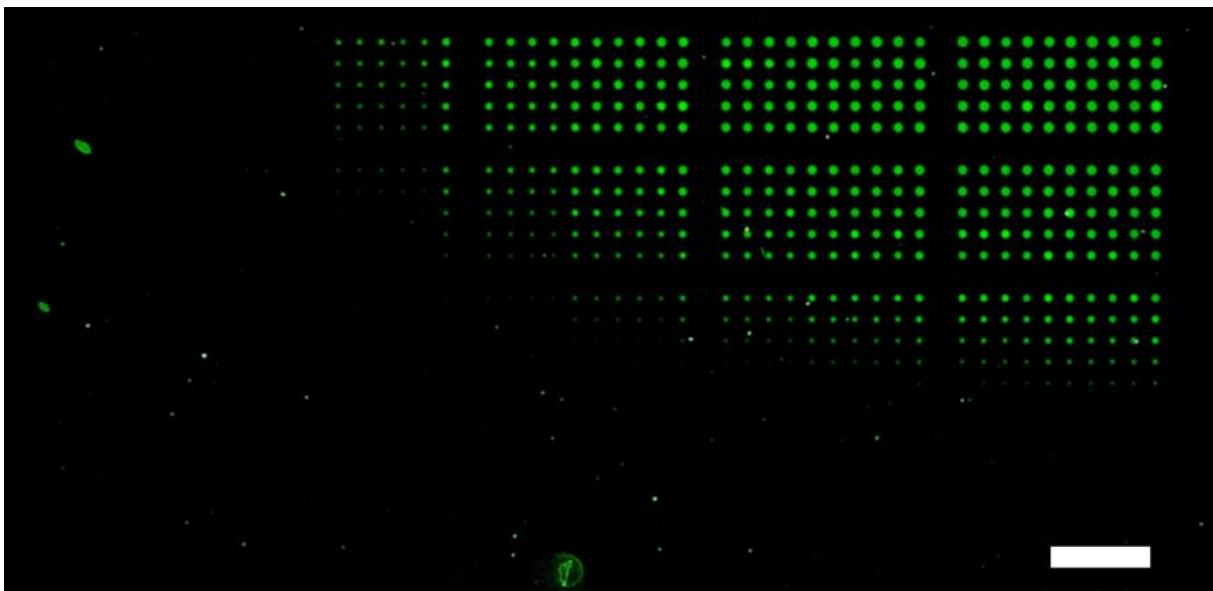


Abbildung 16: Fluoreszenz-Scan zur Ermittlung des Transferenergiebereichs. TAMRA-NHS-Färbung von nach dem Lasertransfer gekuppeltem Glycin. Variation der Laserzeit entlang der x-Achse: 0.20 - 10.0 ms (Δ : 0.20 ms). Variation der Laserleistung entlang der y-Achse: 10.0 – 200 mW (Δ : 10mW). Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 582 \pm 37.5 nm. Auflösung: 5 μ m. PMT: 1.0. Maßstab: 1 mm.

Hauptteil

Eine Betrachtung der Fluoreszenzaufnahme (Abb. 16) zeigt, dass bei Laserzeiten unter 3.00 ms kein Übertrag nachgewiesen werden konnte. Ebenso ist bei der Anwendung von Laserleistungen unter 50.0 mW auch bei längeren Laserzeiten keine Fluoreszenz detektierbar. Dies lässt darauf schließen, dass unterhalb dieser Grenzwerte kein Materialtransfer stattgefunden hat. Vergleicht man die minimalen Transferbedingungen, die notwendig sind, um die Kupplung des transferierten Glycins an die Oberfläche nachzuweisen (Tab. 2), muss im Mittel eine Transferenergie von 0,50 mJ aufgebracht werden. Es wurde angenommen, dass bei zu geringen Transferparametern nicht ausreichend Hitze generiert wird, um eine hinreichend starke Ausbildung der Transferblase zu erzeugen.¹²

Tabelle 2: Minimal notwendige Transferenergie für einen nachweisbaren Lasertransfer von Fmoc-Gly-OPfp auf eine amino-funktionalisierte Oberfläche.

Laserzeit [ms]	Laserleistung [mW]	Transferenergie [mJ]
200	3,00	0,60
190	3,00	0,57
180	3,00	0,54
170	3,00	0,51
160	3,00	0,48
150	3,00	0,45
140	3,60	0,50
130	4,00	0,52
120	4,00	0,48
110	4,00	0,44
100	4,60	0,46
90	5,00	0,45
80	6,00	0,48
70	7,00	0,49
60	9,00	0,54
Mittelwert:		0,50

Vor allem im Bereich höherer Transferparameter ist im Block 8,20 – 10,0 ms / 160 – 200 mW keine weitere Zunahme der Fluoreszenzintensität sowie des Spot-Durchmessers zu erkennen. Es ist daher anzunehmen, dass es bei hohen Energien zu einer Limitierung der übertragenen Materialmenge kommt.

Durch den Wechsel der Laserwellenlänge zu 405 nm konnte gezeigt werden, dass ein Materialübertrag bereits bei geringeren Laserleistungen erfolgreich durchgeführt werden kann. Dieser Beobachtung liegt die veränderte Absorption des Laserimpulses durch die Kaptonbeschichtung des Donors zugrunde. In Folge der verstärkten Absorption kommt es zu einer stärkeren Hitzeentwicklung, weshalb der Materialtransfer bei geringen Laserleistungen ermöglicht wird. Allerdings führt eine zu hohe Hitze beim Materialtransfer zu einer thermischen Zersetzung der Kaptonschicht.⁷⁵ Bei einem übermäßigen Auftreten dieses Effekts kann ein unspezifischer Übertrag der Zersetzungsprodukte auftreten.⁷⁵ Aus diesem Grund wurde der Donor nach dem Lasertransfer per Lichtmikroskop untersucht (Abb. 17).

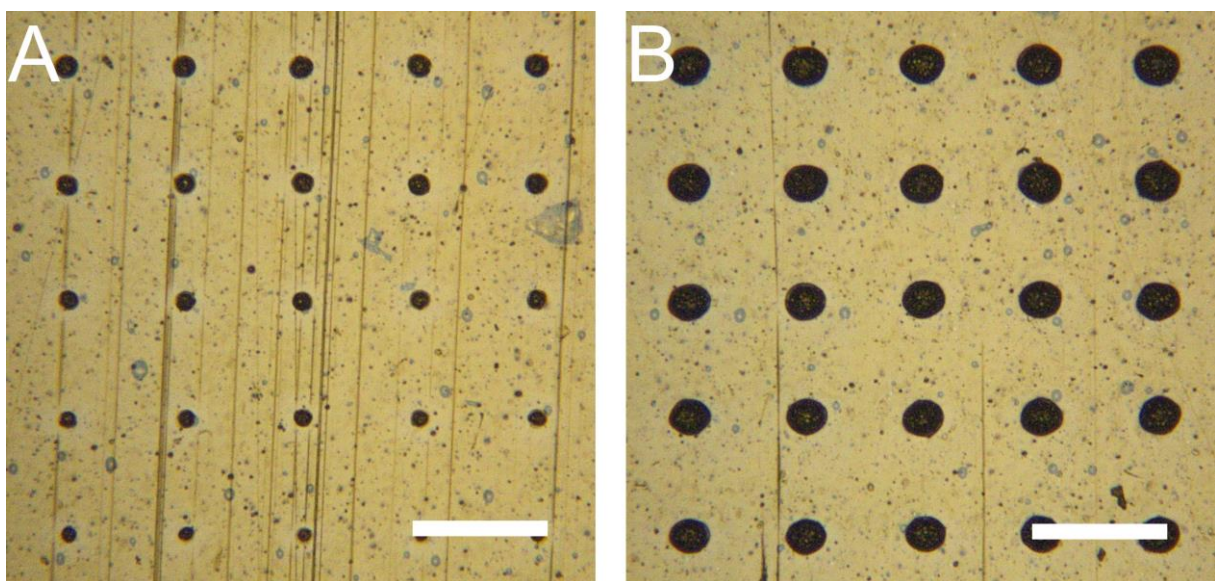


Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahme der Kaptonschicht eines Donors nach erfolgreichem Lasertransfer. A: niedrige Laserleistung (60 - 100 mW / 8.20 - 9.00 ms), B, hohe Laserleistung (160 – 200 mW / 9.20 – 10.0 ms). Vergrößerung: 5x, Maßstab: 250 μm .

Bei der Verwendung einer Laserwellenlänge von 532 nm konnte erst ab hohen Parametern eine Zersetzung der Kapton-Folie beobachtet werden. Die Aufnahmen in Abbildung 17 zeigen jedoch, dass bei einer Laserwellenlänge von 405 nm auch bei geringen Transferparametern Zersetzungserscheinungen auftreten. In Abbildung 17A ist ein Bereich der Donoroberfläche abgebildet, welcher mit Laserpulsen von 60-100 mW und 8.20-9.00 ms beschossen wurde. Bereits hier sind die einzelnen Spots deutlich durch Schwarzfärbung des verbrannten Kaptons zu erkennen. Bei höheren Parametern (160 – 200 mW / 9.20 -10.0 ms, Abb. 17B) ist eine Zunahme der Durchmesser der durch die Zersetzung hervorgerufenen Bereiche zu beobachten. Um auszuschließen, dass die in Abbildung 16 detektierten Fluoreszenz-Signale

durch Zersetzungsprodukte der zerstörten Donorbeschichtung hervorgerufen wurden, wurde zusätzlich ein Übertrag von einem Donor durchgeführt, welcher lediglich mit der Kaptonschicht versehen war. Nach erneuter Acetylierung, Entschützung und Fluoreszenzfärbung konnte keine Fluoreszenz detektiert werden. Somit ist ein unspezifischer Übertrag durch eine thermische Zersetzung der Kaptonbeschichtung im beobachteten Transferbereich ausgeschlossen.

Bei der Ermittlung eines geeigneten Energiebereichs für den Materialtransfer konnte somit festgestellt werden, dass für einen nachweisbaren Transfer eine minimale Transferenergie von 0.50 mJ aufgewandt werden muss. Durch die verbesserte Absorption der Laserwellenlänge durch die Kaptonbeschichtung bei der Verwendung eines 405 nm-Lasers im Vergleich zu einem Laser der Wellenlänge 532 nm kann ein Transfer und die Kupplung von Aminosäuren auch bei niedrigeren Laserleistungen durchgeführt werden. Vor allem beim Transfer unter Verwendung von Laserleistungen über 150 mW und Laserzeiten über 8.00 ms kann keine Zunahme an gekuppelter Aminosäure detektiert werden. Es ist dennoch zu beachten, dass selbst bei niedrigen Transferparametern kein Materialübertrag ohne eine Zerstörung der Kaptonbeschichtung zu erreichen ist. Vor allem bei stark hitzeempfindlichen Materialien sollte deshalb zusätzlich zur Analyse der übertragenen Materialmenge eine Untersuchung des Übertrags per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl.: *High Performance Liquid Chromatography*) durchgeführt werden, um auszuschließen, dass die Materialien beim Transferschritt zerstört werden.

4.1.3. Untersuchung der übertragenen Materialmengen

Basierend auf den gewonnenen Ergebnissen wurde das übertragene Spotvolumen sowie die Höhe der Spots auf verschiedenen Akzeptoroberflächen *via* VSI-Analyse genauer untersucht. Für dieses Experiment wurde erneut Fmoc-Gly-OPfp in einer Lasermatrix übertragen. Es wurde der Transfer auf einer NH₂-β-Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-funktionalisierten Oberfläche betrachtet und mit dem Transfer auf einem gereinigten Objektträger aus Kalk-Natron-Glas verglichen. Um die Homogenität des Materialtransfers auf den Oberflächen bewerten zu können, wurden pro Transfereinstellung 25 Spots übertragen und die entsprechenden Messwerte für jede Einstellung gemittelt. Beim verwendeten Lasermuster wurde die Laserleistung schrittweise von 120 – 200 mW und die Laserzeit von 4.00 – 10.0 ms variiert. Zur besseren Veranschaulichung werden im Folgenden nur ausgewählte Ergebnisse diskutiert. Die vollständigen Messdaten sind im Anhang in den Tabellen 19 – 18 aufgelistet. Zunächst wurde der Verlauf der übertragenen Materialmenge bei einer konstanten Pulsdauer von 6.50 ms betrachtet. Die Höhe der dabei erzeugten Materialspots auf beiden Oberflächen ist in Abbildung 18 graphisch dargestellt.

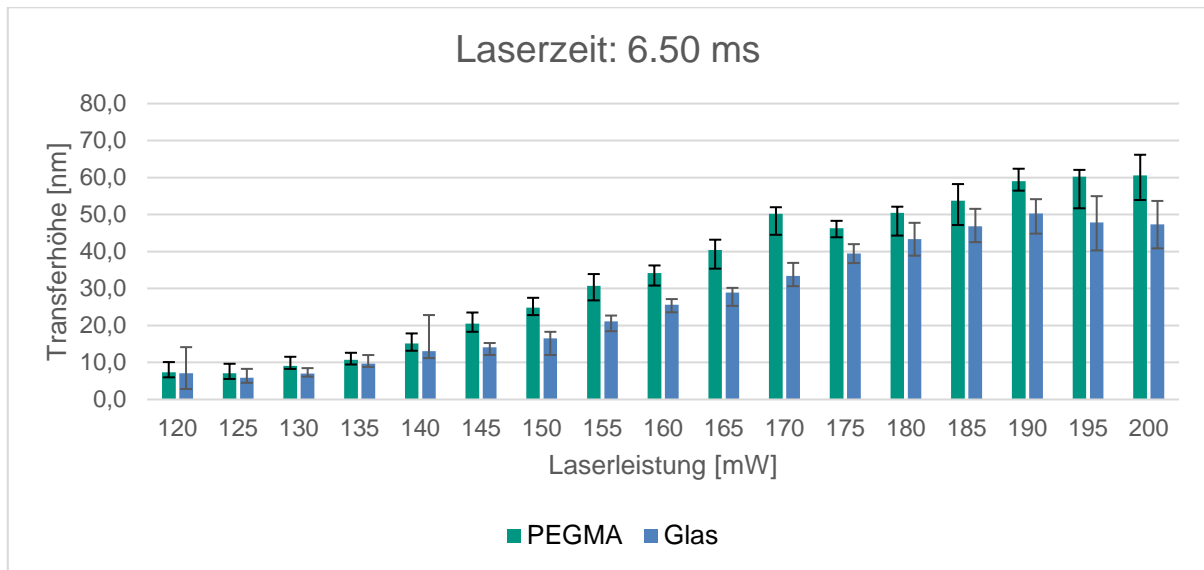


Abbildung 18: Verlauf der Höhe lasertransferierter Fmoc-Gly-OPfp-Spots auf einer NH_2 - β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-funktionalisierten Oberfläche (PEGMA) sowie auf einer Glasoberfläche (Glas) bei einer Laserzeit von 6.50 ms. Betrachteter Laserleistungsbereich: 120 – 200 mW.

Beim Verlauf der Spothöhen ist der Zusammenhang von Laserenergie und Spothöhe klar zu erkennen. Weiterhin fällt auf, dass bei einer Laserzeit von 6.50 ms ab einer angewandten Laserleistung von 190 mW zu einer Stagnation der Spothöhe kommt. Bei dem Transfer auf Glas tritt dieser Effekt bei gleicher Pulsdauer bereits bei 185 mW auf. Diese Beobachtung deckt sich mit der Auswertung des Fluoreszenz-Scans im vorherigen Kapitel (Abb. 16): Dort wurde festgestellt, dass nach der Fluoreszenzfärbung von lasertransferiertem und an eine Synthesoberfläche gekoppeltem Glycin vor allem bei hohen Transferparametern keine Veränderung der Spotdurchmesser oder Fluoreszenzintensität mehr auftritt. Die Analyse der übertragenen Materialmenge zeigt, dass dies auf eine Limitierung des maximal transferierbaren Spotvolumens zurückzuführen ist.

In Abbildung 19 ist der Verlauf der Spothöhe bei einer konstanten Laserleistung für verschiedene Pulsdauern auf den untersuchten Oberflächen dargestellt.

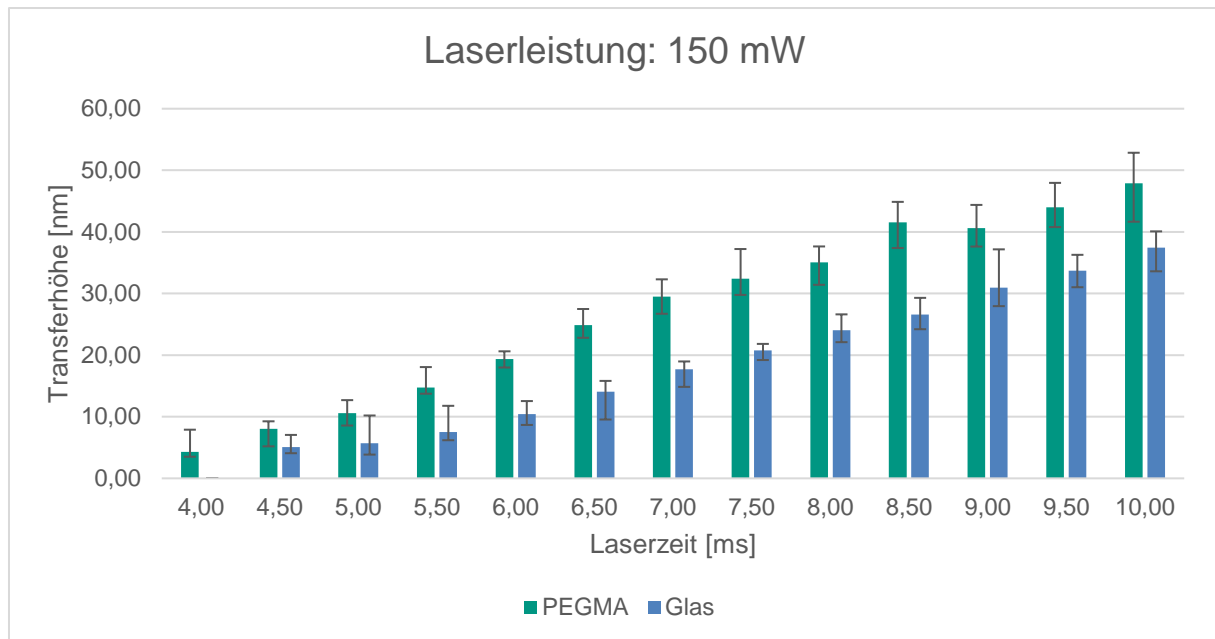


Abbildung 19: Verlauf der Höhe lasertransferierter Fmoc-Gly-OPfp-Spots auf einer NH_2 - β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-funktionalisierten Oberfläche (PEGMA) sowie einer Glasoberfläche (Glas) bei einer konstanten Laserleistung von 150 mW. Betrachteter Laserzeitbereich: 4.00 – 10.0 ms.

Auch bei einer konstanten Laserleistung kann die Relation zwischen Pulsdauer und generierter Spothöhe aufgezeigt werden. Bei der in Abbildung 19 dargestellten Laserleistung von 150 mW kann noch keine Abflachung der Spothöhe beobachtet werden, welche in diesem Fall jedoch auch erst ab ca. 55 – 60 nm auftritt (vgl. Abb.: 18).

Im Hinblick auf die Homogenität der übertragenen Spots lässt sich beim Transfer auf einer NH_2 -10:90-PEGMA-co-MMA funktionalisierten Oberfläche eine Varianz von Durchschnittlich 14 % der Spothöhen feststellen. Beim Transfer auf einer Glasoberfläche beträgt die Durchschnittliche Abweichung der Spothöhen 18 %. Dieser Unterschied ist vor allem auf einen inhomogeneren Übertrag bei geringen Laserleistungen (120 – 140 mW) zurückzuführen. Dies hängt vermutlich mit der Tatsache zusammen, dass bei diesen Einstellungen nicht immer ausreichend Energie zur Ausbildung der Hitzeblase absorbiert wurde. Beim Vergleich des Transfers auf den verschiedenen Oberflächen ist zu erkennen, dass der Transfer auf einer NH_2 -10:90-PEGMA-co-MMA funktionalisierten Oberfläche und der Transfer auf Glas einem ähnlichen Verlauf folgen. Dabei ist der Anstieg sowie die maximal erreichbare Spothöhe auf Glas in der Regel geringer als bei einem vergleichenen Transfer auf einer funktionalisierten Oberfläche. Im Mittel beträgt der Höhenunterschied 6 nm. Der Höhenunterschied ist dabei bei mittleren Transferparametern (Laserzeit: 6.00 – 9.00 ms / Laserleistung: 150 – 200 mW) am größten und beträgt bis zu 13 nm. Die Unterschiede des Transferverhaltens unter Verwendung

verschiedener Akzeptoroberflächen lassen sich unter anderem durch die unterschiedliche Polarität der untersuchten Akzeptoren erklären.

Betrachtet man den Verlauf des Materialübertrags entlang einer definierten Laserpulsdauer durch Variation der Laserenergie bzw. entlang einer definierten Laserenergie durch Variation der Laserzeit, so kann eine Zunahme des übertragenen Materials bei steigenden Transferparametern wie einer höheren Laserleistung oder längeren Laserzeiten festgestellt werden. Ein Vergleich verschiedener Einstellungen mit derselben Transfer-Energie zeigt jedoch, dass kein eindeutiger Zusammenhang von Transferenergie und übertragenem Materialvolumen existiert. Vielmehr spielt die Zusammensetzung der Transferenergie aus Laserleistung und Laserzeit eine übergeordnete Rolle. Durch Untersuchungen des Materialübertrags bei anderen laserunterstützten Transfermechanismen konnte ebenfalls festgestellt werden, dass Laserleistung und Laserzeit einen individuellen Einfluss auf die übertragene Materialmenge ausüben.^{90,97} Dieser Einfluss wird in Abbildung 20 deutlich. In der Abbildung sind die Spothöhen und das Spotvolumen bei unterschiedlicher Zusammensetzung derselben Transferenergie dargestellt.

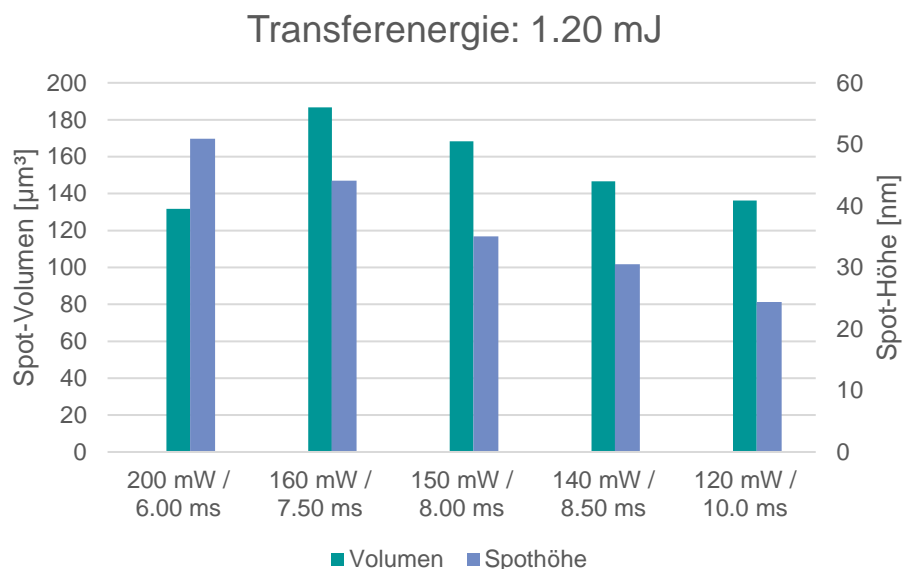


Abbildung 20: Vergleich der Spot-Höhen und Spot-Volumen bei unterschiedlicher Zusammensetzung der Transferenergie

Die erzeugte Spothöhe scheint überwiegend von der Laserleistung abzuhängen. Das tatsächlich übertragene Volumen korreliert jedoch sowohl mit der Laserzeit als auch mit der Laserleistung. Das Größte der aufgeführten Volumina konnte bei einem Transfer mit 160 mW und 7.50 ms erzielt werden, während hingegen bei einem Übertrag mit 200 mW und 6.00 ms die höchste Schichtdicke erzeugt wurde. Kürzere Laserpulse oder niedrigere Lasereinstellungen erzeugen somit bei gleicher Transferenergie kleinere Spotvolumen.

Die Untersuchung des übertragenen Materialvolumens zeigt, dass wie bereits in Kap. 4.2.1. angenommen eine Limitierung der maximal übertragbaren Materialmenge besteht. Bis zum Erreichen dieses Limits kann weiterhin die bekannte Proportionalität des Materialübertrags sowohl mit der Laserzeit als auch der Laserleistung beobachtet werden. Dabei scheinen die beiden Transferparameter Laserleistung und Laserzeit allerdings in unterschiedlichem Maße den Übertrag zu beeinflussen, was sich in einem stark verschiedenen Transferverhalten bei einer unterschiedlichen Zusammensetzung der gleichen Transferenergie zeigt. Dennoch konnte ein homogener Übertrag von lasertransferiertem Fmoc-Gly-OPfp **27** sowohl beim Transfer auf eine NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-funktionalisierte Oberfläche sowie auf einem gewöhnlichen Glasakzeptor gezeigt werden. Die Varianz der übertragenen Spothöhen beträgt im Mittel lediglich 16 %. Beim direkten Vergleich des Übertrags zeigte sich ein geringer Einfluss der verwendeten Akzeptoroberfläche. Im Mittel waren die auf einem Glasakzeptor erzeugten Spots 6 nm niedriger als die Spots, welche auf dem funktionalisierten Akzeptor übertragen wurden. In den folgenden Kapiteln soll zusätzlich der Einfluss der verwendeten Donoren untersucht werden.

4.1.4. Einfluss der Donor-Beschichtung auf die übertragene Materialmenge

4.1.4.1. Einfluss der Zusammensetzung der Transferschicht

Bei der Herstellung von Donoren wird der Transferfilm per Rotationsbeschichtung einer Lösung aus dem zu transferierenden Material und der Transfermatrix in einem leicht flüchtigen Lösungsmittel wie DCM auf der Donoroberfläche ausgebildet. In früheren Arbeiten wurden unterschiedliche Ansätze zur Herstellung der Beschichtungslösung verwendet. Bei der Herstellung von Peptidarrays mit dem nano3D-Laserdrucker wurden 15.0 mg der zu übertragenen Aminosäure sowie 135 mg der Transfermatrix in 1,00 ml DCM gelöst. In diesem Ansatz entspricht das Mischungsverhältnis von Aminosäure zu Transfermatrix 1:9 (w/w) bei einer Gesamtkonzentration der Beschichtungslösung von 150 mg/ml.^{10, 12} Aufgrund des stark unterschiedlichen Molekulargewichts der verschiedenen Aminosäuren führt dieses Protokoll zu schwankenden Stoffmengenkonzentrationen der Aminosäuren in der Donorbeschichtung. Alternative Ansätze hingegen arbeiten konstant mit Stoffmengen von 30.0 μ mol⁹⁸ bzw. 57.2 μ mol^{11, 70} Transfermaterial. Die Menge der Transfermatrix wird in diesen Fällen so angepasst, dass die Masse des Transfermaterials und der Matrix in Summe 150 mg ergeben. Die Mischung aus Transfermaterial und Matrix wird anschließend in 1.00 ml DCM gelöst, sodass auch in diesem Ansatz eine Konzentration der Beschichtungslösung von 150 mg/ml erreicht wird.

Im Folgenden soll untersucht werden, welchen Einfluss die Zusammensetzung der Donorbeschichtung auf den laserinduzierten Materialtransfer ausübt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von Fmoc-Gly-OPfp **27** mit der Transfermatrix hergestellt und in DCM gelöst. Die Konzentration der Beschichtungslösungen betrug 150 mg/ml. Anschließend wurden die Lösungen via Spincoating als Dünnschicht auf Donoroberflächen aufgebracht. Nach dem erfolgten Lasertransfer wurden die übertragenen Spots per VSI analysiert und die jeweiligen Spothöhen miteinander verglichen. Der Anteil an Fmoc-Gly-OPfp **27** der Beschichtungslösungen ist in Tabelle 3 aufgeführt. Abbildung 21 zeigt die maximal gemessene Spothöhe der jeweiligen Ansätze.

Tabelle 3: Fmoc-Gly-OPfp-Anteil verschiedener Beschichtungslösungen. Der Anteil an Transfermatrix wurde so gewählt, dass die Massen der Aminosäure und des Matrixmaterials zusammen 150 mg ergeben.

Anteil Fmoc-Gly-OPfp	Einwaage Fmoc-Gly-OPfp [mg]	Stoffmenge Fmoc-Gly-OPfp [μmol]
0 w%	0.00	0.00
5 w%	7.50	16.2
10 w%	15.0	32.4
15 w%	22.5	48.6

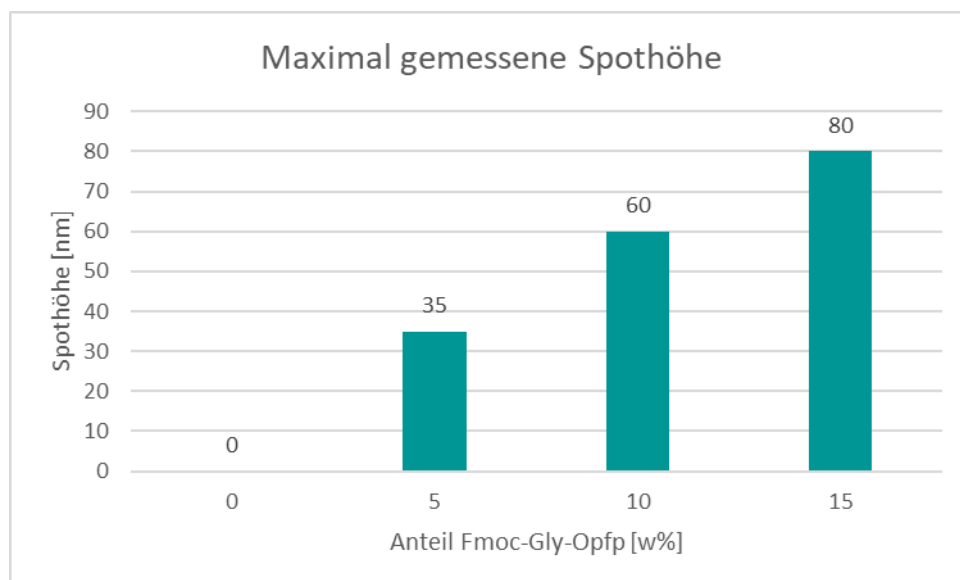


Abbildung 21: Einfluss der Zusammensetzung der Donorbeschichtung. Maximal gemessene Höhe lasertransferierter Spots bei unterschiedlichem Fmoc-Gly-OPfp-Gehalt der Donorbeschichtung.

Hauptteil

Die Auswertung der VSI-Messungen zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen der Konzentration der eingebetteten Aminosäure in der Donorbeschichtung sowie der maximal übertragbaren Materialmenge besteht. Dabei führt eine höhere Konzentration der Aminosäure in der Transferschicht zu einer Zunahme der Spothöhe bei gleichen Transferparametern.

Für diese Beobachtung kommen zwei unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten in Frage. Der Transferprozess des nano3D-Laserdruckers ist ein Kontaktverfahren, bei dem die erhitzte Donoroberfläche in Kontakt mit dem Akzeptor gebracht wird.⁷¹ Bei der Rückbildung der Hitzeblase bleiben die obersten Molekülschichten der Donorbeschichtung auf dem Akzeptor haften. Für einen homogenen Übertrag werden die Donoren jedoch nicht mit einer Reinsubstanz beschichtet, sondern mit einem Gemisch des zu übertragenden Stoffes und der polymeren Transfermatrix.

Einerseits verhindert das verwendete Matrixpolymer eine Kristallisation der eingebetteten Transfermaterialien, andererseits wird der Polymerfilm durch die darin eingebetteten Moleküle aufgelockert, wodurch in den meisten Fällen der Glaspunkt (T_G) der Donorbeschichtung verringert wird. Durch die Inkorporation der Transfermaterialien wird lokal die Ausbildung verschiedener Wechselwirkungen zwischen einzelnen Polymerketten unterbunden. Beim Transferprozess werden nun einzelne Matrixpolymere sowie die darin eingebetteten Materialien übertragen. Erhöht man nun die Konzentration des Transfermaterials in der Donor-Beschichtung, resultiert dies in einem weniger dicht gepackten Polymerfilm, wodurch bei einem Laserimpuls eine größere Materialmenge übertragen werden kann.

Andererseits dient das Matrixpolymer vielmehr als eine Art Netz, in welches die zu transferierenden Materialien eingebettet werden. Bei einem Laserimpuls werden lediglich die eingebetteten Moleküle herausgelöst sowie niedermolekulare Polymerketten übertragen. Durch eine höhere Konzentration des Transfermaterials können lokal auch größere Mengen herausgelöst und übertragen werden. Dieser Ansatz stellt außerdem eine Erklärungsmöglichkeit für die große Diskrepanz zwischen der Schichtdicke der Donorbeschichtung sowie der Höhe der tatsächlich übertragenen Spots dar.

Unabhängig davon zeigt dieser Versuch dennoch, dass beim laserinduzierten Materialtransfer die Beschichtung des verwendeten Donors eine tragende Rolle spielt. Vor allem bei Materialien, deren Übertrag in geringen Spothöhen resultiert, kann durch eine Veränderung der Zusammensetzung der Donorbeschichtung eine Verbesserung des Materialtransfers erreicht werden. Dabei ist zu beachten, dass eine hohe Konzentration des Transfermaterials die Ausbildung von makroskopischen Kristallstrukturen begünstigt. Wie bereits erwähnt, konnte im Fall der Einbettung von Aminosäuren im Transferpolymer gezeigt werden, dass es ab einer Konzentration von 30 w% Aminosäure Entmischungerscheinungen auftreten⁹⁵. Sowohl die Entmischung als auch die Ausbildung von Kristallen in der Donorbeschichtung sind für einen homogenen Materialtransfer jedoch zu vermeiden.

4.1.4.2. Einfluss der Filmdicke der Transferschicht

Neben der Zusammensetzung der Transferschicht kann die Dicke der Donorbeschichtung eine weitere Einflussgröße der übertragenen Materialmenge darstellen. Wie bereits in Kap. 4.1.1. erwähnt konnte Tobias Förtsch zeigen, dass die Dicke des Transferfilms der Donoren keinen Einfluss auf die Kupplungsqualität von Aminosäuren an einer NH_2 - β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-funktionalisierten Oberfläche ausübt.¹² Bei anderen laserinduzierten Transferverfahren wie beispielsweise BA-LIFT wird die Dicke der Donorbeschichtung jedoch als Einflussfaktor auf das übertragene Materialvolumen aufgeführt.^{90-91, 93-94} Um den Einfluss der Donorbeschichtung auf den Materialtransfer besser nachvollziehen zu können, wurde deshalb im Folgenden der Übertrag von Donoren mit unterschiedlicher Transferfilmdicke untersucht.

Bei der Erzeugung eines Dünnsfilms *via* Spin Coating lässt sich eine generelle Abhängigkeit der Filmdicke h von der Rotationsgeschwindigkeit ω und der Konzentration c der Beschichtungslösung ableiten. Dabei gilt: $h \propto \omega$ ⁹⁹ bzw. $h \propto c^{2/100}$. Durch zahlreiche weitere Einflüsse wie Verdunstungsgeschwindigkeit oder Fließverhalten der Beschichtungslösung sind die genauen Beschichtungsparameter zur Ausbildung eines Dünnsfilmes einer definierten Dicke in der Regel individuell zu ermitteln. Für die Beschichtung von Donoren wurde die Parameteroptimierung von Annika Pfeffer im Zuge ihrer Masterarbeit durchgeführt.¹⁰¹ Dabei wurden Transfermatrix und Fmoc-Gly-OPfp in einem Verhältnis von 90:10 Gewichtsprozent gemischt und in DCM gelöst. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen der Beschichtungslösung sowie unterschiedliche Rotationsgeschwindigkeiten untersucht und die jeweils resultierende Dicke des Transferfilms gemessen. Die aus diesen Messungen gewonnenen Ergebnisse wurden dazu verwendet, Donoren mit einer Transferfilmdicke von 1.50 μm , sowie 0.5 μm per Spincoating herzustellen. Anschließend wurde einerseits erneut die Kupplung von lasertransferiertem Fmoc-Gly-OPfp an eine NH_2 - β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-funktionalisierte Oberfläche untersucht sowie das übertragene Materialvolumen per VSI-Analyse verglichen.

Zur Bewertung der Kupplungsqualität des Transfers wurde die übertragene Aminosäure im Ofen an die Syntheseoberfläche gekuppelt. Nach erfolgter Acetylierung und Fmoc-Entschützung der Oberfläche wurde die Anknüpfung der Aminosäure per Fluoreszenzfärbung der freien Aminogruppe mit TAMRA-NHS verifiziert. Das verwendete Lasermuster, sowie der Fluoreszenz-Scan sind in Abbildung 22 dargestellt.

Hauptteil

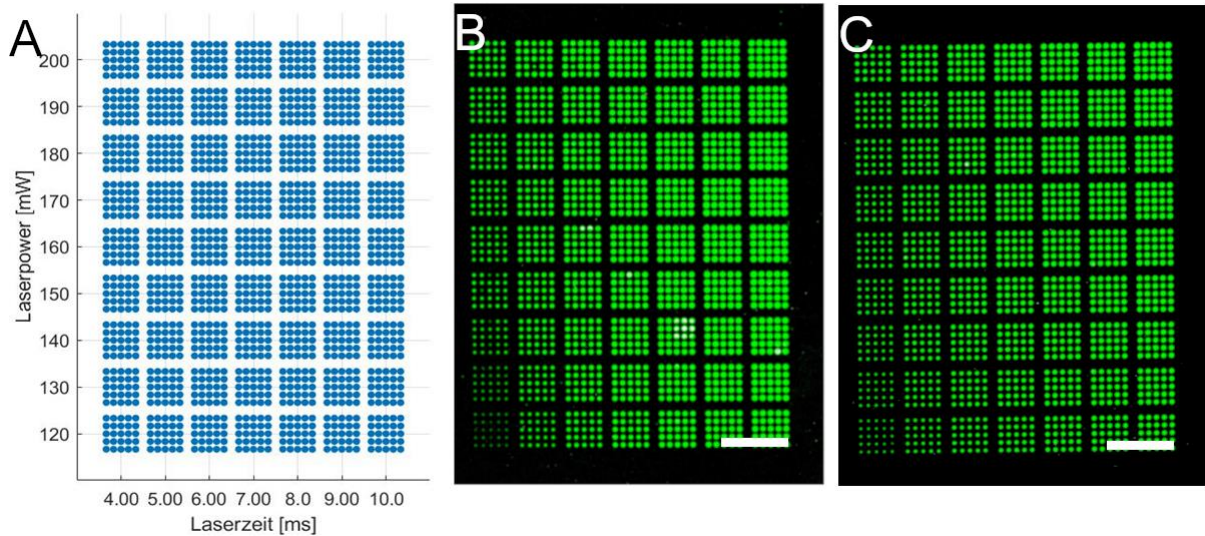


Abbildung 22: Fluoreszenzaufnahme von lasertransferiertem Fmoc-Gly-OPfp nach der Kupplung an die Synthesoberfläche unter Verwendung verschiedener Donor-Filmdicken. Färbung via TAMRA-NHS
A: Lasermuster. B: verwendete Donor-Filmdicke: 1.50 µm. C: verwendete Donor-Filmdicke: 0.50 µm.
Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 587±37.5 nm. PMT: 1.0. Auflösung: 5 µm.
Maßstab: 1.50 mm.

Der Vergleich der beiden Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 22 zeigt, dass die Dicke der Donor-Beschichtung wie erwartet keinen nennenswerten Einfluss auf die Kupplungsqualität von Aminosäuren an der verwendeten Synthesoberfläche ausübt. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren Aussagen.¹² Beim Transfer von Donoren mit einer Transferfilmdicke von 0.50 µm ist eine geringfügig bessere Kupplung zu beobachten als beim Transfer von Donoren mit dickerer Transferfilmdicke. Vor allem bei kurzen Laserzeiten von 4.00 ms kann hier eine homogenere Kupplung beobachtet werden. Des Weiteren führt der Transfer unter Verwendung von 0.50 µm Transferfilmdicke zu geringfügig kleineren Spots. Bei gleichen Transfereinstellung konnte eine Differenz der Spotdurchmesser von maximal 5 % gemessen werden. Ein Vergleich der Fluoreszenzintensität zeigt keine messbaren Unterschiede, die auf eine veränderte Kupplungsqualität schließen lassen.

Um den Effekt der Donorbeschichtung auf die tatsächlich übertragene Materialmenge festzustellen, wurde ein Transfer von Fmoc-Gly-OPfp auf eine Glasoberfläche durchgeführt. Es wurde erneut der Transfer unter Verwendung von Donoren mit einer Transferfilmdicke von 0.50 µm, bzw. 1.50 µm verglichen. Die übertragene Materialmenge wurde per VSI-Analyse der Transferspots bestimmt.

Tabelle 4: Normierte Darstellung der gemessenen Spothöhen unter Verwendung eines 0.50 μm dick beschichteten Donors. Die Normierung erfolgte auf die entsprechenden Spothöhen eines Übertrags unter Verwendung eines 1.50 μm dick Beschichteten Donors.

		Laserzeit [ms]						
		10.0	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00
Laserleistung [mW]	200	0.14	0.11	0.11	0.12	0.14	0.18	0.24
	190	0.12	0.12	0.11	0.11	0.11	0.14	0.21
	180	0.14	0.11	0.11	0.09	0.11	0.18	0.12
	170	0.13	0.12	0.11	0.11	0.15	0.23	-
	160	0.16	0.13	0.10	0.13	0.20	-	-
	150	0.15	0.18	0.14	0.17	-	-	-
	140	0.15	0.17	0.21	0.33	-	-	-
	130	0.19	0.24	0.24	-	-	-	-
	120	0.29	0.36	-	-	-	-	-

Im Vergleich zur Fluoreszenzanalyse zeigt die Untersuchung des Materialtransfers via VSI, dass die Spots, welche beim Transfer von einem Donor mit 0.50 μm Transferfilmdicke erzeugt wurden, deutlich niedriger sind als jene, welche mit einem 1.50 μm dick beschichteten Donor generiert wurden. Bei der Verwendung von Donoren mit einer Transferfilmdicke von 0.50 μm konnten maximale Spothöhen von 9 nm generiert werden. Diese Spothöhe beträgt lediglich 14 % der maximalen Spothöhe, welche unter Verwendung von Donoren mit einer Filmdicke von 1.50 μm bei gleichen Transferbedingungen erreicht wurde. Die VSI-Messung zeigt somit, dass die Dicke des Transferfilms eines Donors einen maßgeblichen Einfluss auf die übertragene Materialmenge ausübt.

Beim indirekten Nachweis des Übertrags von Fmoc-Gly-OPfp durch die Kupplung an eine Synthesoberfläche sowie einer folgenden Visualisierung der Kupplung durch Fluoreszenzmarkierung kann gezeigt werden, dass selbst bei Spothöhen unter 2 nm ausreichend Aminosäure übertragen wurde, um eine nachweisbare Kupplung zu ermöglichen. Solche Spothöhen sind durch eine direkte Untersuchung via VSI aufgrund der Auflösungsgrenze sowie der Rauheit der Substratoberfläche nicht mehr möglich. Aus diesem Grund können vor allem im Bereich niedriger Transferparameter wie 120 – 150 mW und 4.00 – 6.00 ms keine Transferspots per VSI nachgewiesen werden, während hingegen die Fluoreszenzanalyse eine Kupplung von lasertransferiertem Glycin bestätigt.

4.1.4.3. Donorbeschichtung *via* Rakeltechnik

Die individuelle Optimierung des laserinduzierten Materialtransfers zur Erzeugung definierter Schichtdicken ist ein zeit- und materialaufwendiger Prozess. Hinzu kommt, dass bei der Beschichtung der Donoren *via* Spincoating ein Großteil der Beschichtungslösung verschwendet wird, da diese beim Beschichtungsvorgang von der Oberfläche geschleudert wird und in der Regel nicht wiederaufbereitet werden kann.¹⁰²⁻¹⁰³ Des Weiteren führt die Einsparung von Transfermaterial beim Beschichtungsprozess aus Kostengründen jedoch zu einer Verringerung der maximal möglichen Spothöhe, die bei einem Lasertransfer erreicht werden kann. In vorherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die maximal mögliche Spothöhe sowohl mit der Dicke als auch der Konzentration der Donorbeschichtung korreliert. Eine Verringerung der eingesetzten Menge an Transfermaterial resultiert wahlweise in einer geringeren Dicke oder einer geringeren Konzentration der Transferschicht. Hinzu kommt, dass die Beschichtung *per* Spincoating nicht ohne weiteres skalierbar ist. Für einen weitreichenden Einsatz des nano3D-Laserdruckers kann es ggf. notwendig sein, auf größere Akzeptor- bzw. Donorformate auszuweichen. In diesem Fall müssten zumindest die Beschichtungsparameter neu ermittelt werden.

Bei der Beschichtung von Donoren *via* Rakeltechnik (s. Kap. 2.6.2.) können zahlreiche dieser Probleme umgangen werden. Zunächst wird bei der Rakelbeschichtung nur ein Bruchteil der entsprechenden Beschichtungslösung benötigt. Zur Ausbildung des Transferfilms *per* Spincoating werden in der Regel 0.50 – 1.00 ml Beschichtungslösung verwendet. Bei der Beschichtung *via* Rakel genügen hingegen 60 – 80 µl Beschichtungslösung pro Donoroberfläche. Des Weiteren wird fast das gesamte aufgebrachte Lösungsvolumen zur Ausbildung der Transferschicht verwendet. Somit wird nur ein geringer Prozentsatz des Transfermaterials verschwendet, was weiter zur besseren Effizienz der Rakelbeschichtung beiträgt. Durch eine variable Einstellung des Rakelspalts können mit dieser Technik Schichtdicken im Nano- oder Mikrometerbereich erzeugt werden.^{79, 104} Das heißt, dass durch die Verringerung des benötigten Beschichtungsvolumens die Herstellungskosten eines Donors im Vergleich zur Beschichtung *per* Spincoating um bis zu 90 % verringert werden können. Durch die einfache Skalierbarkeit der Rakeltechnik ist es außerdem möglich, eine Vielzahl an Substraten durch eine einfache Anpassung der Prozessparameter zu beschichten. In Zusammenarbeit mit Clarine Gedigk wurde der Übertrag und die Kupplung von Fmoc-Gly-OPfp unter Verwendung von gerakelten Donoren untersucht und mit dem Transferverhalten bei Verwendung von Donoren, welche über das Spin Coating-Verfahren beschichtet wurden, verglichen. Bei diesem Experiment wurde ebenfalls die Kupplung der übertragenen Aminosäure an eine Syntheseoberfläche über die Fluoreszenzfärbung mit TAMRA-NHS überprüft. Eine Analyse der übertragenen Spot-Höhen wurde *per* VSI-Messung durchgeführt.

Tabelle 5 führt erneut die normierten Spothöhen auf. Die gemessenen Werte sind im Anhang in den Tabellen 25 und 26 aufgelistet.

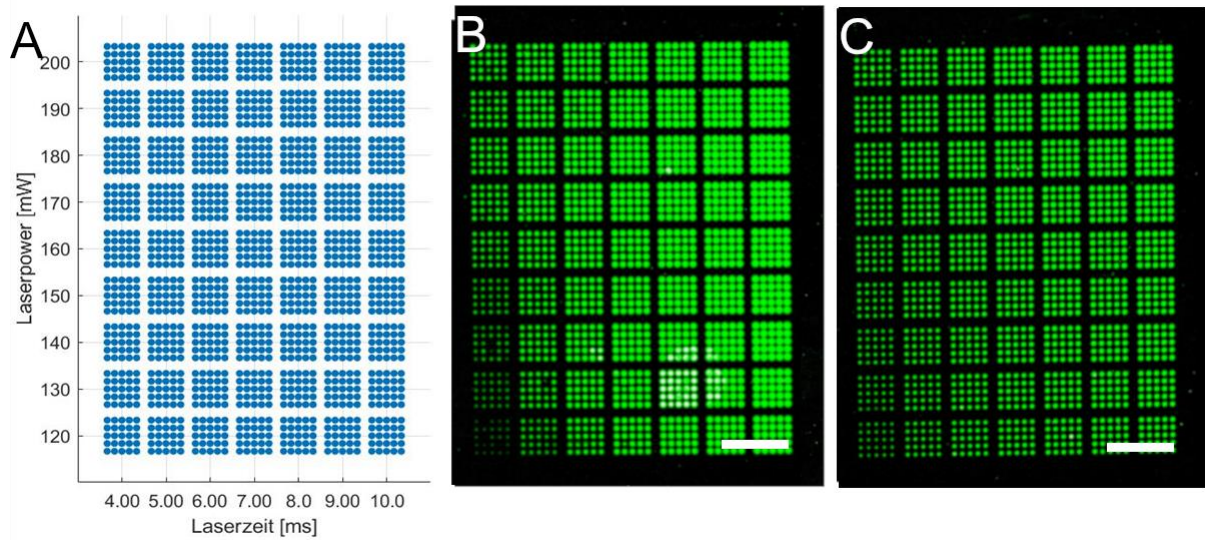


Abbildung 23: Fluoreszenzaufnahme von lasertransferiertem Fmoc-Gly-OPfp nach der Kupplung an die Syntheseeoberfläche. Färbung via TAMRA-NHS. A: Lasermuster. B: Verwendung eines Spin Coating-Donors. C: Verwendung eines gerakelten Donors. Aufnahmeparameter: Anregung: 532 nm. Emissionsfilter: 587 ± 37.5 nm. PMT: 1.0. Auflösung: 5 μ m. Maßstab: 1.50 mm.

Tabelle 5: Normierte Darstellung der gemessenen Spothöhen unter Verwendung eines per Rakeltechnik beschichteten Donors. Die Normierung erfolgte auf die entsprechenden Spothöhen des Übertrags unter Verwendung eines per Spincoating beschichteten Donors.

		Laserzeit [ms]						
		10.0	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00
Laserleistung [mW]	200	0.99	0.88	0.80	0.77	0.57	0.31	-
	190	0.95	0.80	0.84	0.71	0.49	0.25	-
	180	0.93	0.61	0.73	0.55	0.42	0.21	-
	170	0.76	0.71	0.58	0.53	0.35	0.18	-
	160	0.71	0.55	0.54	0.41	0.29	0.10	-
	150	0.57	0.47	0.46	0.32	0.15	-	-
	140	0.50	0.43	0.33	0.22	0.07	-	-
	130	0.43	0.33	0.23	0.11	-	-	-
	120	0.30	0.19	0.15	0.04	-	-	-

Der Vergleich der Fluoreszenzfärbung der lasertransferierten und gekuppelten Aminosäure zeigt keinen Unterschied der Kupplungsqualität zwischen dem Übertrag von einem per Spincoating beschichteten Donor (Abb. 23B) und einem Donor, welcher per Rakeltechnik beschichtet wurde (Abb. 23C). Im vorherigen Kapitel konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Kupplung von Aminosäuren auch bei geringen Spothöhen erfolgreich durchgeführt werden kann. Die Auswertung der VSI-Messungen zeigt, dass unter Verwendung von gerakelten Donoren dieselbe maximale Spothöhe erreicht werden kann wie bei per Spincoating beschichteten Donoroberflächen. Der Verlauf der Spothöhen bei variierenden Transferparametern zeigt einen steileren Abfall bei niedrigeren Laserleistung- oder Laserzeit-Einstellungen. Bei einer Laserzeit von 4.00 ms kann selbst bei einer Laserleistung von 200 mW kein Materialübertrag festgestellt werden. In ähnlichem Maße beträgt der Übertrag bei einer Laserleistung von 120 mW maximal 30 % des entsprechenden Übertrags des Spincoating-Donors. Allerdings kann durch die Anpassung der Laserparameter in höhere Energiebereiche (Laserleistung: 170 - 200mW, bzw. Laserzeit: 7.00 - 10.0 ms) ein vergleichbarer Materialübertrag durchgeführt werden.

Die Beschichtung einer Donoroberfläche per Rakeltechnik erlaubt vor allem bei teuren Materialien eine verschwendungsarme Herstellung der Transferschicht. Zusätzlich wird nur ein geringer Prozentsatz von etwa 5 - 10 % der Materialmenge benötigt, welche zur Beschichtung einer Donoroberfläche per Spincoating aufgewandt werden müsste. Beim Vergleich des Übertrags von gerakelten und Spincoating-Donoren zeigt sich vor allem beim Nachweis der Kupplung transferierter Aminosäuren kein qualitativer Unterschied. Ein Vergleich der Spothöhen zeigt jedoch, dass bei einer gleichen maximal erreichbaren Spothöhe der Materialübertrag unter Verwendung eines per Rakel beschichteten Donors mit sinkender Transferenergie stark abnimmt. Durch die Verwendung von höheren Transferparametern kann dennoch eine vergleichbare Spothöhe erreicht werden.

4.1.5. Wiederholter Materialtransfer

In den vorherigen Abschnitten wurde zunächst ein geeigneter Energiebereich für einen laserinduzierten Materialtransfer ermittelt. Bei der anschließenden Untersuchung der übertragenen Materialmenge wurde festgestellt, dass bei einem einmaligen Lasertransfer nur eine limitierte Menge an Material übertragen werden konnte. Dies führt dazu, dass beim Erreichen dieses Limits auch bei einer weiteren Steigerung der Transferenergie kein zusätzlicher Materialübertrag mehr stattfindet. Durch die Variation der Donorbeschichtung ist es möglich, die maximal übertragbare Materialmenge weiter zu variieren. Bei einer Veränderung der Donorbeschichtung ist dennoch darauf zu achten, dass Entmischungserscheinungen und die Ausbildung von Kristallstrukturen unterbunden werden,

um weiterhin einen homogenen Materialübertrag zu gewährleisten. Durch den wiederholten Materialtransfer auf denselben Spot war es in der Vergangenheit möglich, einzelne Materialschichten übereinander zu stapeln, was wiederum zu einer Zunahme der Materialmenge im entsprechenden Spot führte.¹² Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Donoren bis zu zehn Mal für den Transfer und die Kupplung von Aminosäuren an eine Synthesoberfläche zu verwenden.^{10, 12}

Im folgenden Experiment soll untersucht werden, ob ein wiederholter Materialübertrag unter Verwendung eines 405 nm-Lasers zu einer Zunahme der transferierten Materialmenge führt. Bei der Verwendung eines neuen Donors pro Transferschritt führt ein wiederholter Lasertransfer jedoch zu einem starken Anstieg der aufzuwendenden Zeit und Materialien, da bei einer doppelten oder dreifachen Wiederholung des Transferschrittes doppelt bzw. dreifach so viele Donoren hergestellt und beim Transferprozess ausgewechselt werden. Aus diesem Grund wurde außerdem untersucht, welchen Effekt ein wiederholter Lasertransfer von demselben Spot der Donoroberfläche ausübt. Diese Untersuchung spielt weiterhin im Hinblick auf die Wiederverwendung bzw. das Recycling von Donoroberflächen eine Rolle.

Für dieses Experiment wurde Fmoc-Gly-OPfp auf eine Glasoberfläche übertragen. Dieser Übertrag wurde in unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt, welche bei der anschließenden Auswertung per VSI miteinander verglichen wurden: Im ersten Ansatz wurde ein einfacher Lasertransfer durchgeführt. Dieser Übertrag wurde als Referenz für einen wiederholten Transfer herangezogen. Bei der Untersuchung eines mehrfachen Materialübertrags wurden zwei Fälle betrachtet. Einerseits wurde eine direkte Wiederholung der Transfervorgangs ohne den Einsatz einer neuen Donoroberfläche durchgeführt. Andererseits wurde vor dem zweiten Transferschritt die alte Donoroberfläche durch einen frischen, unbenutzten Donor ausgetauscht. Somit standen drei Ansätze zum Vergleich:

- (i) Einfacher Lasertransfer
- (ii) Doppelter Lasertransfer ohne Donorwechsel
- (iii) Doppelter Lasertransfer mit Donorwechsel

Um ein genaueres Bild des Transfers zu erhalten, wurde die in Abbildung 23A dargestellte Lasermatrix als Transfermuster gewählt. Die Ergebnisse der VSI-Messung der Ansätze (II) und (III) sind in den Tabellen 6 und 7 als normierte Werte aufgeführt. Die absoluten Ergebnisse aller Ansätze sind im Anhang in den Tabellen 19-24 dargestellt.

Tabelle 6: Schichtdickenmessung eines doppelten Lasertransfers ohne Verwendung einer neuen Donoroberfläche. Die Ergebnisse sind normiert auf die gemessenen Schichtdicken eines einfachen Lasertransfers.

mW	10 ms	9 ms	8 ms	7 ms	6 ms	5 ms	4 ms
200	1.09	1.00	1.03	1.12	1.07	0.98	1.02
190	1.03	1.04	0.84	0.99	0.85	0.76	0.51
180	1.19	0.87	1.06	0.85	0.82	0.76	0.47
170	1.09	1.03	1.10	1.14	1.01	1.15	0.81
160	1.07	1.00	1.03	0.92	1.00	0.77	-
150	0.96	0.97	1.03	1.05	0.81	0.67	-
140	0.92	0.89	1.01	0.96	0.88	0.67	-
130	1.09	1.08	1.09	0.92	0.98	0.87	-
120	1.00	1.08	1.00	0.91	0.90	-	-

Tabelle 7: Schichtdickenmessung eines doppelten Lasertransfers mit Verwendung einer neuen Donoroberfläche. Die Ergebnisse sind normiert auf die gemessenen Schichtdicken eines einfachen Lasertransfers:

mW	10 ms	9 ms	8 ms	7 ms	6 ms	5 ms	4 ms
200	1.89	1.76	1.81	2.01	1.71	1.67	1.32
190	1.91	1.79	1.93	1.98	1.76	1.44	1.55
180	2.16	1.44	1.91	1.72	1.81	1.55	1.32
170	1.91	1.87	1.90	2.19	2.04	1.85	1.78
160	2.01	1.93	2.12	1.93	2.16	2.31	2.16
150	1.81	1.97	1.97	2.04	2.05	2.28	1.50
140	1.91	1.97	1.89	1.99	1.98	1.83	-
130	2.32	2.24	2.34	2.28	2.59	3.59	-
120	2.29	2.39	2.57	2.26	3.21	2.11	-

Die Auswertung des Übertrags zeigt, dass bei einem wiederholten Lasertransfer von derselben Stelle des Donors keine Zunahme der erzeugten Spothöhe im Vergleich zu einem einfachen Transfer erreicht werden kann (Tab. 6). In diesem Fall werden dieselben Spothöhen gemessen wie bei einem einfachen Transfer. Vor allem bei Laserzeiten von 4.00 und 5.00 ms kann teilweise eine geringere Spothöhe als bei einem einfachen Transfer detektiert werden. Diese Unterschiede sind vor allem auf die relativ hohen Schwankungen des übertragenen Materials bei geringen Transferparametern zurückzuführen (vgl.: Kap. 4.1.3.). Hingegen kann bei der Verwendung einer frischen Donoroberfläche bei einem wiederholten Lasertransfer eine Verdopplung der Spothöhen gemessen werden (Tab. 7). Diese Beobachtung bestätigt einerseits die Aussage, dass es möglich ist, einzelne Materialschichten übereinander zu stapeln. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die mehrfache Verwendung derselben Donoroberfläche nicht zu einer Zunahme der übertragenen Materialmenge führt. Es wird vermutet, dass unter anderem die thermische Zersetzung der Kaptonbeschichtung während des Transferprozesses Einfluss auf die Ausbildung einer weiteren, zum Übertrag notwendigen

Hitzeblase nimmt. Beim Transferprozess kommt es außerdem zu Verformungen der Donorbeschichtung um die Transferspots von bis zu $3.00\ \mu\text{m}$, was durch eine VSI-Untersuchung der Donoroberfläche gezeigt werden kann (vgl. Abb. 24)

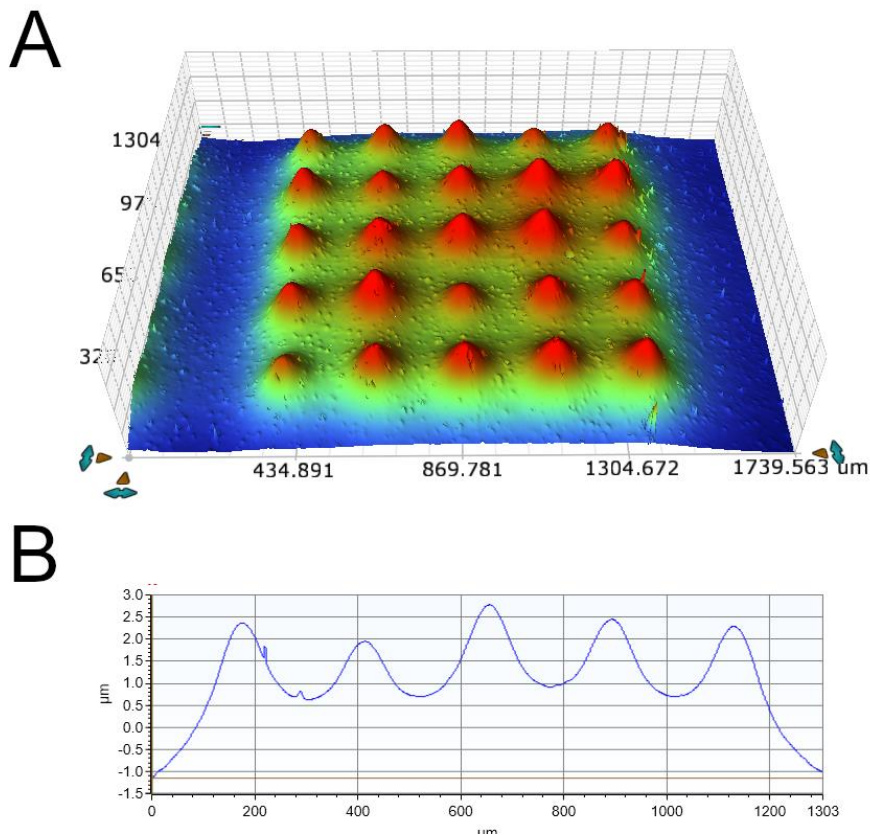


Abbildung 24: Darstellung einer VSI-Aufnahme der Kaptonbeschichtung eines Donors nach der Absorption eines Laserimpulses. A: 3D-Modell der Donorverformung. B: Höhenprofil.

Diese Deformation kann zusätzlich den wiederholten Materialübertrag behindern. Weitere Untersuchungen von nicht beschichteten Donoren zeigen außerdem, dass die Deformation auch durch die Zersetzung der Kaptonschiicht hervorgerufen wird. Das bedeutet, dass zur Wiederverwendung oder zum Recycling von Donoren weitere Anstrengungen unternommen werden müssten.

Dennoch zeigt dieser Versuch, dass es möglich ist, durch einen wiederholten Materialtransfer eine Steigerung der übertragenen Materialmenge zu erreichen. Dabei führt ein doppelter Übertrag zu einer Verdopplung der transferierten Materialmenge. Dabei muss jedoch für jede Wiederholung des Transferschritts eine neue Donoroberfläche verwendet werden. Durch das Übereinanderschichten von verschiedenen Materialien können durch dieses Prinzip gegebenenfalls definierte Reaktionsorte auf der Arrayoberfläche generiert werden. Diese Anwendung des Materialtransfers wird in Kap. 4.2. genauer untersucht.

4.1.6. Transfer verschiedener Materialien

Die Untersuchung des Übertrags von Aminosäuren bei der Herstellung von Peptidarrays hat gezeigt, dass für jede Aminosäure ein individuelles Transferverhalten nachgewiesen werden konnte. Dies zeigte sich in stark unterschiedlichen Spothöhen für verschiedene Aminosäuren bei gleichen Transferparametern. In Kap. 4.1.4. konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Donorbeschichtung einen maßgeblichen Einfluss auf die übertragene Materialmenge ausübt. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit Clarine Gedigk der Übertrag verschiedener Aminosäuren unter Verwendung von Donoren mit konstantem Gewichtsanteil der eingebetteten Aminosäure von 10 w% sowie von Donoren mit einer konstanten Stoffmenge von 30 μmol Aminosäure betrachtet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Masterarbeit von Clarine Gedigk bereits veröffentlicht.⁹⁸ Abbildung 25 zeigt beispielhaft den unterschiedlichen Höhenübertrag von verschiedenen Aminosäuren bei jeweils 170 mW Laserleistung und einer Laserzeit von 10.0 ms.

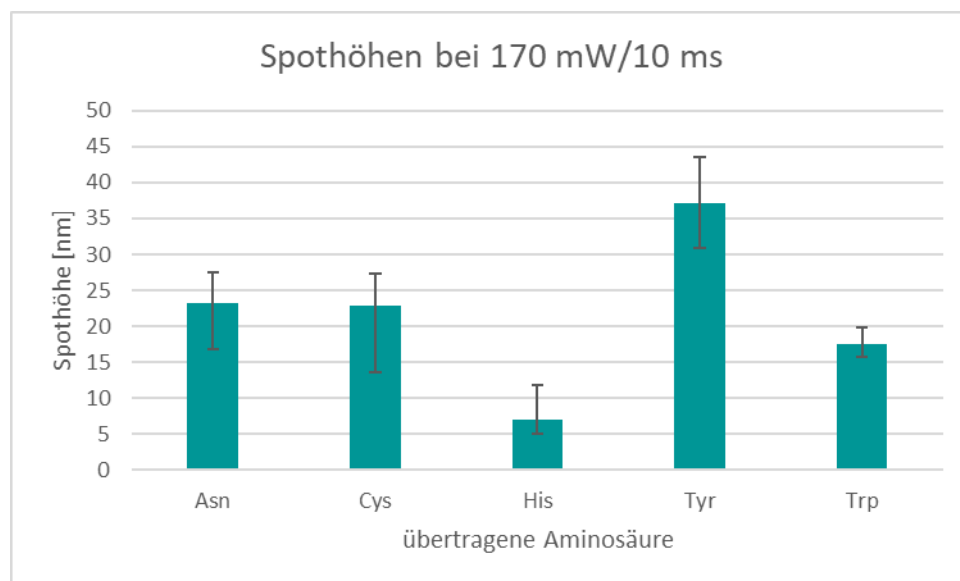


Abbildung 25: Gemessene Spathöhen verschiedener übertragener Aminosäuren bei einem Lasertransfer mit 170 mW / 10 ms. Betrachtete Aminosäuren: Fmoc-Asn(Trt)-OPfp (Asn), Fmoc-Cys(Trt)-Opfp (Cys), Fmoc-His(Trt)-Opfp (His), Fmoc-Tyr(tBu)-Opfp (Tyr) sowie Fmoc-Trp(Boc)-OPfp (Trp). Die dargestellten Daten wurden in Zusammenarbeit mit Clarine Gedigk gewonnen.⁹⁸

Die Darstellung der übertragenen Spathöhe in Abbildung 25 verdeutlicht, dass der Materialübertrag zusätzlich von verschiedenen stoffspezifischen Eigenschaften abzuhängen scheint. Aus diesem Grund wurden im folgenden Experiment verschiedene Stoffe für den Materialtransfer ausgewählt und die übertragene Spathöhe per VSI analysiert. Anschließend

wurde versucht, aufgrund verschiedener Stoffeigenschaften einen Rückschluss auf den Zusammenhang dieser Eigenschaften auf den Übertrag zu ermitteln.

Zunächst wurden hierzu diverse Stoffeigenschaften ausgewählt, die einen denkbaren Einfluss auf den laserinduzierten Materialübertrag ausüben könnten:

- (i) **Molekulargewicht:** Einerseits konnte bereits gezeigt werden, dass die übertragene Materialmenge von der (Stoffmengen-)Konzentration der Donorbeschichtung abhängt. Andererseits bedeutet die Herstellung von Donoren mit einer konstanten Stoffmengenkonzentration in der Transferschicht, dass vor allem bei Stoffen mit geringem Molekulargewicht nur geringe Materialmengen zur Donorbeschichtung verwendet werden. In Kapitel 4.1.3. wurde der Übertrag von Fmoc-Gly-OPfp **27** ausgewertet. Für den Übertrag wurde ein Donor mit 15.0 mg (32.4 μmol) Fmoc-Gly-OPfp **27** und 135 mg Transfermatrix beschichtet. Nach erfolgreichem Lasertransfer konnten maximal 620 pg der übertragenen Aminosäure in einem einzelnen Transferspot berechnet werden. Bei einem theoretischen Transfer von 24.000 Spots pro Array (Spotdichte: 16 Spots/ mm^2) entspricht dies einer übertragenen Masse von ca. 15 μg Fmoc-Gly-OPfp **27**. Diese Menge entspricht wiederum 0.1 % der zur Donorbeschichtung verwendeten Menge der Aminosäure. Bei einer Abhängigkeit des Materialtransfers vom Molekulargewicht des zu übertragenden Stoffes bedeutet dies im Umkehrschluss, dass beim Lasertransfer eines Stoffes mit einem theoretischen Molekulargewicht von 100 g/mol ein Donor mit lediglich 3.24 mg (32.4 μmol) des zu übertragenden Stoffes zu beschichten wäre. Bei einem Übertrag von 0.1 % der zur Donorbeschichtung verwendeten Menge des zu transferierenden Stoffes würden bei einer Spotdichte von 16 Spots/ mm^2 oder 24.000 Spots 3.24 μg Material übertragen. Pro Spot entspräche das einer Masse von 125 pg (22 % der übertragenen Masse von Fmoc-Gly-OPfp **27**). Das würde bedeuten, dass die von einem Stoff mit einem Molekulargewicht von 100 g/mol erzeugten Transferspots nur eine Höhe von etwa 12.9 nm erreichen würden (22 % der Spothöhe von übertragenem Fmoc-Gly-OPfp **27**).
- (ii) **(Molares) Volumen:** Beim Übertrag von verschiedenen Stoffen mit stark unterschiedlichen Volumen kann davon ausgegangen werden, dass beim Übertrag derselben Masse oder Stoffmenge des zu transferierenden Materials entsprechend unterschiedliche Spot-Volumen bzw. -Höhen generiert werden.

- (iii) **Polarität:** Die Polarität eines Stoffes beeinflusst unter anderem die Löslichkeit des Stoffes in der Beschichtungslösung bzw. der Transfermatrix. Vor allem bei der Beschichtung der Donoren zur Ausbildung des Transferfilms ist eine gute Löslichkeit des Transfermaterials in der Beschichtungslösung ausschlaggebend für einen homogenen Transferfilm. Durch eine zu hohe Konzentration des Transfermaterials in der Donorbeschichtung können Entmischungseffekte auftreten, welche die Transferqualität beeinflussen können. Diese Entmischungseffekte können außerdem vor der mikroskopisch nachweisbaren Kristallisation des in der Transferschicht eingebetteten Stoffes auftreten. Des Weiteren beeinflusst die Polarität eines Stoffes unter anderem die jeweilige Oberflächenenergie und somit die Benetzung der Akzeptoroberfläche während des Transferprozesses, bzw. die Adhäsion der übertragenen Materialien am Akzeptor bei der Rückbildung der zum Transfer notwendigen Hitzeblase.
- (iv) **Schmelzpunkt:** Die beim Transferprozess auftretende Hitze führt zu einem Übergang der Transfermatrix in einen viskosen Zustand. Über indirekte Messungen der Temperatur während der Laserabsorption konnten jedoch Temperaturen von mehreren hundert Grad Celsius nachgewiesen werden. Diese Temperaturen liegen weit über dem Glaspunkt der Transfermatrix ($T_G = 80 \text{ °C}^{95}$). Es kann angenommen werden, dass durch die bei der Laserabsorption freigesetzte Hitze auch das eingebettete Transfermaterial verflüssigt wird und so ein verstärkter Transfer erreicht werden kann. Interne, noch nicht publizierte Untersuchungen weisen zusätzlich darauf hin, dass ein Erwärmen des Akzeptors durch bspw. eine Heizplatte ebenfalls zu einem verbesserten Materialtransfer beitragen. Aus diesem Grund wurde auch der individuelle Schmelzpunkt verschiedener Materialien betrachtet.

Für den nachfolgenden Versuch wurde der laserinduzierte Übertrag von Fmoc-Gly-OPfp **27**, Fmoc-Gly-OH **28**, 4-(Diphenylamino)benzaldehyd (DiPhABA) **29** sowie 1,3-Indandion **30** auf eine Glasoberfläche bei verschiedenen Transferparametern durchgeführt und per VSI-Messung der Transferspots ausgewertet. Für den Transfer wurde ein Transferbereich bis maximal 200 mW bzw. 10 ms verwendet. Es wurden sowohl Donoren mit einem festen Gewichtsanteil von 10 w% als auch Donoren mit einer konstanten Stoffmenge von 30 μmol des Transfermaterials für den Transfer verwendet. Die Zusammensetzung der Donoren ist in Tabelle 9 aufgeführt. Nach der VSI-Analyse wurde die maximal übertragene Spothöhe ermittelt und im Hinblick auf die oben aufgeführten Eigenschaften Molekulargewicht, Volumen, Polarität

(logP) sowie Schmelzpunkt der jeweiligen Stoffe verglichen (Tab. 8). Die maximal übertragenen Spothöhen sind in Tabelle 10 und Abbildung 27 dargestellt.

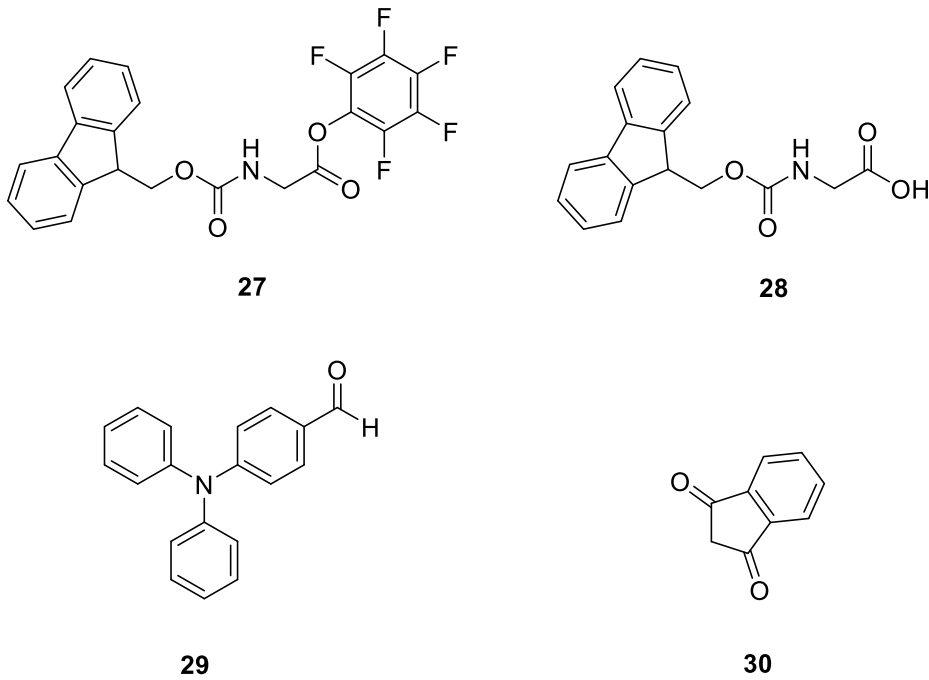


Abbildung 26: Strukturformeln der übertragenen Stoffe Fmoc-Gly-OPfp **27**, Fmoc-Gly-OH **28**, DiPhABA **29** sowie 1,3-Indandion **30**.

Tabelle 8: Vergleich ausgewählter Eigenschaften der übertragenen Stoffe.

Substanz	MW [g/mol]	Smp. [°C]	Dichte [g/ml]	logP
Fmoc-Gly-OPfp	463.35	158	1.3	5.01
Fmoc-Gly-OH	297.31	175	1.4	3.06
DPABA	273.33	126.5	1.2	5.26
1,3-Indandion	146.14	131.5	1.3	1.13

Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Donoren.

Substanz	10 w% Transfermaterial	30 µmol Transfermaterial
Fmoc-Gly-OPfp	15.0 mg/ml Fmoc-Gly-OPfp 135 mg/ml S-LEC in DCM	13.9 mg/ml Fmoc-Gly-OPfp 136 mg/ml S-LEC in DCM
	15.0 mg/ml Fmoc-Gly-OH 135 mg/ml S-LEC in DCM	8.91 mg/ml Fmoc-Gly-OH 141 mg/ml S-LEC in DCM
DPABA	15.0 mg/ml DPABA 135 mg/ml S-LEC in DCM	8.20 mg/ml DPABA 142 mg/ml S-LEC in DCM
	15 mg/ml 1,3-Indandion 135 mg/ml S-LEC In DCM	4.40 mg/ml 1,3-Indandion 145 mg/ml S-LEC In DCM

Tabelle 10: Gemessene maximale Spothöhen ausgewählter Substanzen nach erfolgtem Lasertransfer.

Substanz	Maximale Spothöhe	
	10 w%-Donoren	30 µmol-Donoren
Fmoc-Gly-Opfp	40 nm	30 nm
Fmoc-Gly-OH	30 nm	12.5 nm
DiPhABA	15 nm	7 nm
1,3-Indandion	2 nm	n. b.

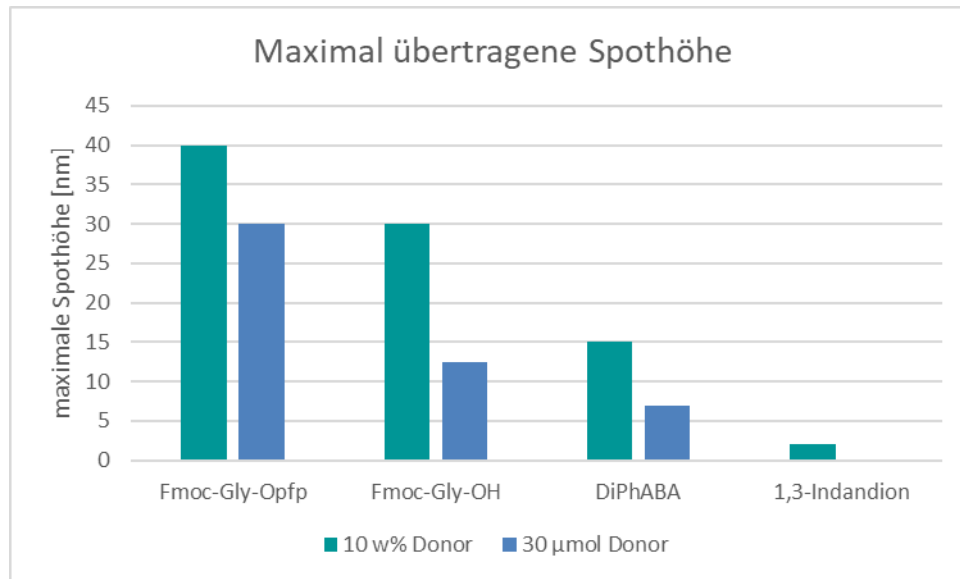


Abbildung 27: Graphische Darstellung der maximal übertragenen Spothöhe verschiedener Stoffe zur Untersuchung des Einflusses stoffspezifischer Parameter auf den laserinduzierten Materialtransfer.

Ein Vergleich des Materialtransfers verschiedener Stoffe zeigt erneut das bereits in den Kapiteln 4.1.3. und 4.1.4. sowie in Abbildung 21 beobachtete Transferverhalten. Einerseits kann bei allen Stoffen eine Proportionalität des übertragenen Materials zur Konzentration der Stoffe in der Donorbeschichtung festgestellt werden. Vor allem beim Übertrag von Fmoc-Gly-OH sowie DiPhABA wird diese Relation anschaulich verdeutlicht: Bei der Herstellung von Donoren mit einem festen Gewichtsanteil von 10 w% Transfermaterial wird etwa doppelt so viel Material verwendet wie bei der Herstellung von Donoren mit einer konstanten Stoffmengenkonzentration von 30 µmol. Eine Auswertung des Materialübertrags unter Verwendung der entsprechenden Donoren zeigt ein ähnliches Verhältnis der Spothöhen: Der Transfer von Donoren mit festem Gewichtsanteil resultiert in der annähernd doppelten Spothöhe.

Ein Vergleich des Materialtransfers in Abhängigkeit des Schmelzpunktes der jeweiligen Stoffe lässt keinen nennenswerten Einfluss der Schmelztemperatur auf die übertragene Materialmenge vermuten. Sowohl Fmoc-Gly-OH **28** als auch DiPhABA **29** weisen eine schlechtere Transferqualität als Fmoc-Gly-OPfp **27** auf, obwohl ihre Schmelzpunkte etwa in gleichem Maße über bzw. unterhalb des Schmelzpunktes von Fmoc-Gly-OPfp **27** liegen (+27 °C für Fmoc-Gly-OH **28**, bzw. -32 °C für DiPhABA **29**). Der Übertrag von 1,3-Indandion **30** bestärkt diese Annahme, da der Schmelzpunkt in diesem Fall über dem von DiPhABA **29** liegt, jedoch beim laserinduzierten Transfer von 1,3-Indandion **30** nahezu kein Übertrag festgestellt werden konnte (max. 2 nm).

Hauptteil

Ein Vergleich der Dichte-Werte der untersuchten Stoffe zeigt, dass diese in einem sehr engen Rahmen liegen (1.2-1.4 g/cm³). Das bedeutet, dass die Dichteunterschiede beim Vergleich der übertragenen Materialmenge in diesem Fall vernachlässigt werden können. Somit kann jedoch ebenfalls ein Einfluss unterschiedlicher Dichte-Werte auf die detektierte Materialmenge vernachlässigt werden. Aus diesem Grund wird auch ein Einfluss der Stoffdichte auf die Transferqualität eines Stoffes ebenfalls ausgeschlossen.

In ähnlichem Maße scheint die Polarität und somit die Mischbarkeit des zu transferierenden Stoffes mit der Beschichtungslösung des Donors bzw. dem verwendeten Matrixpolymer S-LEC nur eine untergeordnete Rolle im Transferprozess zu spielen. Ein Vergleich der übertragenen Materialmenge beim Transfer von Fmoc-Gly-OPfp **27** und DiPhABA **29** scheint nahezuzeigen, dass ein niedriger logP-Wert eine Zunahme des übertragenen Volumens begünstigt. Die Überträge von Fmoc-Gly-OPfp **27** sowie 1,3-Indandion **30** weisen hingegen einen entgegengesetzten Zusammenhang auf. In diesen Fällen wird jedoch angenommen, dass der bereits diskutierte Einfluss des Molekulargewichtes überwiegt. Generelle Voraussetzung für einen homogenen Materialtransfer ist jedoch die Mischbarkeit des zu transferierenden Stoffes mit der Transfermatrix bzw. die Löslichkeit des Transfermaterials in der Beschichtungslösung. Dementsprechend scheint die Polarität eines Stoffes die Donorherstellung in größerem Maße als den Materialtransfer zu beeinflussen.

Es stellt sich heraus, dass eine unabhängige Bewertung des Einflusses einzelner Stoffeigenschaften auf den Materialtransfer nur schwer möglich ist, da die Änderung eines einzelnen Parameters nahezu nicht erreicht werden kann. Tendenziell scheint jedoch das individuelle Molekulargewicht mit den größten Einfluss auszuüben. Ein möglicher Grund dafür wurde in den vorherigen Abschnitten bereits diskutiert. Es ist jedoch anzunehmen, dass durch die Untersuchung des Materialtransfers zahlreicher Substanzen in diversen Anwendungsfeldern des nano3D-Laserdruckers, wie bspw. der kombinatorischen Chemie oder Materialforschung, einzelne Stoffeigenschaften definiert werden können, die klar den Materialtransfer beeinflussen. Bis dahin muss der Transfer einzelner Stoffe individuell optimiert werden, sofern bei der entsprechenden Anwendung bestimmte Spothöhen erreicht werden müssen.

4.2. Kombinatorische Fluorophor-Synthese *via* laserinduzierten Materialtransfer

4.2.1. Vorarbeiten

In der Vergangenheit wurde das nano3D-Lasersystem überwiegend zur Herstellung von Peptid Arrays verwendet. Dabei wurden Fmoc-geschützte Aktivester diverser Aminosäuren nacheinander auf eine funktionalisierte Oberfläche übertragen. Durch die Inkubation im Ofen wird die Transfermatrix viskos und erlaubt die Diffusion und Kupplung der übertragenen Aminosäuren an die Syntheseoberfläche (Abb. 28). Während der Kupplung dient die viskose Transfermatrix zusätzlich als Lösungsmittel der Reaktion. Nach der Anknüpfung der Aminosäuren wird die Oberfläche gewaschen, wobei nicht reagierte Reaktionsbausteine entfernt werden. Nach einer Acetylierung und Entfernung der Fmoc-Schutzgruppen kann so ein neuer Kupplungszyklus gestartet werden.

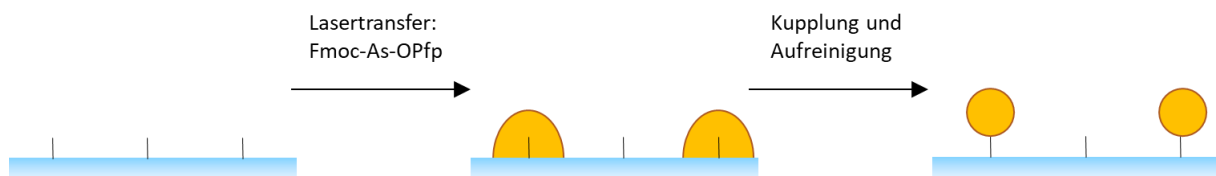


Abbildung 28: Lasertransfer und Kupplung aktivierter Aminosäuren zur Herstellung eines Peptidarrays.

Zusätzlich zur Array-Synthese durch aktivierte Aminosäuren, konnte außerdem die Kupplung von nicht-aktivierten Aminosäuren gezeigt werden. In diesem Fall wurden die entsprechenden Aminosäuren sowie verschiedene Kupplungsreagenzien wie bspw. DIC **5** und HOBt **12** schrittweise übereinandergeschichtet. Während der Inkubation der Oberfläche konnten die entsprechenden Moleküle durch die einzelnen Transferschichten diffundieren und miteinander reagieren, wodurch die Kupplung der Aminosäure an die Syntheseoberfläche ermöglicht wurde. Im Anschluss wurde die Oberfläche ebenfalls über Waschschrte aufgereinigt (Abb. 29).

Hauptteil

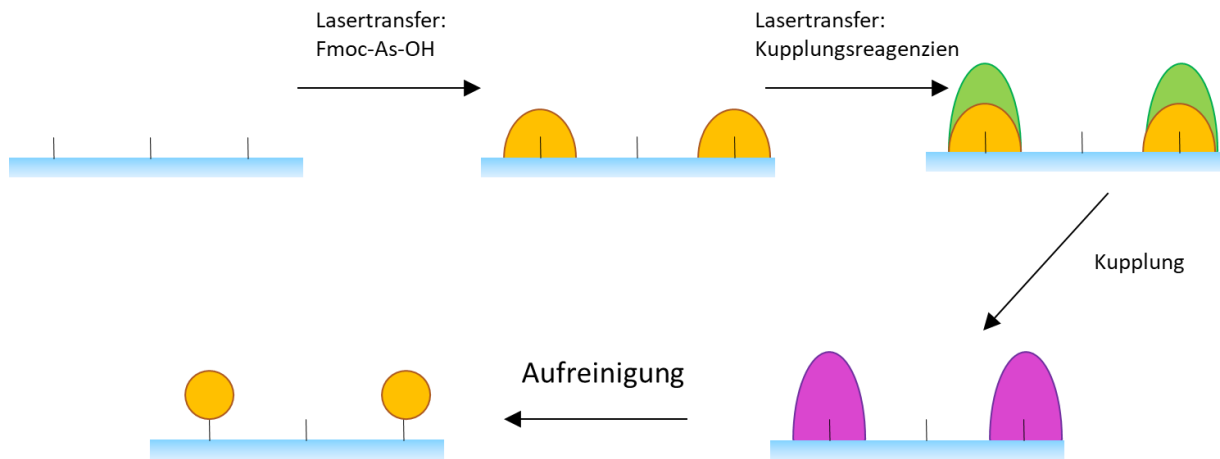
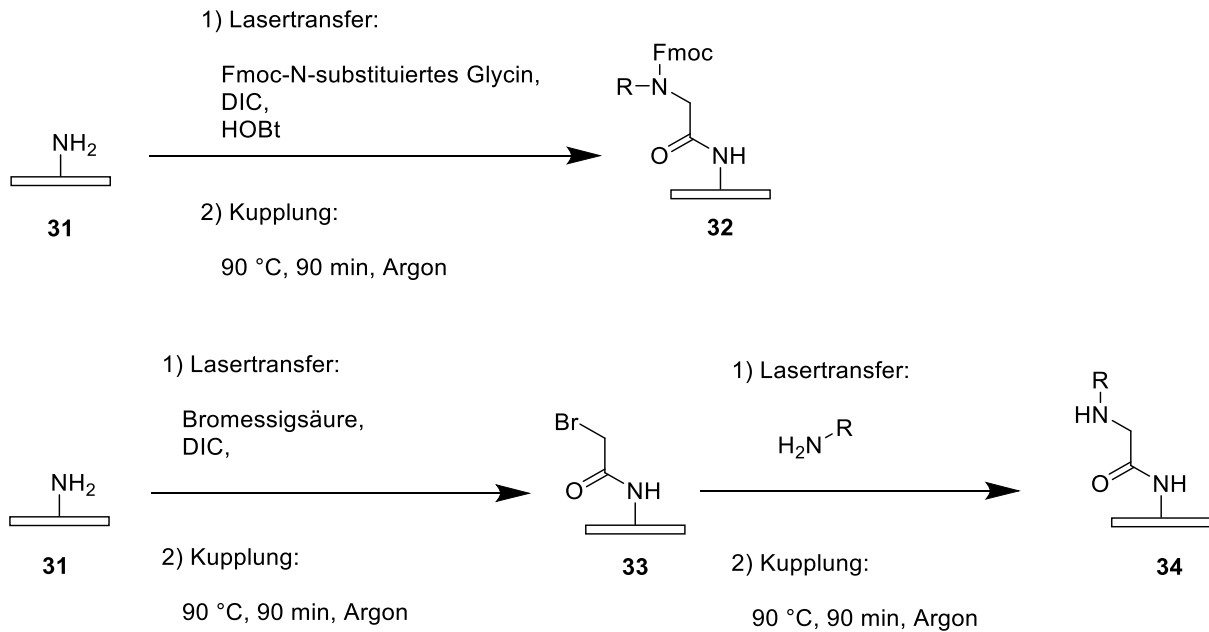


Abbildung 29: Lasertransfer und Kupplung nicht-aktivierter Aminosäuren zur Herstellung eines Peptidarrays durch den zusätzlichen Transfer von Aktivierungsreagenzien.

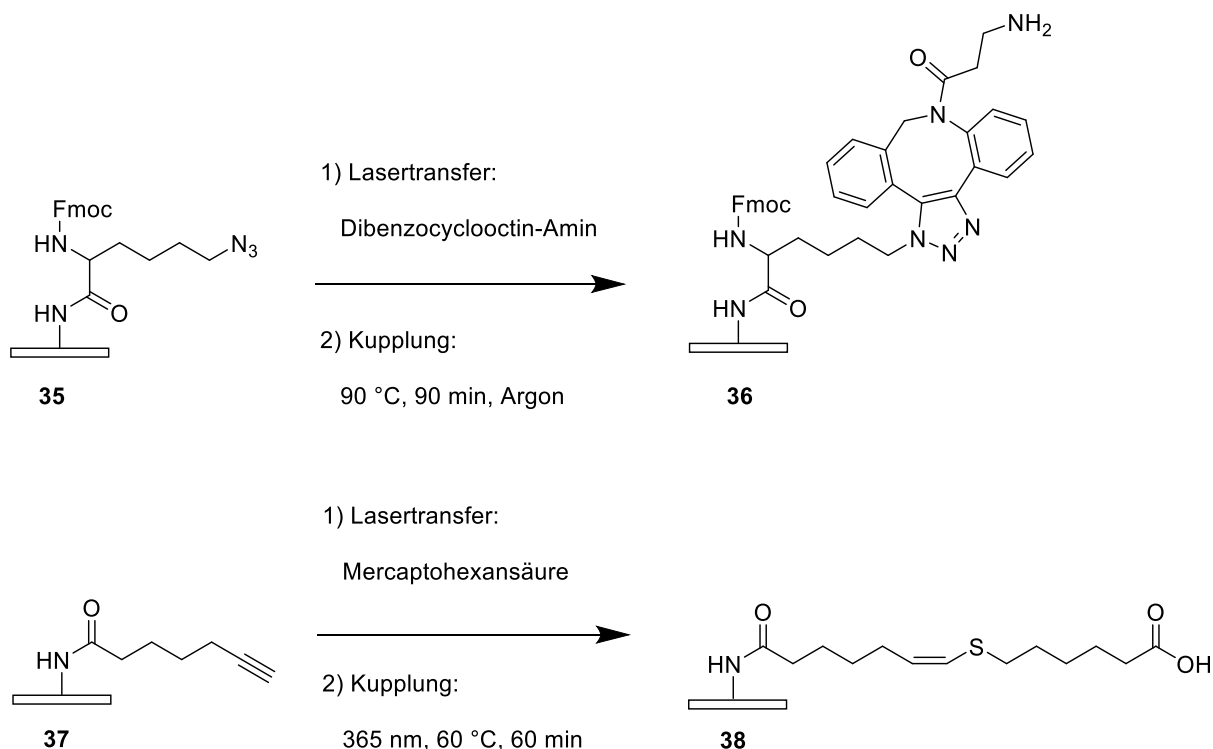
Peptidomimetika wie Peptide, *N*-substituierte Polyglycine, konnten ebenfalls unter Verwendung des Lasersystems synthetisiert werden.⁷⁰ Peptide werden überwiegend auf zwei Wegen hergestellt. (s. Schema 6). Die Monomer-Methode verläuft analog zur Peptidsynthese. Jedoch werden bei der Synthese von Peptoiden statt Aminosäuren *N*-substituierte Glycine als Bausteine verwendet. Durch ihre breite kombinatorische Vielfalt wird oftmals die Submonomer-Methode zur Herstellung von Peptoiden verwendet. Dabei wird zunächst der *N*-Terminus des Rückgrats durch Bromessigsäure acyliert. Anschließend wird ein primäres Amin über eine nucleophile S_N2 -Substitution angeknüpft.¹⁰⁵ Beide Synthesewege konnten von Daniela Mattes in Zusammenarbeit mit Bettina Streit und Juliane Greifenstein am Lasersystem erfolgreich verifiziert werden.^{11, 70, 92}



Schema 6: Laserunterstützte Peptidsynthese via Monomer-Methode sowie via Submonomer-Methode.^{11, 92}

Nachdem gezeigt wurde, dass mit dem nano3D-Laserdrucker auch weitere, komplexere Reaktionen außer der Kupplung von OPfp-aktivierten Aminosäuren erfolgreich durchgeführt werden können, wurde das Anwendungsspektrum des Lasersystems erweitert. Unter anderem konnten verschiedene Click-Reaktionen wie die *Strain promoted Alkyne Azide Cycloaddition* (SPAAC) als auch die Thiol/-in-Reaktion erfolgreich via laserinduzierten Materialtransfer durchgeführt werden.¹¹ Bei der SPAAC-Reaktion wurde zunächst ein Fmoc-geschütztes ϵ -azido-Lysin an einer Syntheseoberfläche immobilisiert. Via Lasertransfer wurde ein Dibenzocyclooctin-Amin übertragen und über Hitze gekuppelt. Zum Nachweis der Thiol/-in-Reaktion wurde Mercaptohexansäure auf oberflächengebundene Heptinsäure transferiert. Die Kupplung erfolgte bei 60 °C und unter Bestrahlung durch UV-Licht (365 nm). Beide Reaktionen konnten über Fluoreszenzfärbung oder massenspektroskopisch verifiziert werden.

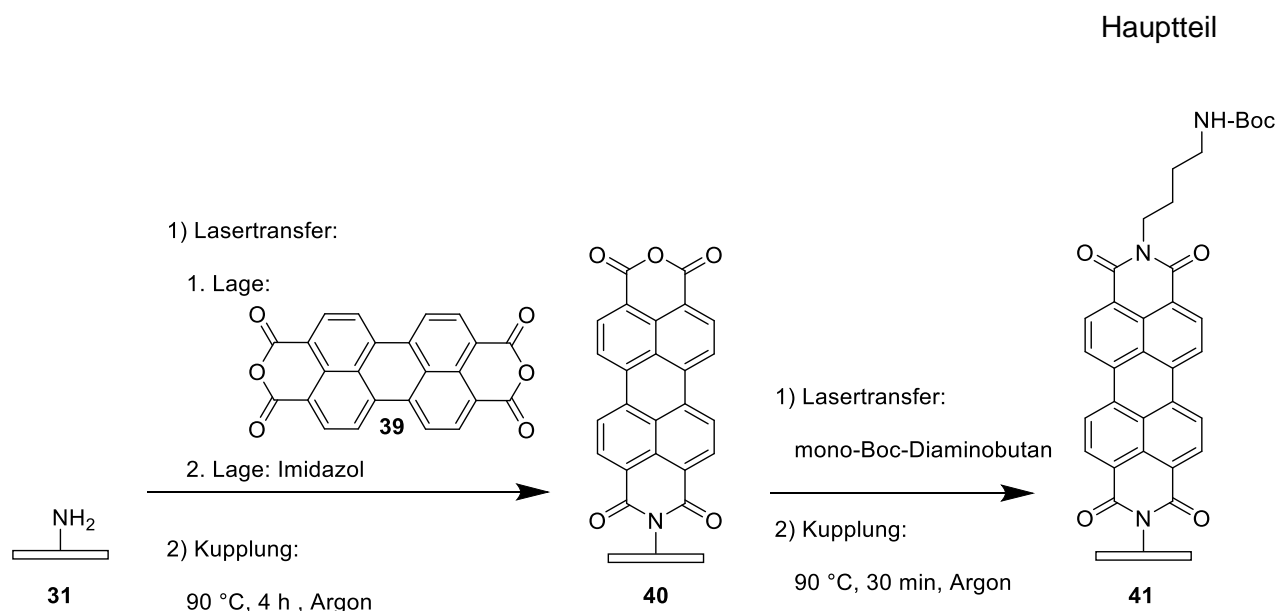
Hauptteil



Schema 7: Durchführung verschiedener Click-Reaktionen unter Verwendung des Lasersystems. Oben: SPAAC durch Lasertransfer und Kupplung eines Dibenzocyclooctin-amins auf einer Azid-funktionalisierten Oberfläche. Unten: Thiol-in-Reaktion durch Lasertransfer und UV-induzierte Kupplung von Mercaptohexansäure an eine Alkinoberfläche.

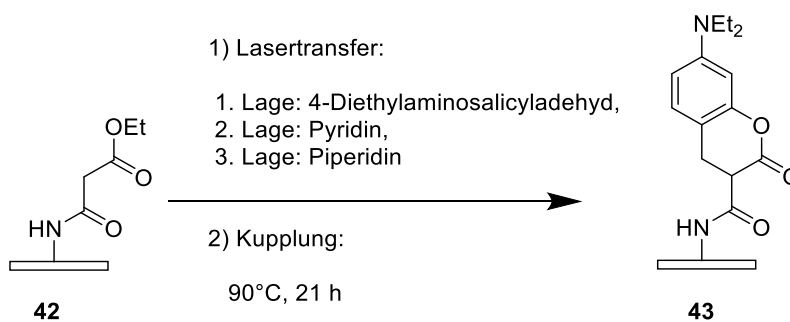
Als Nachweis der durchgeführten Reaktionen diente in vielen Fällen die selektive Kupplung von Fluorophoren an entsprechende reaktive Gruppen des gebildeten Produkts. Dabei konnte oftmals eine starke, unspezifische Einlagerung der verwendeten Fluorophore in den Polymerfilm der verwendeten Syntheseoberfläche festgestellt werden, was zu zahlreichen Fehlsignalen führen konnte. Für einen selektiven Reaktionsnachweis in einzelnen Spots wurde außerdem der Transfer und die Kupplung von Fluorophoren per Lasertransfer untersucht. Hier konnte ebenfalls eine unspezifische Einlagerung der übertragenen Fluorophore in den Polymerfilm der Syntheseoberflächen beobachtet werden. Um das Hintergrundsignal dieser eingelagerten Moleküle zu reduzieren, wurde untersucht, ob es möglich ist, die Fluorophore *in situ* durch den Transfer der jeweiligen Edukte auf der Oberfläche zu synthetisieren. Diese Synthese konnte von Daniela Mattes anhand eines Perylen-basierten Fluorophors **41**, sowie eines Coumarin-basierten Fluorophors **43** gezeigt werden.

Durch den Transfer von Perylen-3,4,9,10-tetracarboxylicdianhydrid **39** und Imidazol auf eine Amino-funktionalisierte Syntheseoberfläche war es möglich, ein oberflächengebundenes Fluorophor **40** zu synthetisieren (Schema 8) und die Synthese per Fluoreszenz sowie Massenspektroskopisch zu verifizieren.



Schema 8: Laserunterstützte Synthese des Perylen-basierten Fluorophors **41**.

Des Weiteren konnte die Synthese eines Coumarin-basierten Fluorophors **43** verifiziert werden. Für diese Reaktion wurden 4-Diethylaminosalicylaldehyd, Pyridin und Piperidin auf eine Synthesoberfläche übertragen, die zuvor per mono-Ethylmalonat funktionalisiert wurde (Schema 9). Durch eine KNOEVENAGEL-Kondensation und eine nachfolgende Umlagerung konnte so das an der Oberfläche immobilisierte Produkt **43** erhalten werden. Die Verifizierung des Syntheseproduktes erfolgte anhand der detektierten Fluoreszenz.



Schema 9: Laserunterstützte Synthese des Coumarin-basierten Fluorophors **43**.

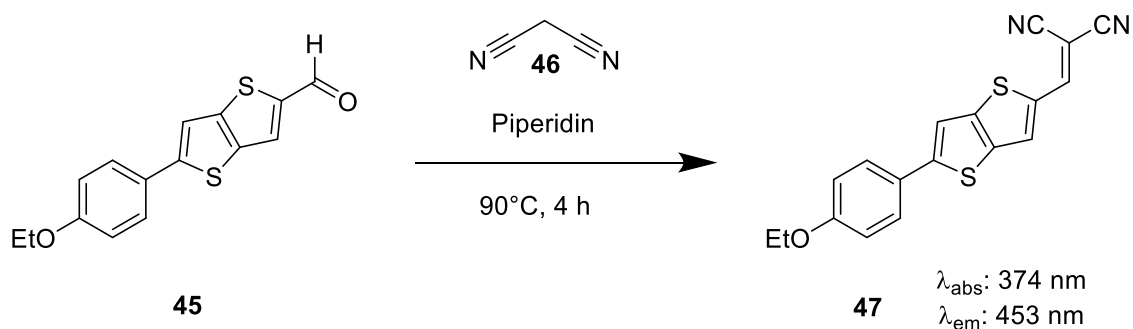
Hauptteil

Beim Transfer von besonders großen bzw. elektronenreichen Molekülen wie bspw. Fluorophoren konnte, wie bereits erwähnt, in zahlreichen Fällen eine unspezifische Einlagerung in die Syntheseoberfläche festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass diese Moleküle durch die massive Einschränkung ihrer Diffusionsmöglichkeiten auch nicht mehr, oder nur begrenzt an entsprechenden Reaktionen teilnehmen können. In Anbetracht der geringen übertragenen Materialmenge kann dies bedeuten, dass die Einlagerung von Reaktionsbausteinen zur falschen Annahme führt, dass bestimmte Reaktionen nicht mit dem nano3D-Laserdrucker durchführbar sind, obwohl prinzipiell ausreichend Moleküle übertragen wurden.

Aus diesem Grund untersuchte Robin Rastetter im Rahmen seiner Masterarbeit, ob chemische Synthesen via laserinduzierten Materialtransfer auch ohne aufwendig funktionalisierte Syntheseoberflächen durchführbar sind.¹⁰⁶ Für seine Versuche verwendete er lediglich Glasobjektträger, welche zuvor per Sauerstoff-Plasma gereinigt und aktiviert wurden, ohne dass die gebildeten Reaktionsprodukte an der Oberfläche immobilisiert werden konnten. Diese Wahl der Arrayoberfläche hat verschiedene Vorteile. Einerseits werden vor allem große und sterisch anspruchsvolle Moleküle nicht zusätzlich durch die Oberflächenfunktionalisierung in ihrer Diffusion eingeschränkt. Außerdem ist der Syntheserfolg auf funktionalisierten Oberflächen stets von der Qualität und der Beladung der Funktionalisierung abhängig. Bei den zuvor verwendeten NH_2 - β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMAoberflächen konnte aufgrund des aufwendigen Syntheseprotokolls in der Regel eine Schwankung der Beladung von 0,50 – 1,00 nmol/cm² festgestellt werden.¹¹ In einzelnen Fällen konnte die Oberflächenqualität durch die Ausbildung von Multilagern während der Herstellung zusätzlich stark schwanken.

In Zusammenarbeit mit Robin Rastetter konnten zwei Fluorophore erfolgreich mithilfe des Lasersystems synthetisiert werden.¹⁰⁶ Für die Synthese wurden die benötigten Edukte nacheinander auf eine Glasoberfläche übertragen und durch die Inkubation des Arrays im Ofen miteinander zur Reaktion gebracht. Der Reaktionsnachweis erfolgte anschließend anhand der detektierten Fluoreszenz. Um eine mögliche Fluoreszenz der übertragenen Edukte (z.B. durch Wechselwirkungen mit der Transfermatrix) ausschließen zu können, wurden die Edukte zusätzlich separat übertragen. Die von Rastetter durchgeführten Reaktionen erfolgten via Lasertransfer unter Verwendung eines 532 nm Lasers.

Die basenkatalysierte Synthese von 2-((5-(4-Ethoxyphenyl)thieno[3,2-b]thiophen-2-yl)methylen)malononitril **46** konnte durch den laserinduzierten Transfer von 5-(4-(Ethoxy)phenyl)thieno[3,2-b]thiophen-2-carbaldehyd **45**, Malononitril **46** und Piperidin gezeigt werden (Schema 10). Der Fluoreszenz-Scan zum Nachweis des gebildeten Produkts ist in Abbildung 30 dargestellt.



Schema 10: Laserunterstützte Synthese von 2-((5-(4-Ethoxyphenyl)thieno[3,2-b]thiophen-2-yl)methylen)malononitril **47** sowie die Absorptions- und Emissionswellenlängen des gebildeten Produkts.¹⁰⁷

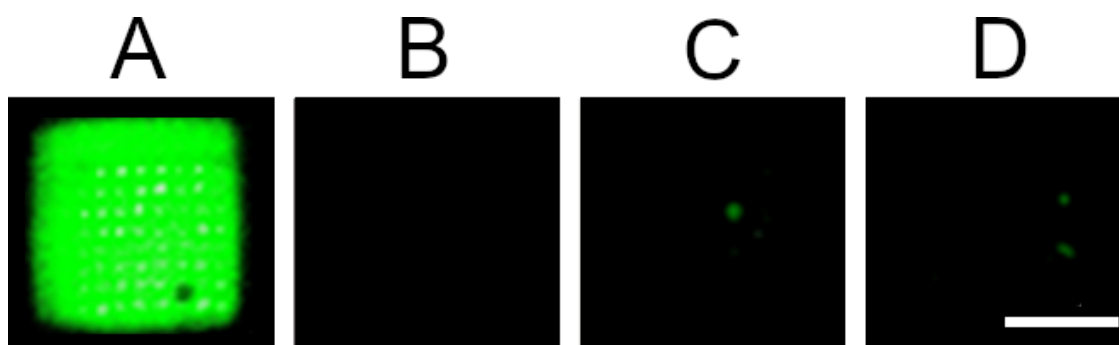
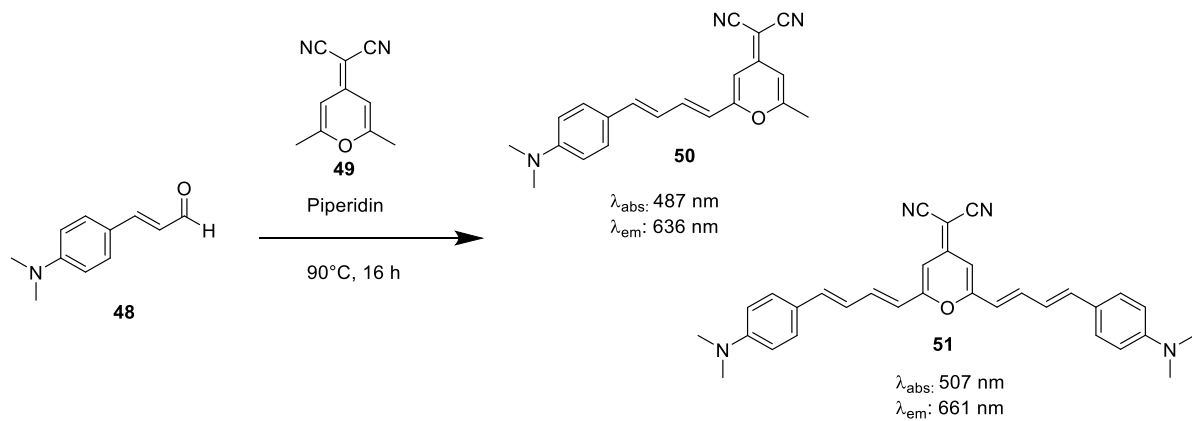


Abbildung 30: Fluoreszenz-Scan einer laserunterstützten Synthese von 2-((5-(4-Ethoxyphenyl)thieno[3,2-b]thiophen-2-yl)methylen)malononitril **47** auf einer Glasoberfläche. Als Kontrolle wurden die verwendeten Edukte zusätzlich separat übertragen. A) Produkt **47**. B) Piperidin, C) Malononitril **46**. D) Aldehyd **45**. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm. Emissionsfilter: 582±37,5 nm. PMT: 5,0. Auflösung: 1 µm. Maßstab: 250 µm.¹⁰⁶

Des Weiteren wurde die Reaktion von 2-(2-Methyl-4H-Chromen-4-yliden)malononitril **49** und (E)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acrylaldehyd **48** untersucht (Schema 11). Bei der Analyse dieser Reaktion zeigte sich, dass die Auswertung über eine Fluoreszenzuntersuchung nur begrenzt als Reaktionsnachweis geeignet ist. Bei dieser Reaktion entsteht ein Gemisch der Produkte **50** und **51**, welche durch ihre ähnlichen Emissionswellenlängen bei einem Fluoreszenz-Scan nicht zu unterscheiden sind¹⁰⁸. Zwar kann ein genereller Reaktionsnachweis erbracht werden, jedoch kann ohne zusätzliche Analysemethoden keine klare Aussage über die gebildeten Produkte getroffen werden (Abbildung 31).

Hauptteil



Schema 11: Laserunterstützte KNOEVENAGEL-Kondensation von 2-(2-Methyl-4H-Chromen-4-yliden)malononitril **49** und (E)-3-(4-(Dimethylamino)phenyl)acrylaldehyd **48**.¹⁰⁶

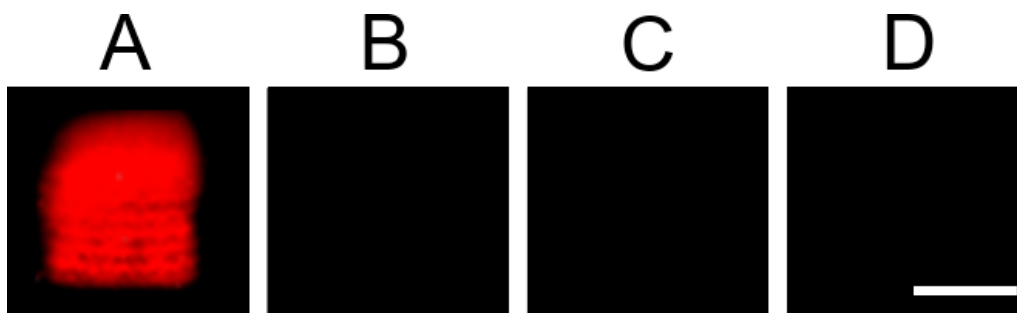
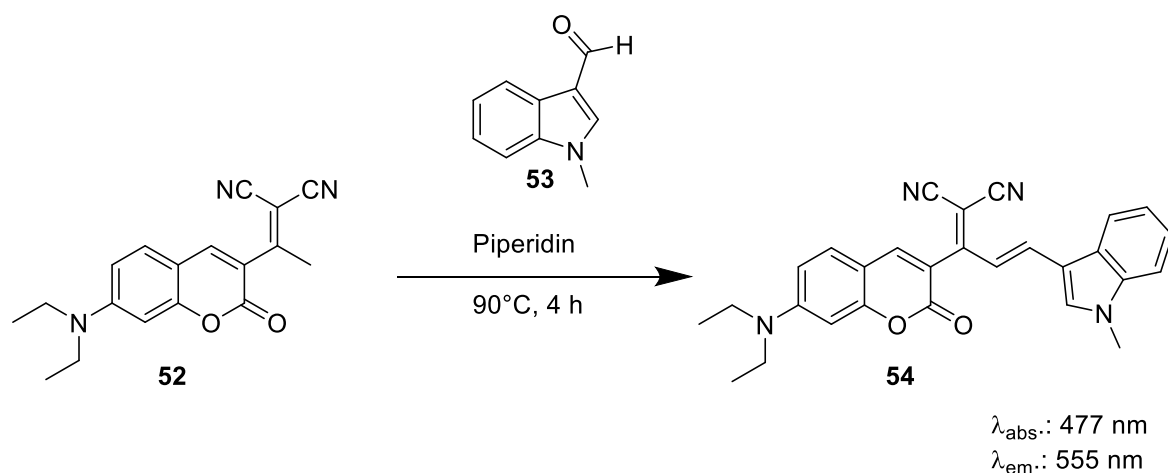


Abbildung 31: Fluoreszenz-Scan einer laserunterstützten Synthese der Fluorophore **50** und **51** auf einer Glasoberfläche. Als Kontrolle wurden die verwendeten Edukte zusätzlich separat übertragen. A) Synthesepot. B) Piperidin, C) Nitril **49**. D) Aldehyd **48**. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm. Emissionsfilter: 677±22 nm. PMT: 5,0. Auflösung: 1 µm. Maßstab: 250 µm.¹⁰⁶

Neben der erfolgreichen Synthese der Fluorophore **47** und **50** (bzw. **51**) wurde auch die Synthese von (E)-2-(1-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-Chromen-3-yl)-3-(1-methyl-1H-indol-3-yl)allyliden)malononitril **54** über eine Kondensationsreaktion aus einem Coumarin-Derivat **52** und 1-Methyl-1H-indol-3-carbaldehyd **53** untersucht (Schema 12). Die entsprechende Fluoreszenzaufnahme ist in Abbildung **32** dargestellt.



Schema 12: Laserunterstützte Synthese von (E)-2-(1-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-3-(1-methyl-1H-indol-3-yl)allylidene)malononitril **54** mit den entsprechenden Absorptions- und Emissionswellenlängen des Reaktionsprodukts.

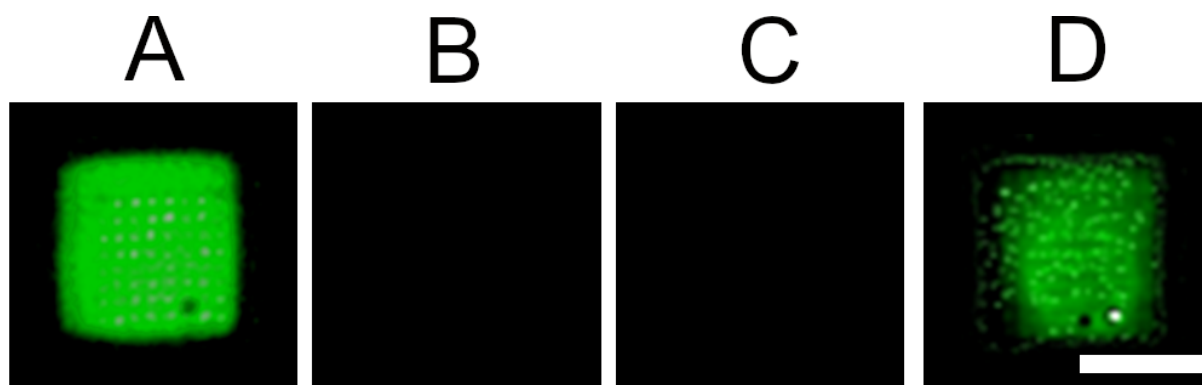


Abbildung 32: Fluoreszenz-Scan einer laserunterstützten Synthese des Fluorophors **54** auf einer Glasoberfläche. Als Kontrolle wurden die verwendeten Edukte zusätzlich separat übertragen. A) Produkt **54**. B) Piperidin, C) Nitril **52**. D) Aldehyd **53**. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm. Emissionsfilter: $582 \pm 37,5 \text{ nm}$. PMT: 5,0. Auflösung: $1 \mu\text{m}$. Maßstab: $250 \mu\text{m}$.¹⁰⁶

Bei diesem Reaktionsansatz konnte bereits beim Übertrag des Coumarin-Edukts eine starke Fluoreszenz im betrachteten Wellenlängenbereich ($549,5 - 624,5 \text{ nm}$) festgestellt werden. Durch die Fluoreszenz des Edukts konnte ohne weitere Analyse keine Aussage über den Erfolg der Reaktion getroffen werden (s. Abb. 32D). Aus diesem Grund ist es wichtig, bei einem Reaktionsnachweis über Fluoreszenzanalyse die eingesetzten Edukte ebenfalls separat zu betrachten.

4.2.1.1. Reaktionsanforderungen

Bei einer chemischen Synthese, welche ähnlich einem Droplet-Array ohne die Immobilisierung der (Zwischen-) Produkte an einer festen Phase im Array-Format durchgeführt werden soll, werden verschiedene Anforderungen gestellt:

Zunächst muss es möglich sein, die Reaktion ohne zusätzliche Wasch- oder Aufreinigungsschritte durchzuführen. Beim Benetzen der Arrayoberfläche mit Lösungsmitteln werden sämtliche Moleküle auf der Arrayoberfläche gelöst und heruntergewaschen. Sogenannte Eintopf- oder *One-Pot*-Synthesen erfüllen diese Anforderung. Bei diesen Reaktionen werden sämtliche Edukte gemeinsam in ein Reaktionsgefäß gegeben und zur Reaktion gebracht. Bei *One-Pot-multiple-Steps*-Synthesen werden die Produkte über eine mehrstufige Synthese, jedoch ohne Aufreinigung der Zwischenprodukte hergestellt.¹⁰⁹ Ein Beispiel für eine solche Reaktion ist die Synthese von Bordipyromethan-basierten Fluorophoren (BODIPYs)¹¹⁰⁻¹¹².

Für eine schnelle und zuverlässige Auswertung hochdichter Arrays hat sich die Fluoreszenzanalyse bewährt. Beispielsweise kann die Synthese von Peptidarrays schnell über Antikörperfärbung oder Fluoreszenzmarkierung bestimmter funktioneller Gruppen verifiziert werden. Aus diesem Grund eignet sich vor allem die Synthese von Fluorophoren zur Herstellung von anknüpfungsfreien, kombinatorischen Molekülarrays via Lasertransfer. Das bedeutet, dass die via Materialtransfer hergestellten Reaktionsprodukte fluoreszierende Eigenschaften besitzen müssen. Die eingesetzten Edukte hingegen dürfen zu einer Unterscheidung zu möglichen Produkten keine oder eine von der Produktfluoreszenz stark verschiedene Eigenfluoreszenz aufweisen.

Idealerweise werden Reaktionen gewählt, welche präferiert in einem Temperaturbereich von 80-120 °C durchgeführt werden können. Diese Temperatur muss während der Reaktionsphase der Oberflächen erreicht werden, damit das Matrixpolymer viskos werden kann und eine Durchmischung der Materialschichten ermöglicht wird.

Durch die Untersuchung zahlreicher Reaktionen und dafür übertragener Edukte konnte Daniela Mattes verschiedene Bedingungen definieren, welche für die Synthese von homogenen Molekülarrays erfüllt werden müssen¹¹:

- (i) Die verwendeten Edukte müssen bei den entsprechenden Transferbedingungen stabil sein. Vor allem bei hitzeempfindlichen Stoffen muss aus diesem Grund die Stabilität überprüft werden. Wasser- und sauerstoffempfindliche Stoffe werden durch die Einbettung in die Transfermatrix vermutlich zu einem gewissen Grad geschützt, doch auch bei solchen Stoffen muss zunächst ein Transfer getestet werden.
- (ii) Es muss möglich sein, die Stoffe in ausreichender Menge in der Beschichtungslösung zu Donorherstellung zu lösen. Das heißt, dass

überwiegend stark polare Stoffe nicht zur Herstellung von Donoren unter Verwendung von S-LEC als Transfermatrix geeignet sind.

- (iii) Bei Flüssigkeiten oder Stoffen mit Siedepunkten unterhalb der Glasübergangstemperatur des Matrixpolymers muss von einer Kontamination der Nachbarspots ausgegangen werden. Des Weiteren kommt es bei diesen Stoffen zu einer Konzentrationsabnahme bei langen Kupplungszeiten durch einen Übergang in den Gaszustand.

Die bisherigen Synthesen wurden stets unter Verwendung eines Lasers der Wellenlänge 532 nm durchgeführt. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Verwendung eines OLED-Lasers der Wellenlänge 405 nm aufgrund der geringeren Schwankung der Laserleistung zu einem homogeneren Übertrag sowie zu einer geringeren Varianz der Spotdurchmesser führt. Des Weiteren wurde bei verschiedenen Reaktionsansätzen angenommen, dass eine bessere Absorption des Laserimpulses unter anderem dazu führt, dass der Transfer bei geringeren Laserenergien durchgeführt werden kann¹². Dies hätte zur Folge, dass empfindliche Materialien in höherem Maße ohne Verlust ihrer Funktionalität übertragen werden können.^{12, 113} Nachdem die generelle Durchführbarkeit einer anknüpfungsfreien chemischen Synthese sowie die Nachweisbarkeit gebildeter Reaktionsprodukte in Zusammenarbeit mit Robin Rastetter gezeigt werden konnten, soll dieses Verfahren in den folgenden Kapiteln auf ein Lasersystem mit der Wellenlänge 405 nm übertragen und optimiert werden.

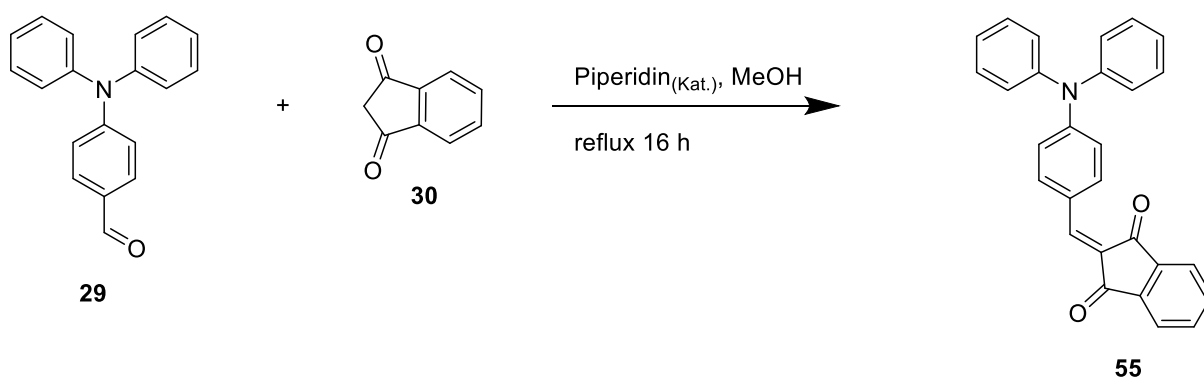
4.2.2. Synthese der Referenzfluorophore

Wie bereits gezeigt werden konnte^{11, 106} eignet sich besonders die Synthese von Fluorophoren für einen Nachweis laserunterstützter Synthesen mithilfe des nano3D-Lasersystems. Bei diesen Synthesen kann die Bildung des Reaktionsproduktes indirekt anhand der auftretenden Fluoreszenz verifiziert werden. Die Analyse der Syntheseoberflächen mithilfe von Fluoreszenz-Scannern ermöglicht es durch die Auswahl bestimmter Emissionsfilter den betrachteten Emissionswellenlängenbereich entsprechend einzuschränken, jedoch können keine exakten Fluoreszenz-Spektren erstellt werden. Somit ist die Unterscheidung verschiedener Reaktionsprodukte in manchen Fällen dahingehend erschwert, dass verschiedene Fluorophore ähnliche spektroskopische Eigenschaften besitzen und aus diesem Grund mit denselben Scanning-Parametern detektiert werden können.

Für die Auswahl einer Referenz-Reaktion zum Nachweis der Synthese bzw. zur Optimierung der Syntheseparameter ist es daher notwendig, dass das hergestellte Syntheseprodukt im

Hauptteil

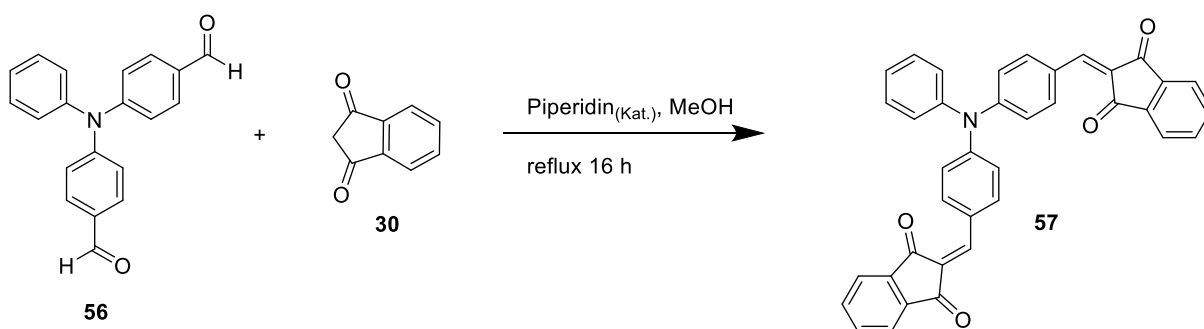
Fluoreszenz-Scan detektiert werden kann, während die eingesetzten Edukte keine Fluoreszenz im betrachteten Wellenlängenbereich aufweisen. Für diesen Nachweis wurde 2-(4-(Diphenylamino)benzyliden)-1,3-Indandion (DiPhABI) **55** über eine KNOEVENAGEL-Kondensation aus 4-(Diphenylamino)benzaldehyd (DiPhABA) **29** und 1,3-Indandion **30** in Flüssigphase hergestellt. Bei der Synthese von DiPhABI **55** wurden die Edukte gemäß literaturbekannten Protokollen¹¹⁴ unter Einsatz von Piperidin als Katalysator in Methanol umgesetzt. Durch Abfiltrieren des entstandenen Niederschlags konnte DiPhABI **55** mit einer Ausbeute von 83 % erhalten werden. (Schema 13).



Schema 13: Synthese von DiPhABI **55**

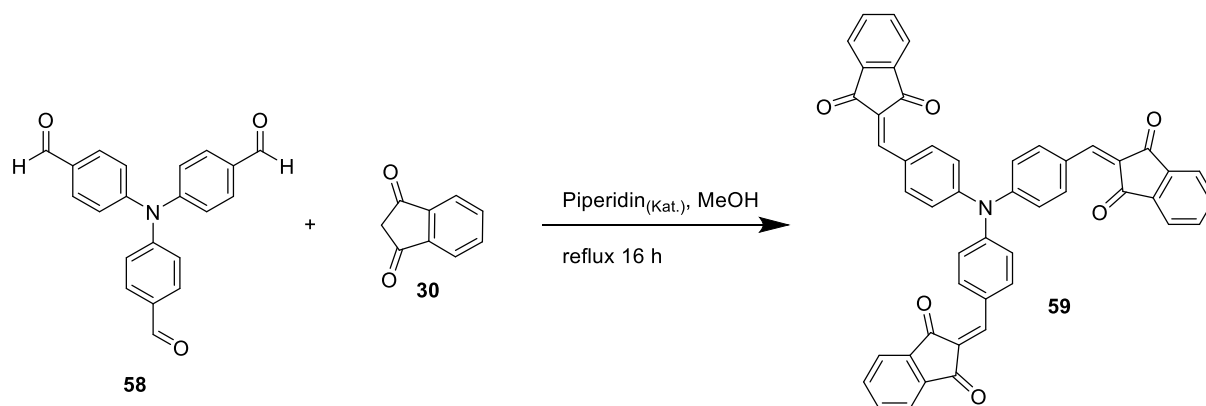
Zusätzlich zur Synthese von DiPhABI **55** wurden die Fluorophore Di(4-((1,3-Indandion-2-ylidene)methyl)phenyl)phenylamin (PhADiBI) **57**, Tri(4-((1,3-Indandion-2-ylidene)methyl)phenyl)amin (ATriBI) **59** und 4-(Dibromphenylamino)benzaldehyd (DiBrPhABA) **61** hergestellt.

Für die Synthese von PhADiBI **57** wurde 4,4'-Diformyltriphenylamin **56** mit 1,3-Indandion **30** und Piperidin in Methanol umgesetzt. Das bei der Reaktion ausfallende Produkt wurde abfiltriert. Die Reaktionsausbeute betrug 60 % (Schema 14).



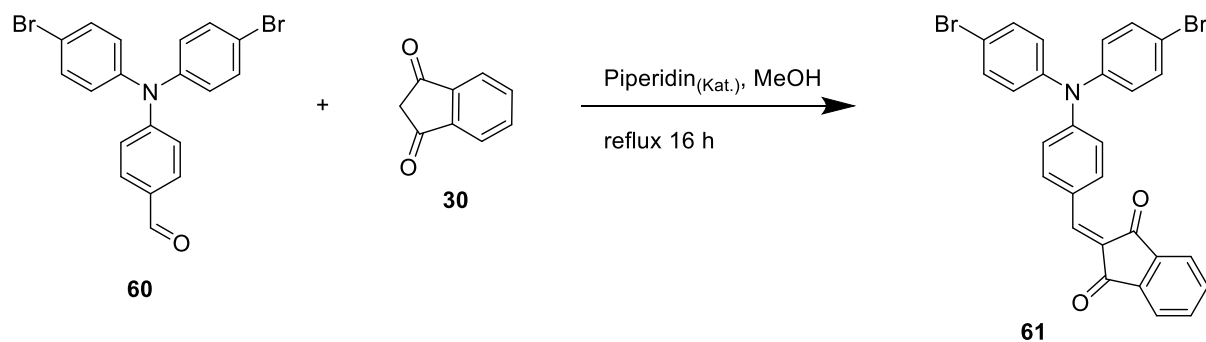
Schema 14: Synthese von PhADiBI **57**

Zur Synthese von ATriBI **59** wurde Triformphenylamin **58** mit 1,3-Indandion **30** und Piperidin in Methanol umgesetzt. Das bei der Reaktion ausfallende Produkt wurde abfiltriert. Die Reaktionsausbeute betrug 45 % (Schema 15).



Schema 15: Synthese von ATriBI **59**

Bei der Synthese von DiBrPhABI **61** wurde 4-(Bis(4-bromophenyl)amino)benzaldehyd **60** mit 1,3-Indandion **30** und Piperidin in Methanol umgesetzt. Das bei der Reaktion ausfallende Produkt wurde abfiltriert. Die Reaktionsausbeute betrug 78 % (Schema 16).



Schema 16: Synthese von DiBrPhABI **61**

Zur Ermittlung der Fluoreszenz-spektroskopischen Eigenschaften der synthetisierten Moleküle wurden Absorptions- und Emissionsspektren aufgezeichnet. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Absorptions- und Emissionswellenlängen der Fluorophore DiPhABI **55**, PhADiBI **57**, ATriBI **59** und DiBrPhABI **61**.

	λ_{\max} Absorption [nm]	λ_{\max} Emission [nm]
DiPhABI	477	602
PhADiBI	521	598
ATriBI	514	594
DiBrPhABI	481	617

Alle Moleküle sind in der Lage Licht im Wellenlängenbereich von 480-532 nm zu absorbieren. Die Emissionsbereiche liegen nah beieinander bei ca. 600 nm. Aufgrund dieser Eigenschaften wird angenommen, dass ein laserinduzierter Übertrag der Fluorophore per Fluoreszenz-Scanner detektierbar ist. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Donoroberflächen mit den verschiedenen Fluorophoren hergestellt und auf einen Glas-Akzeptor übertragen. Der Übertrag wurde im Anschluss per Fluoreszenz-Scan überprüft. Die Aufnahme ist in Abbildung 33 dargestellt.

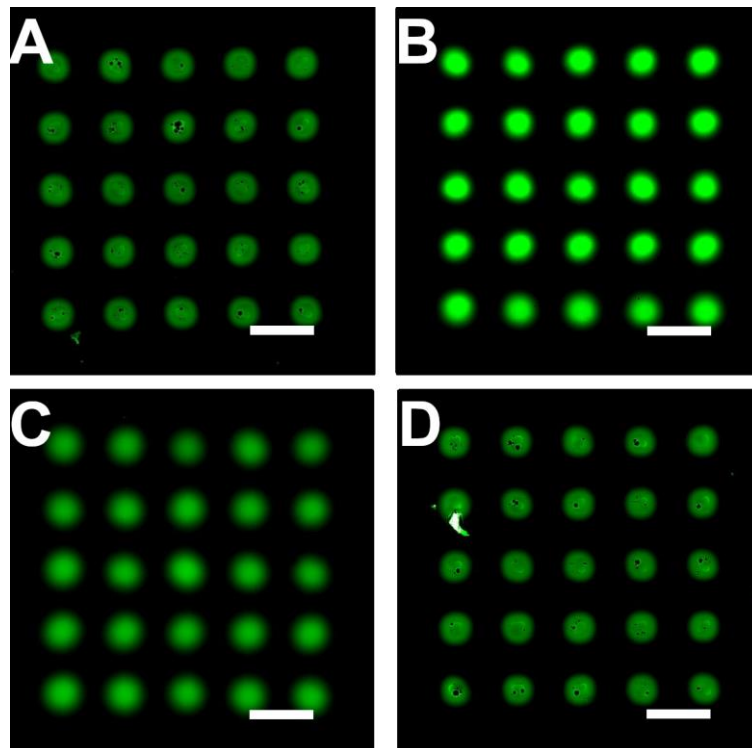


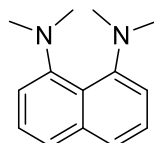
Abbildung 33: Fluoreszenzaufnahme des laserinduzierten Übertrags von Fluorophoren. DiPhABI **55**, PhADiBI **57**, ATriBI **59** und DiBrPhABI **61**. Aufnahmeparameter: Anregungswellenlänge: 488 nm. Emissionsfilter: $587 \pm 37,5$ nm. Auflösung: 5 μm . Maßstab: 250 μm . Die Scans wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Eine Auswertung des Übertrags zeigt, dass alle vier übertragenen Fluorophore im Fluoreszenz-Scanner nachweisbar sind. Aufgrund von großen Überschneidungen im Emissionsbereich ist es jedoch nicht möglich, die einzelnen Fluorophore durch eine Anpassung der verwendeten Emissionsfilter im Scan zu unterscheiden. Zur Minimierung von Nebenprodukten wurde aus diesem Grund die Synthese von DiPhABI **55** als Beispielreaktion gewählt, um eine laserunterstützte Synthese nachzuweisen bzw. zu optimieren.

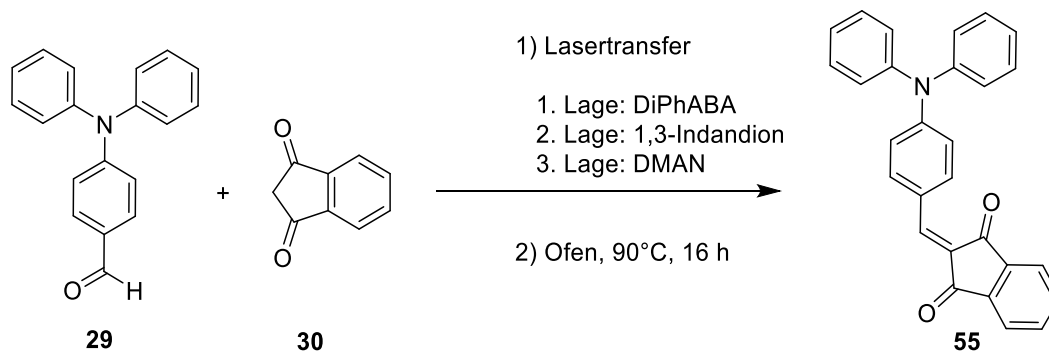
4.2.3. Laserunterstützte Synthese von DiPhABI

Nachdem nachgewiesen wurde, dass die Triphenylamin-basierten Fluorophore DiPhABI **55**, PhADiBI **57**, ATriBI **59** und DiBrPhABI **61** mithilfe eines Fluoreszenz-Scanners detektiert werden können, wurde die Synthese der Fluorophore mittels des laserinduzierten Materialtransfers der Edukte untersucht. Eine laserunterstützte Fluorophorsynthese konnte bereits unter Verwendung eines 532 nm Lasers nachgewiesen werden.¹⁰⁶ Aufgrund der veränderten Absorptionseigenschaften eines Lasers der Wellenlänge 405 nm musste zunächst überprüft werden, ob eine Fluorophorsynthese weiterhin ermöglicht werden kann. Die veränderte Absorption schützt einerseits lichtempfindliche Stoffe vor einer Zersetzung, da über 95 % des Laserimpulses durch die Kaptonschicht des Donors absorbiert werden. Andererseits führt verstärkte Hitzeentwicklung während des Transferprozesses dazu, dass vor allem der Transfer hitzeempfindlicher Stoffe genauer überprüft werden muss. Vor allem bei der Verwendung von Aldehyden besteht ggf. die Gefahr einer Selbstkondensation. Zum Nachweis der laserunterstützten Fluorophorsynthese unter Verwendung des nano3D-Laserdruckers mit einer Laserwellenlänge von 405 nm wurde die Synthese von DiPhABI **55** aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit der Edukte sowie einer sehr guten Nachweisbarkeit des Reaktionsproduktes im Fluoreszenzscan gewählt.

In der Literatur wird die KNOEVENAGEL-Kondensation von DiPhABA **29** und 1,3-Indandion **30** basenkatalytisch unter Verwendung von Piperidin durchgeführt.¹¹⁴⁻¹¹⁶ In früheren Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass der laserunterstützte Transfer von Flüssigkeiten nur bedingt zu einem homogenen Übertrag führt.^{11, 113} Aus diesem Grund wurden bereits von Robin Rastetter alternative Basenkatalysatoren wie 1,8-Bis-(Dimethylamino)naphthalin (DMAN) **62** auf ihre Verwendung in einer per Lasertransfer durchgeführten KNOEVENAGEL-Synthese untersucht, was zu einer Verbesserung der Fluoreszenzhomogenität führte. Die Basizität von DMAN **62** ist dabei nur geringfügig niedriger als die Basizität von Piperidin ($pK_{a(\text{DMAN})}$: 12,34¹¹⁷ bzw. $pK_{a(\text{Piperidin})}$: 11,39¹¹⁸). Aus diesem Grund wurde DMAN in den nachfolgenden Synthesen als Basenkatalysator verwendet.

**62****Abbildung 34:** Strukturformel von 1,8-Bis-(Dimethylamino)naphthalin **62** (DMAN)

Für die laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** wurden DiPhABA **29**, 1,3-Indandion **30** und DMAN **62** auf eine im Sauerstoffplasma gereinigte Glasoberfläche übertragen (s. Schema 17). Im Anschluss wurden die Edukte im Ofen bei 90°C zur Reaktion gebracht und das gebildete DiPhABI **55** per Fluoreszenzanalyse verifiziert. Um eine Fluoreszenz der Edukte ausschließen zu können, wurden diese zusätzlich einzeln übertragen (s. Abb. 36). Beim gewählten Lasermuster wurden die Stoffe zunächst flüchtig in Bereichen aus 9x9 Spots übertragen, um die Synthese mit anderen Reaktionen vergleichen zu können, welche mit einem 532 nm Laser durchgeführt wurden¹⁰⁶. Um die optimalen Transferparameter zu ermitteln, wurden Laserleistung und Laserzeit systematisch variiert. Das entsprechende Lasermuster ist in Abbildung 35 dargestellt.

**Schema 17:** laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55**.

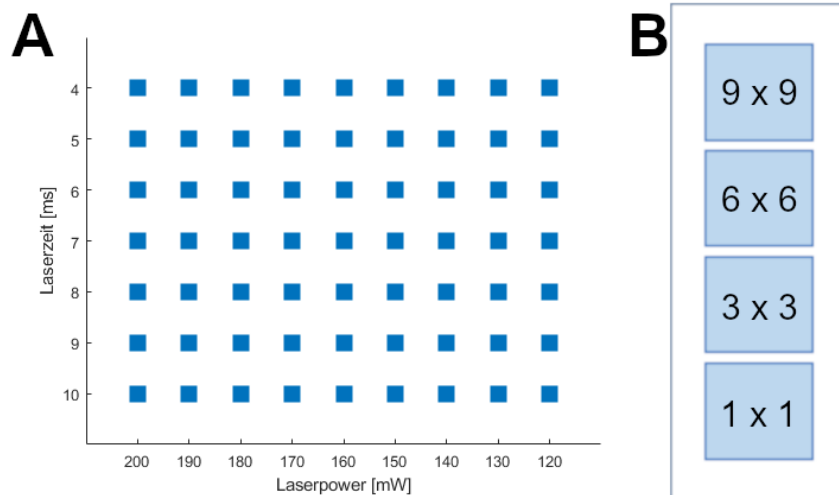


Abbildung 35: Lasermuster zur laserunterstützten Synthese von DiPhABI auf einer Glasoberfläche. A: eine Lasermatrix variiert systematisch die Laserleistung von 120 – 200 mW, sowie die Laserzeit von 4,00 – 10,0 ms. B: Der Übertrag der Lasermatrix wird in schrittweise kleineren Laserflächen aus 9x9 Spots, 6x6 Spots, 3x3 Spots sowie in Einzelspots durchgeführt.

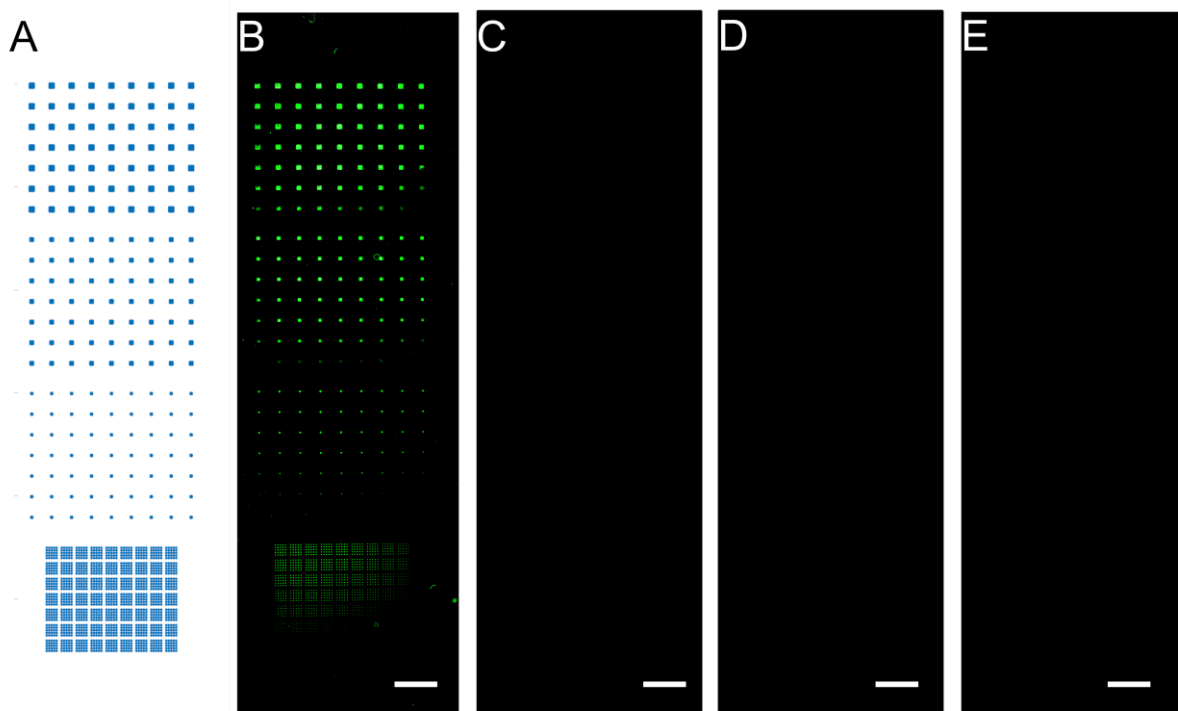


Abbildung 36: Laserunterstützte DiPhABI-Synthese auf Glas. Als Kontrolle wurden die verwendeten Edukte zusätzlich separat übertragen. A: Lasermuster: B: DiPhABI-Synthese, C: DiPhABA **29**, D: 1,3-Indandion **30**, E: DMAN **62**. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm, Emissionsfilter: 587 ± 37 nm. PMT: 1,0. Auflösung: 5 μ m. Maßstab: 1,5 mm. Die Scans wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Hauptteil

Eine Auswertung des Fluoreszenz-Scans (Abb.: 36) zeigt, dass die laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Bildung des Reaktionsproduktes in Abb. 36B wurde anhand der detektierten Fluoreszenz verifiziert (vgl. Tab 11). Die übertragenen Edukte zeigen keine Fluoreszenzemission, was zusätzlich die Bildung von DiPhABI **55** in Abbildung 36B bestätigt. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Positionen korreliert außerdem mit der Größe der jeweiligen Transferfläche. Diese Beobachtung lässt sich durch die entsprechend geringere übertragene Materialmenge bei kleineren Transferflächen erklären. Des Weiteren ist zu erkennen, dass auch im Bereich der transferierten Einzelspots eine Reaktion nachgewiesen werden konnte, auch wenn die gemessene Fluoreszenz nur eine geringe Intensität aufweist. Diese beträgt lediglich etwa 10 % der Fluoreszenzintensität der DiPhABI-Synthese in Transferflächen aus 9x9 Spots.

Dieser Versuch zeigt, dass eine anknüpfungsfreie, laserunterstützte Synthese von Fluorophoren auch unter Verwendung des nano3D-Lasersystems bei einer Wellenlänge von 405 nm erfolgreich durchgeführt werden kann. Durch die Variation der Reaktionsflächen konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die Synthese auch in Einzelspots durchgeführt werden kann, was zu einer Verbesserung der theoretisch möglichen Spotdichte führt.

In Kap. 4.1.3. wurde gezeigt, dass die Qualität des Materialtransfers unter anderem auch von der Polarität bzw. Oberflächenenergie der verwendeten Akzeptoroberfläche abhängt. Daher ist zu erwarten, dass die Transferreihenfolge der einzelnen Stoffe ebenfalls eine tragende Rolle bei der Synthesequalität spielt. Aus diesem Grund wurde die Synthese von DiPhABI **55** erneut mit dem nano3D-Laserdrucker durchgeführt. In diesem Experiment wurde jedoch die Reihenfolge der übertragenen Edukte variiert. Das für diesen Versuch verwendete Lasermuster ist in Abbildung 37A dargestellt. Nach dem Lasertransfer wurden die übertragenen Stoffe durch die Inkubation der Oberfläche im Ofen zur Reaktion gebracht. Der anschließende Fluoreszenz-Scan ist in Abbildung 37 dargestellt.

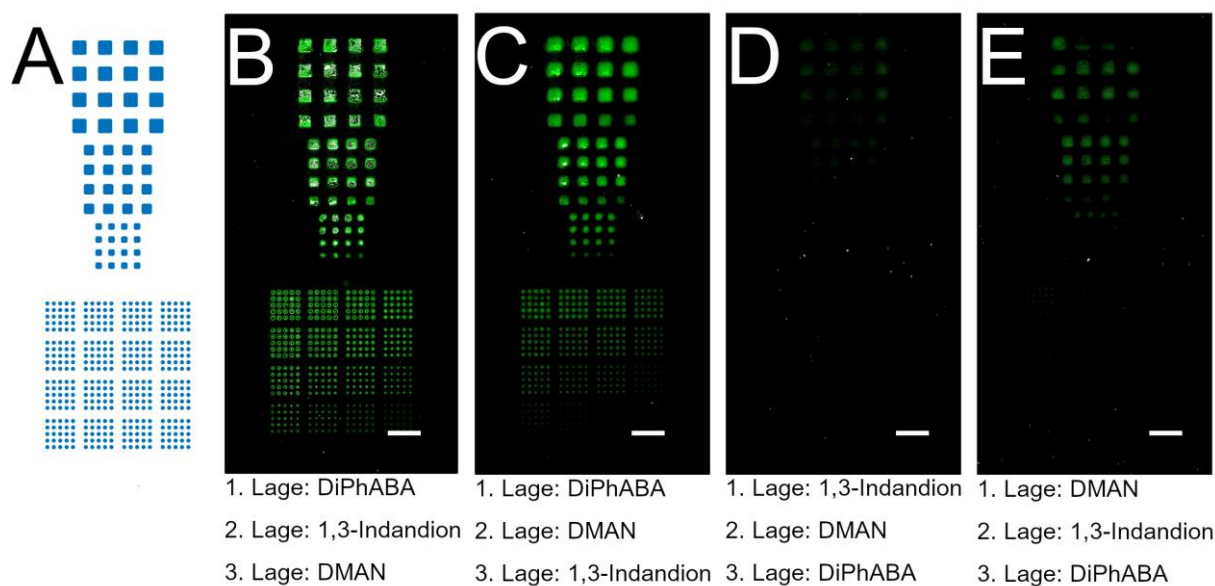


Abbildung 37: Variation der Schichtabfolge einzelner Transferlagen bei der Synthese von DiPhABI **55**. A: Lasermuster. B-E: Schichtfolgenvariation. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm, Emissionsfilter: $587 \pm 37,5$ nm, PMT: 1,0. Auflösung: 5 μ m. Maßstab: 1 mm. Die Scans wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Die Variation der Schichtabfolge der übertragenen Edukte zeigt deutlich, dass eine Abhängigkeit der Synthesequalität von der Transferreihenfolge besteht. Aus den Abbildungen 37B und 37C geht hervor, dass bei einem Übertrag des Aldehyds **29** in der untersten Transferschicht eine deutlich bessere Produktbildung nachgewiesen werden kann, im Vergleich zu einem Transfer des Aldehyds in der letzten Lage (Abb. 37D und 37E). Diese Beobachtung kann einerseits auf einen verringerten Übertrag des Aldehyds **29** auf die durch die vorherigen Transferschritte modifizierte Oberfläche zurückgeführt werden. Andererseits ist der Aldehyd in der obersten Transferschicht stärker äußeren Einflüssen wie Luftfeuchtigkeit oder Sauerstoff ausgesetzt, was ggf. Nebenreaktionen wie bspw. eine Autooxidation begünstigt.

Die stärkste Fluoreszenz wird bei einem direkten Übertrag des 1,3-Indandions **30** auf den Aldehyd **29** gemessen (Abb.: 37B). Diese Beobachtung lässt sich durch die kurze Diffusionsstrecke und direkten Interaktionsbereich der beiden Reaktionsbausteine durch den unmittelbaren Kontakt der Transferlagen erklären. Die Annahme wird bei einer Betrachtung der Fluoreszenzintensitäten in Abbildung 37D und 37E bestärkt. In diesen Fällen wurde der Aldehyd als letzte Schicht übertragen. Hier ist ebenfalls eine stärkere Fluoreszenzintensität beim Transfer des Aldehyds **29** auf das 1,3-Indandion **30** zu erkennen (Abb. 37E).

Hauptteil

Das Experiment zeigt, dass die durchgeführte Synthese von DiPhABI **55** auf einer Glasoberfläche eine starke Abhängigkeit der Reihenfolge, in der die einzelnen Edukte übertragen werden, aufweist. Anhand der detektierten Fluoreszenz wurde ermittelt, dass der Transfer des Aldehyds DiPhABA **29** als erste Lage übertragen werden muss, um eine ausreichende Produktbildung zu gewährleisten.

Abbildung 38 zeigt eine Detailaufnahme der laserunterstützten Synthese von DiPhABI **55** auf einem Glas-Akzeptor. Beim Transfer der Edukte wurde DiPhABA **29** als erste Lage, gefolgt von 1,3-Indandion **30** und DMAN **62** als letzte Lage übertragen. Die Abbildung vergleicht die laserunterstützte Synthese in Transferflächen aus 9x9 Spots (Abb. 38B) sowie der Synthese in Einzelspots (Abb. 38C). Die entsprechenden Transferparameter sind in Abbildung 38A dargestellt.

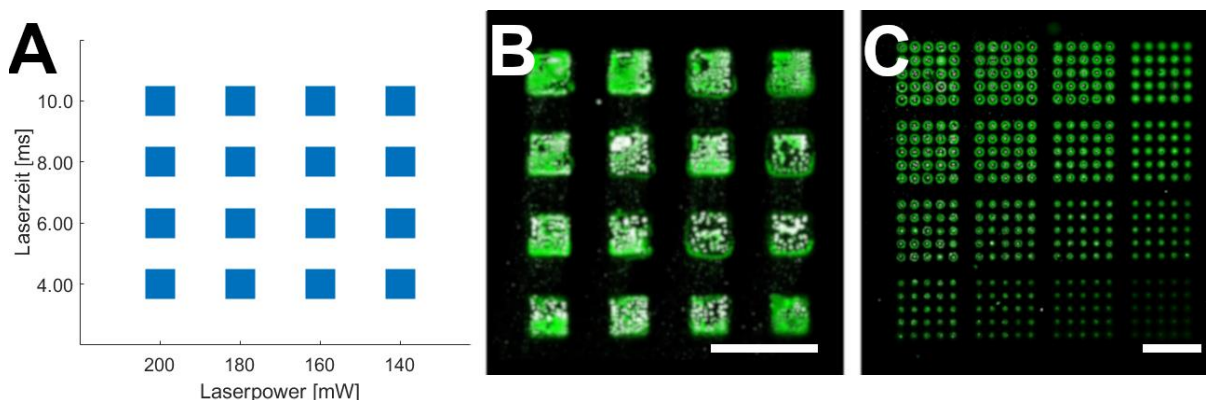


Abbildung 38: Detailaufnahme der Synthese von DiPhABI auf Glas. A: Synthese in Laserflächen aus 9x9 Spots. B: Synthese in Einzelspots. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm, Emissionsfilter: $587 \pm 37,5$ nm, PMT: 1,0. Auflösung: 5 μ m. Maßstab: 1 mm. Die Scans wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Es fällt auf, dass die detektierte Fluoreszenz innerhalb der jeweiligen Bereiche eine starke Inhomogenität aufweist. Diese Unregelmäßigkeiten sind sowohl bei der flächigen Synthese (Abb. 38B) als auch in einzelnen Spots (Abb. 38C) auffällig. Diese Beobachtung lässt sich vermutlich auf eine Kristallbildung einzelner Stoffe nach dem Transfer bzw. während der Inkubationsphase zurückführen. Bei Stoffen, deren Polarität sich stark von der verwendeten Akzeptoroberfläche unterscheidet, kann während der Inkubationsphase unter Hitzeeinwirkung ein Entnetzungsvorgang beobachtet werden. Ähnliche Effekte konnten bereits bei den laserunterstützten Synthesen von Robin Rastetter beobachtet werden. Hier konnte ebenfalls eine Inhomogenität der Fluoreszenz bei der Synthese des Fluorophors **50** nachgewiesen werden (s. Abb. 39).¹⁰⁶

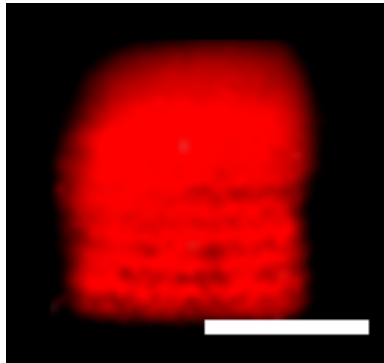


Abbildung 39: Laserunterstützte Synthese des Fluorophors 50 unter Verwendung eines 532 nm Lasers. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm. Emissionsfilter: 677 ± 22 nm. PMT: 5,0. Auflösung: 1 μm . Maßstab: 250 μm . ¹⁰⁶

Zur Vermeidung dieses Effekts, wurde untersucht, ob zusätzliches S-LEC auf dem Akzeptor einer möglichen Entnetzung entgegenwirkt. Hierzu wurden verschiedene Modifikationen der Arrayoberfläche verglichen. Unter anderem wurde überprüft, welchen Effekt eine Beschichtung des Akzeptors mit dem Transferpolymer hervorruft. Es wurde angenommen, dass die zusätzliche Polymerschicht, welche im Reaktionsschritt ebenfalls als Lösungsmittel fungiert, einer Entnetzung der Reaktionsbereiche auf dem Akzeptor entgegenwirkt. Für dieses Experiment wurde ein Glasobjektträger mit einer Lösung aus 100 mg/ml S-LEC in DCM per Rakeln beschichtet. Anschließend wurden DiPhABA **29**, 1,3-Indandion **30** sowie DMAN **62** in wechselnder Schichtabfolge auf den vorbereiteten Akzeptor übertragen. Nach dem Lasertransfer erfolgte eine Inkubation des Arrays im Ofen. Der Fluoreszenz-Scan ist in Abbildung 40 dargestellt.

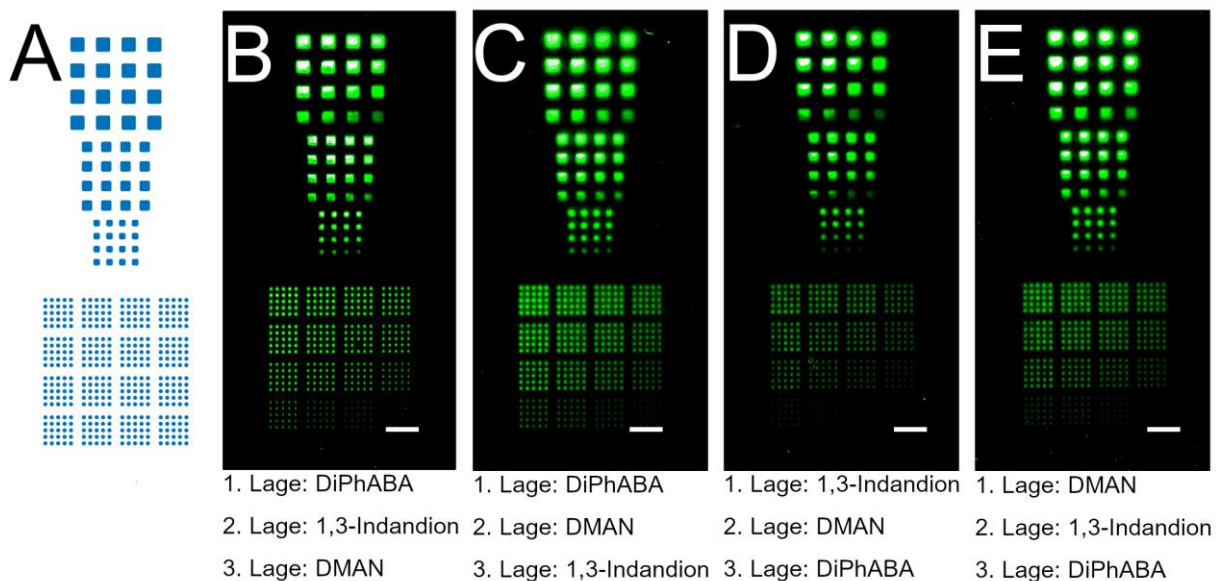


Abbildung 40: Variation der Schichtfolgen einer DiPhABI-Synthese auf einem S-LEC-beschichteten Akzeptor. A: Synthese in Laserflächen aus 9x9 Spots. B: Synthese in Einzelspots. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm, Emissionsfilter: 615 ± 10 nm. PMT: 0,01. Auflösung: $5 \mu\text{m}$. Maßstab: 1 mm. Die Scans wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Eine Beschichtung der Akzeptoroberfläche mit S-LEC führt zu einer vielfachen Zunahme des detektierten Fluoreszenz-Signals. Aus diesem Grund wurde in Abbildung 40 ein Emissionsfilter gewählt, der einen deutlich kleineren Wellenlängenbereich umfasst (Zuvor: $582 \pm 37,5$ nm, Jetzt: 615 ± 10 nm). Es ist außerdem zu beobachten, dass der Einfluss der Transferreihenfolge der einzelnen Edukte stark abnimmt. Alle dargestellten Variationen der Transferreihenfolge zeigen eine deutlich sichtbare Fluoreszenz (Abb. 40A-D). Betrachtet man die einzelnen Positionen jedoch genauer, kann auch bei der Synthese auf S-LEC dieselbe Korrelation zwischen Schichtfolge und Synthese-Qualität wie bereits bei der Synthese auf Glas festgestellt werden: Bei einem direkten Kontakt der Aldehyd-Schicht und dem übertragenen 1,3-Indandion **30** ist eine stärkere Fluoreszenz zu messen als wenn diese Schichten durch die eingesetzte Base **62** getrennt werden.

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Synthesebereiche fällt auf, dass diese im Vergleich zur Synthese auf Glas eine homogene Fluoreszenzintensität aufweisen. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die S-LEC-Beschichtung des Akzeptors eine Entnetzung des übertragenen Materials vom Array-Träger verhindert (Abb. 41).

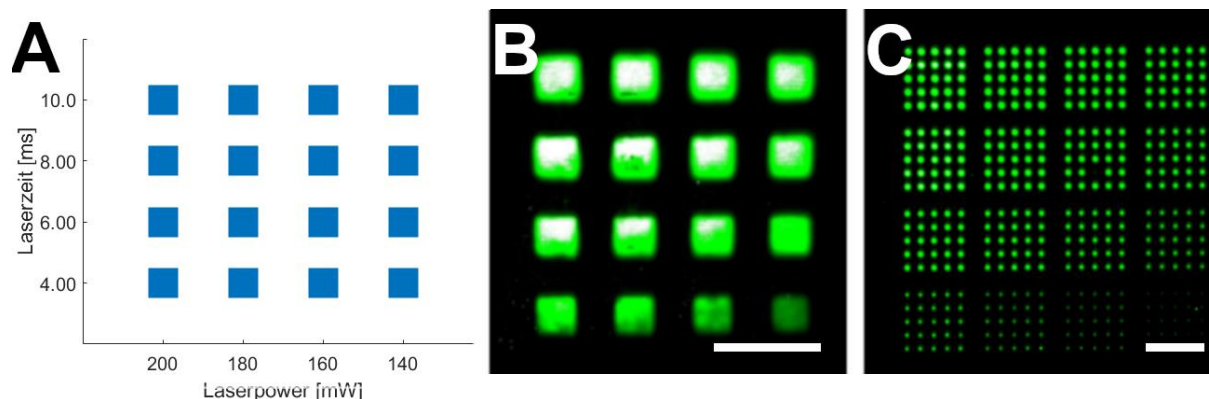


Abbildung 41: Detailaufnahme der Synthese von DiPhABI auf S-LEC. A: Laserparameter. B: Synthese in Laserflächen aus 9x9 Spots. C: Synthese in Einzelspots. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm, Emissionsfilter: 615 ± 10 nm. PMT: 0,01. Auflösung: 5 μm . Maßstab: 1 mm. Die Scans wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese von fluoreszierenden Molekülen wie DiPhABI **55** auch unter Verwendung eines 405 nm Lasers durchgeführt werden konnte. Auffällig dabei ist, dass die Synthese auf einem unbeschichteten Glasträger zu einer starken Inhomogenität der übertragenen Reaktionsbereiche führt. Frühere Fluorophorsynthesen, welche unter Verwendung eines 532 nm Lasers durchgeführt wurden, wiesen hingegen nur schwache Inhomogenitäten auf¹⁰⁶. Dies lässt sich vermutlich auf den stoffspezifischen Übertrag der eingesetzten Edukte zurückführen. Durch eine Beschichtung der Akzeptoroberfläche mit dem als Transfermatrix verwendeten Polymer S-LEC konnte jedoch eine deutliche Steigerung der Reaktionsqualität erreicht werden. Dies zeigt sich vor allem in einer deutlichen Zunahme der detektierten Fluoreszenzintensität sowie einer homogenen Verteilung der Fluoreszenz innerhalb der Reaktionsbereiche. Des Weiteren rückt die in Abb. 37 festgestellte Abhängigkeit der Transferreihenfolge der übertragenen Edukte durch die S-LEC-Beschichtung des Akzeptors in den Hintergrund. Durch die Beschichtung konnte die Produktbildung bei unterschiedlichen Transferreihenfolgen mit einer vergleichbaren Fluoreszenzintensität verifiziert werden. Es wird vermutet, dass durch die Beschichtung des Akzeptors Entnetzungseffekten entgegengewirkt sowie zusätzliches „Lösungsmittel“ zur Verfügung gestellt wird. Dies führt zu einer besseren Durchmischung der einzelnen Materialstapel und somit zu einer homogenen Reaktionsführung. Aufgrund der deutlich verbesserten Reaktionsführung werden die Versuche im Folgenden ebenfalls auf S-LEC-beschichteten Syntheseoberflächen durchgeführt.

4.2.4. Überprüfung der Homogenität

Zur Überprüfung der Homogenität und Reproduzierbarkeit einer laserunterstützten Synthese wurde die Synthese von DiPhABI **55** exemplarisch auf der gesamten Akzeptoroberfläche durchgeführt. Dieses Experiment dient dazu, Unterschiede in den Synthesespots wie eine Varianz der Spotdurchmesser oder Schwankungen in der Fluoreszenzintensität zu ermitteln. Durch den Vergleich zahlreicher, parallel durchgeführter Reaktionsansätze sollen Rückschlüsse auf Transferqualität und die erfolgte Reaktion gezogen werden. Hierfür wurden DiPhABA **29** sowie 1,3-Indandion **30** und DMAN **62** per Laserimpuls auf einen S-LEC-beschichteten Akzeptor übertragen. Nach dem Transfer wurden die Stoffe im Ofen bei 90 °C zur Reaktion gebracht und die Oberfläche nach Abschluss der Reaktion via Fluoreszenz-Scan ausgewertet. Insgesamt wurden 18.720 Spots auf einer Fläche von ca. 66x24 mm übertragen. Das entspricht einer Spotdichte von 1182 Spots/cm². Die Fluoreszenz-Aufnahme ist in Abbildung 42 dargestellt.

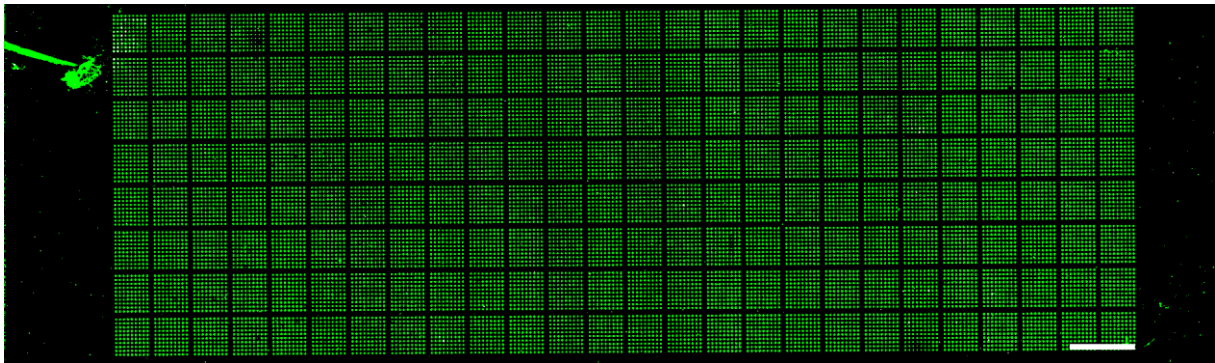


Abbildung 42: Fluoreszenz-Aufnahme einer DiPhABI-Synthese mit 18.720 übertragenen Reaktionssspots. Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm. Emissionsfilter: 615±10 nm. PMT: 0,05. Auflösung: 5 µm. Maßstab: 4 mm. Die Aufnahme wurde in Kontrast und Helligkeit angepasst.

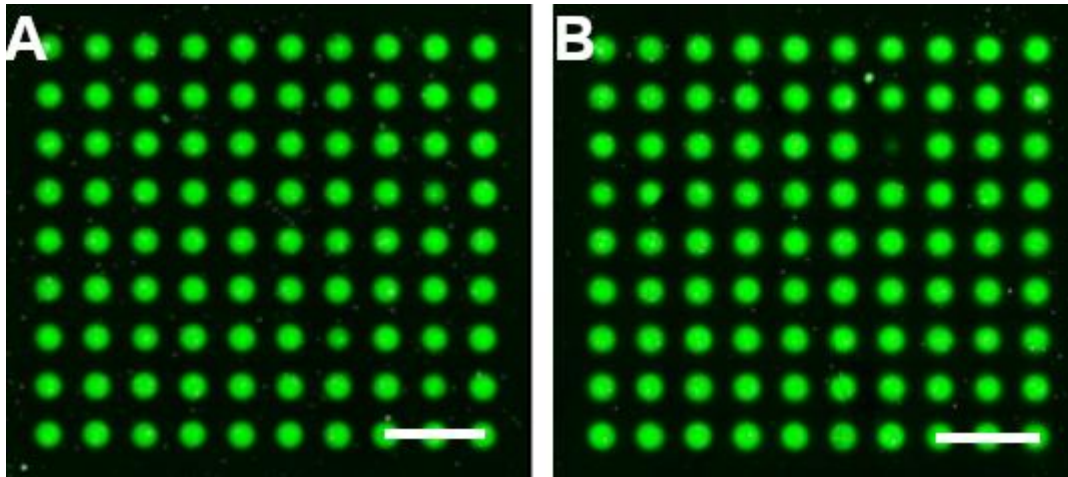


Abbildung 43: Ausschnitt der DiPhABI-Synthese zur Veranschaulichung der Homogenität der durchgeführten Reaktionen. A: Arraybereich mit 81 Reaktionsspots. B: Beispiel einer Defektstelle. Anregung: 488 nm. Emissionsfilter: 615 ± 10 nm. PMT: 0,05. Auflösung: 5 μm . Maßstab: 0,50 mm. Die Aufnahme wurde in Kontrast und Helligkeit angepasst.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Daten zeigt zunächst, dass nur 11 Defektstellen detektiert werden konnten. Das bedeutet, dass 99,9 % aller Reaktionen erfolgreich verifiziert wurden. Die Defektstellen lassen sich vermutlich überwiegend auf einen unzureichenden Materialübertrag durch eine lokale Verunreinigung der verwendeten Donoroberfläche (z.B. durch Staubkörner oder Luftblasen in der Kaptonbeschichtung) zurückführen. Die gemessene Fluoreszenz-Intensität der Synthesepunkte betrug im Mittel 17.828 AU. Es konnte lediglich eine Standardabweichung von 17 % des Mittelwerts gemessen werden. Der Mittelwert der gemessenen Spotdurchmesser betrug 123,8 μm mit einer Standardabweichung von 7,60 μm (6%). Die Verteilung der Fluoreszenzwerte und Spotdurchmesser auf der Oberfläche ist in Abbildung 44 visualisiert.

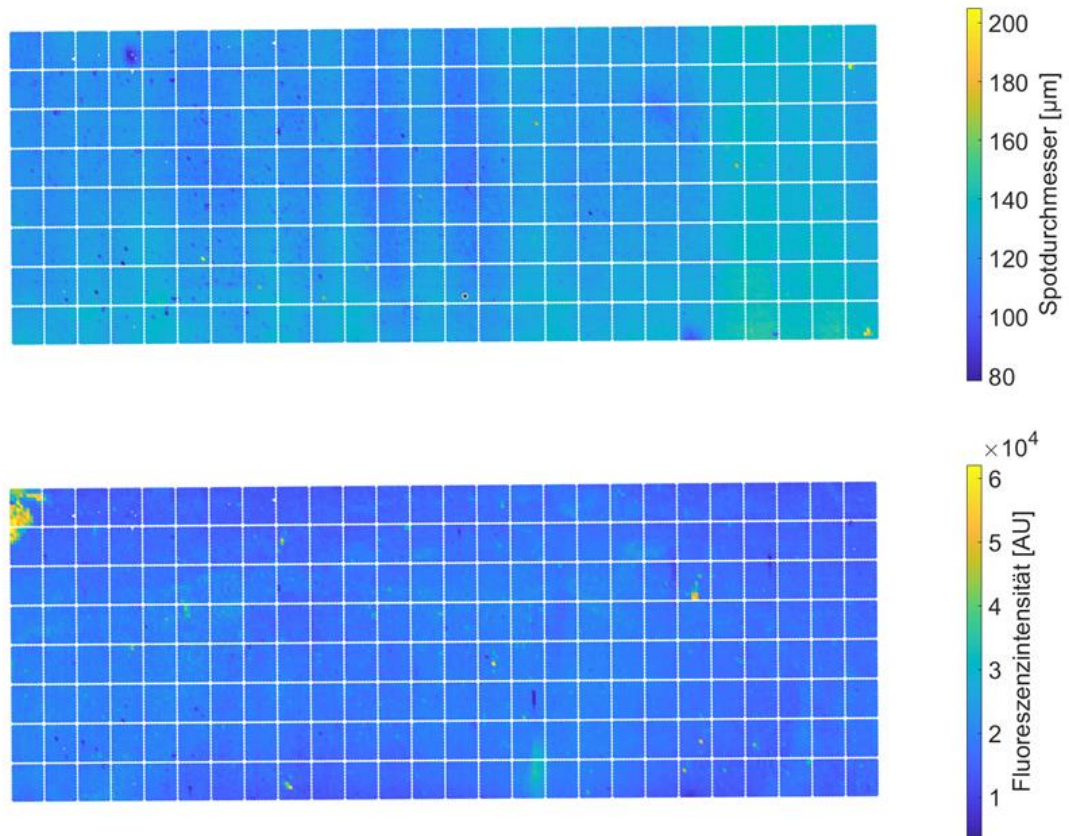


Abbildung 44: Darstellung der Spotdurchmesser (oben), sowie der Fluoreszenzintensität (unten) der einzelnen Transferspots.

Bei der Verwendung eines DPSS-Lasers konnte eine Fluktuation in der Laserleistung um bis zu 5 % festgestellt werden. Diese Schwankung führte zu einer Varianz der Spotdurchmesser von etwa 25 µm.¹² Eine Messung der Laserleistung des verwendeten OLED-Lasers ergab, dass im Bereich von 100-200 mW nur eine Schwankung von maximal 0,02 % gemessen werden konnte (s. Tab. 26 im Anhang Kap. 11.). Bedingt durch die homogenere Laserleistung konnte auch die Schwankung der Spotdurchmesser auf ca. 15 µm verringert werden. Die Verteilung der jeweiligen Spotdurchmesser ist in Tabelle 12 in aufgeführt. Abbildung 45 zeigt eine graphische Darstellung der Verteilung der Spotdurchmesser.

Tabelle 12: Absolutes und prozentuales Auftreten verschiedener Spottedurchmesser bei einer DiPhABI-Synthese über den gesamten Laserbereich. Die Durchmesser wurden in Abständen von 10 μm untersucht.

Spottedurchmesser [μm]	Anzahl	%
< 80	1	0,01 %
80 - 90	13	0,07 %
90 - 100	37	0,20 %
100 - 110	348	1,86 %
110 - 120	5430	29,03 %
120 - 130	8729	46,67 %
130 - 140	3853	20,60 %
140 - 150	285	1,52 %
150 - 160	6	0,03 %
160 - 170	1	0,01 %
170 - 180	1	0,01 %
180 - 190	1	0,01 %
190 - 200	2	0,01 %
> 200	2	0,01 %

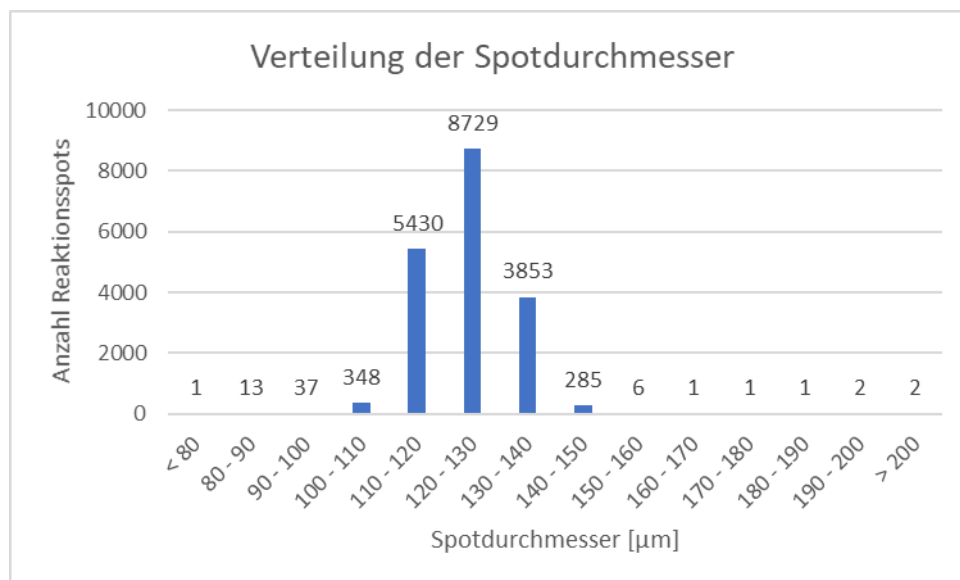


Abbildung 45: Graphische Darstellung der Verteilung verschiedener Spottedurchmesser bei einer DiPhABI-Synthese über den gesamten Laserbereich.

Es konnte gezeigt werden, dass die Synthese von DiPhABI in 99,9 % aller übertragener Reaktionsspots im Laserbereich erfolgreich durchgeführt werden konnte. Ein Vergleich der Fluoreszenz zeigt, dass die Synthese in allen Spots mit ähnlicher Qualität durchgeführt werden konnte. Dies zeigt sich in einer Varianz der Spotdurchmesser von lediglich 6 % sowie einer Schwankung der detektierten Fluoreszenzintensität von 17 %. Durch die Verwendung eines OLED-Lasers wurden nur geringere Schwankungen der Laserleistung von 0,02 % während des Transferschrittes erzielt, was ebenfalls zu der Homogenität der erzeugten Reaktionsspots beiträgt.

4.2.5. Optimierung der Reaktionsbedingungen:

In Kap. 4.2.3. konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Fluorophoren durch den laserinduzierten Materialtransfer der Edukte auch unter Anwendung eines 405 nm Lasers durchführbar ist. Des Weiteren konnte die Homogenität der laserunterstützten Synthese durch einen Vergleich der Fluoreszenz sowie der Spotdurchmesser gezeigt werden (vgl. Kap. 4.2.4.). In den folgenden Abschnitten sollen nun die Bedingungen während der Reaktionsphase optimiert werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst die benötigte Reaktionszeit genauer untersucht. Im Anschluss wurden verschiedene Arten zur Durchmischung der übertragenen Materialschichten verglichen. Außerdem wurde untersucht, inwiefern die transferierte Materialmenge der Edukte eine Rolle in Bezug auf die Synthesequalität spielt.

4.2.5.1. Optimierung der Reaktionszeit

Das Prinzip der laserunterstützten Synthese basiert darauf, dass die benötigten Edukte während des Transferprozesses gezielt übereinandergeschichtet werden und die Schichten dieser so aufgebauten Reaktionsstapel im sogenannten Reaktionsschritt durchmischt werden. Während des Reaktionsschrittes erlaubt die sonst starre Transfermatrix die Diffusion der eingebetteten Moleküle und ermöglicht es den übertragenen Edukten miteinander zu reagieren. Die Durchmischung der Transferschichten konnte in der Vergangenheit durch Hitze¹⁰⁻¹² oder durch die Inkubation der Synthesoberfläche in einer Lösungsmittelatmosphäre¹¹ erreicht werden. Durch die hohe Viskosität der Transfermatrix bei Temperaturen oberhalb des T_G des Polymers von ca. 80 °C wird von einer gehinderten Diffusion der eingebetteten Edukte ausgegangen. Robin Rastetter untersuchte in seiner Masterarbeit aus diesem Grund überwiegend sehr lange Reaktionszeiten von mehreren Tagen (s. Kap. 4.2.1.)¹⁰⁶. Parallel dazu wurde in einem zweiten Ansatz die in der Originalliteratur angegebene Reaktionszeit eingehalten. Ein Vergleich der beiden Ansätze zeigte, dass eine

längere Reaktionszeit nicht zu einer Zunahme der Homogenität oder Intensität der detektierten Fluoreszenz der Reaktionsprodukte führte.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass beim Transferprozess Temperaturen von mehreren 100 °C an der Donoroberfläche erreicht werden¹¹⁹. Gegebenenfalls genügt die beim Transfer übertragene Hitze, dass die einzelnen Schichten durchmischt und so die eingebetteten Edukte bereits beim Transferschritt zur Reaktion gebracht werden. Dies würde bedeuten, dass keine einheitliche Reaktionsphase möglich ist, sondern dass die Reaktionsqualität unter anderem von der Reihenfolge, in welcher die einzelnen Array-Spots übertragen werden, abhängt.

Für eine Optimierung der Reaktionszeit wurde aus diesem Grund die laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** bei unterschiedlich langen Reaktionsphasen betrachtet. Basierend auf Literaturangaben¹¹⁴⁻¹¹⁶ wurden Reaktionszeiten von 1, 2, 4 h sowie 16 h ausgewählt. Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Reaktionszeit von 72 h untersucht. Beim Lasertransfer wurde zunächst DiPhABA **29**, gefolgt von 1,3-Indandion **30** und DMAN **62** als letzte Schicht übertragen. Nach der entsprechenden Reaktionsphase bei 90 °C wurden die Oberflächen via Fluoreszenz-Scan ausgewertet. Parallel wurde als Kontrolle ein zweiter Ansatz vorbereitet, bei dem die Oberflächen nach dem Materialtransfer jedoch nicht in Hitze inkubiert, sondern bei Raumtemperatur gelagert wurden (s. Abb. 46). Die Fluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 47 dargestellt.

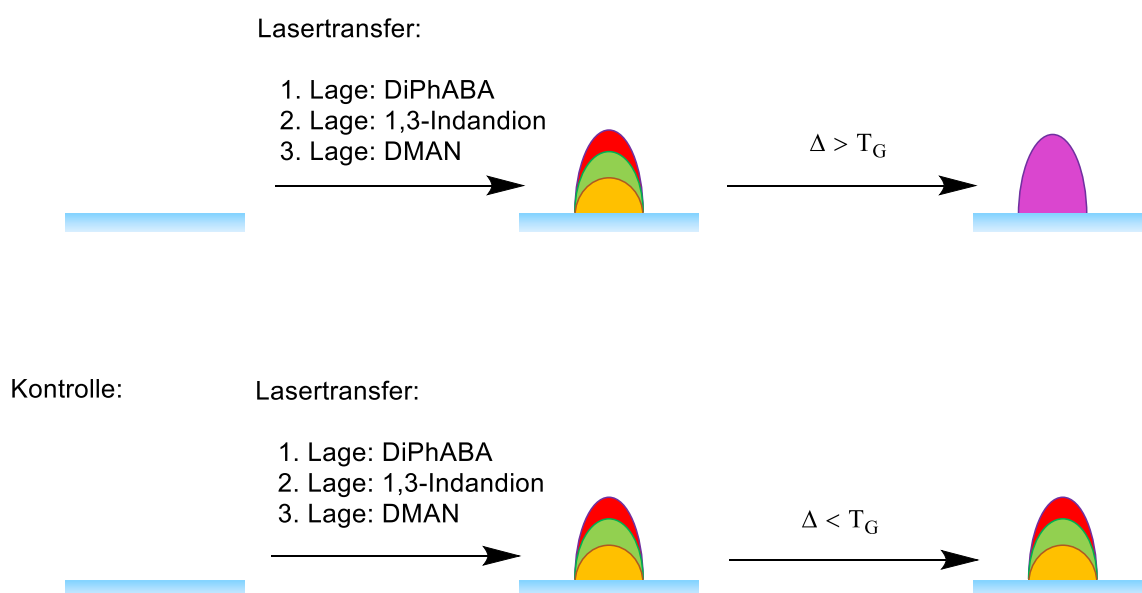


Abbildung 46: Laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** zur Optimierung der Reaktionszeit.

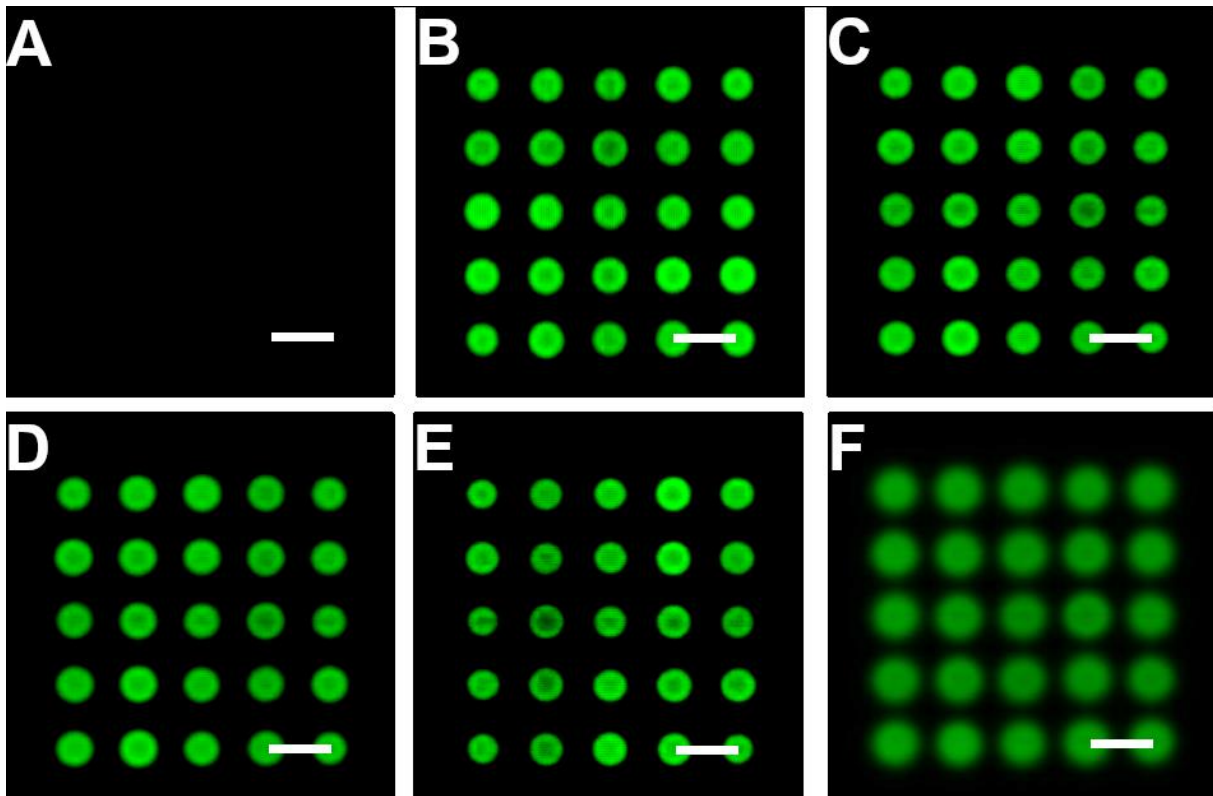


Abbildung 47: Fluoreszenzaufnahme zur Optimierung der Reaktionszeit laserunterstützter Synthesen durch die Inkubation der Oberflächen bei 90 °C. A: Kontrolloberfläche ohne hitzeinduzierten Reaktionsschritt, B: Reaktionszeit: 1 h, C: Reaktionszeit: 2 h, D: Reaktionszeit: 4 h, E: Reaktionszeit: 16 h, F: Reaktionszeit: 72 h. Maßstab: 250 μ m. Aufnahmeparameter: Auflösung: 5 μ m, Anregung: 488 nm, Emissionsfilter: 615 \pm 10 nm. PMT: 0,05.

Die Auswertung der Fluoreszenz-Aufnahmen zeigt, dass bereits nach einer Stunde ein deutliches Fluoreszenz-Signal zu erkennen ist. Ein Vergleich der Floreszenzen legt die Vermutung nahe, dass die Produktbildung bereits nach einem Zeitraum von 1-2 h abgeschlossen war, da keine Veränderung der Fluoreszenzintensität bei längeren Reaktionszeiten zu beobachtet wurde. Es konnte weder eine weitere Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, noch konnten Konzentrationsbedingte Quenching-Effekte festgestellt werden. Weiterhin ist jedoch zu beobachten, dass die Spotqualität bei sehr langen Kupplungszeiten abnimmt (vgl. Abb. 47F, Reaktionszeit: 72 h). Dies zeigt sich in zunehmend unscharfen Spotumrissen sowie einer beginnenden, gleichmäßigen Abnahme der Fluoreszenz durch eine laterale Diffusion der Spots. Ohne die gezielte Durchmischung der Transferschichten durch die Erwärmung der Syntheseoberfläche konnte auch bei Reaktionszeiten von bis zu 72 h keine Produktbildung festgestellt werden. Daraus folgt, dass die beim Transferprozess auftretenden Temperaturen zu keiner ausreichenden Durchmischung der übertragenen Schichten führen.

Die kurze Reaktionszeit deckt sich mit diversen literaturbekannten DiPhABI-Synthesen. Auch wenn durch die Verwendung von S-LEC als Reaktionsmedium von einer verringerten Diffusion ausgegangen wird, bleibt zu bedenken, dass die tatsächlichen Diffusionsstrecken der einzelnen Reaktionspartner lediglich nur wenige Nanometer betragen. Diese kurzen Diffusionsstrecken kompensieren dabei womöglich die herabgesetzte Beweglichkeit der Reaktionspartner im Medium. Bastian Münster konnte bei der Diffusionsuntersuchung von aktivierten Aminosäuren eine Diffusion über eine Strecke von 100 nm in 90 min im verwendeten Matrixpolymer S-LEC nachweisen.⁹⁵

Durch die Optimierung der Reaktionszeit konnte gezeigt werden, dass die laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** bereits nach 1-2 h abgeschlossen zu sein scheint. Vor allem Reaktionszeiten von mehreren Tagen zur Kompensation der verringerten Diffusionsgeschwindigkeit der übertragenen Edukte in der Transfermatrix führen vielmehr zu einer Verringerung der Spotqualität. Aus diesem Grund wurde für folgende Versuche eine Reaktionszeit von 4 h gewählt, um bei ggf. langsameren Reaktionen trotzdem eine ausreichende Produktbildung zu gewährleisten.

4.2.5.2. Reaktionsführung im Lösungsmitteldampf

Die Durchmischung der übertragenen Materialschichten erfolgte bisher überwiegend durch das Erhitzen des Arrays über den T_G der verwendeten Transfermatrix. Beim Transfer von OPfp-aktivierten Aminosäuren auf eine NH₂- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMAoberfläche konnte außerdem gezeigt werden, dass die Inkubation des Arrays im Lösungsmitteldampf ebenfalls zur Kupplung der übertragenen Aminosäure an die Oberfläche führt.¹¹ Bei einer Kupplung von Fmoc-Gly-OPfp **27** in einer DCM-Atmosphäre konnte eine geringe Zunahme der Spotdurchmesser von ca. 5 μ m im Vergleich zur hitzeinduzierten Kupplung detektiert werden. Beim Kupplungsnachweis via Fluoreszenzfärbung konnte bei den im Lösungsmitteldampf gekuppelten Aminosäuren zudem eine stärkere Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden.¹¹ Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, dass bei der Inkubation im Lösungsmitteldampf die übertragenen Materialschichten verflüssigt werden, was eine bessere Diffusion der eingebetteten Materialien ermöglicht.

Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die entsprechenden Reaktionen auch bei niedrigen Temperaturen wie z.B. Raumtemperatur durchgeführt werden können. Vor allem bei Flüssigkeiten oder Stoffen mit geringen Dampf- bzw. Siedepunkten kann bei niedrigen Reaktionstemperaturen ggf. einer Kontamination von Nachbarspots vorgebeugt werden (vgl. Kap 4.2.6.).

Im folgenden Experiment soll daher überprüft werden, ob eine laserunterstützte Fluorophorsynthese auch durch die Inkubation der Syntheseoberflächen in einer Lösungsmittelatmosphäre durchführbar ist. Für diesen Versuch wurden DiPhABA **29**,

Hauptteil

1,3-Indandion **30** und DMAN **62** auf S-LEC-beschichtete Glasoberflächen übertragen. Zur Kupplung im Lösungsmitteldampf wurde ein Gefäß mit DCM in eine Glaskammer gestellt. Nach etwa 30 min wurden die Oberflächen in die Kammer gelegt und für 10 min, 15 min, 30 min, 45 min sowie 60 min inkubiert. Zur Bewertung der Reaktionsqualität wurden die Oberflächen per Fluoreszenz-Scan ausgewertet (s. Abb. 49). Als Referenz dient ein Ansatz, bei dem die übertragenen Edukte für 1 h unter Hitzeeinwirkung bei 90 °C zur Reaktion gebracht wurden.

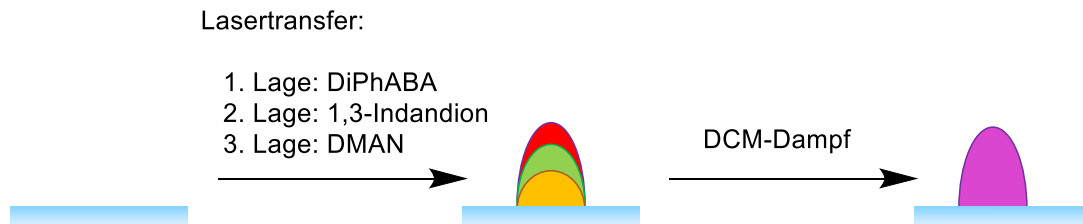


Abbildung 48: Laserunterstützte DiPhABI-Synthese über eine Durchmischung der übertragenen Schichten im Lösungsmitteldampf

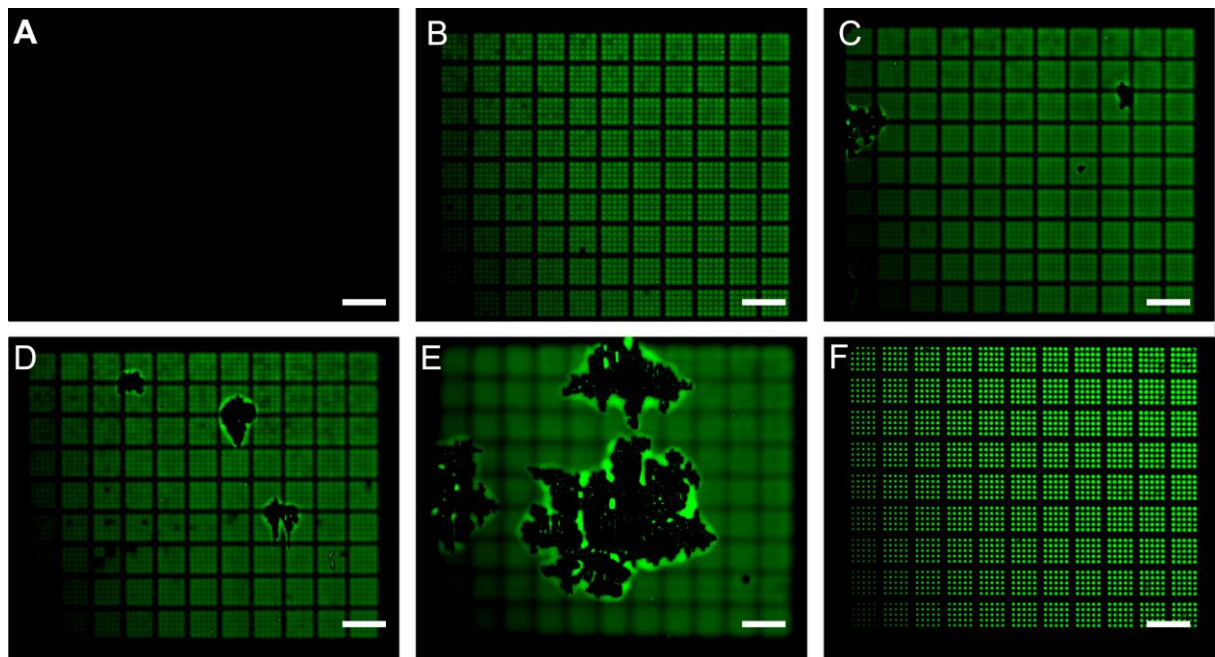


Abbildung 49: Laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** im DCM-Lösungsmitteldampf bei unterschiedlichen Reaktionszeiten. A: 10 min. B: 15 min. C: 30 min, D: 45 min, E: 60 min, F: Kontrolle durch hitzeinduzierte Reaktionsführung (90 °C 1 h). Maßstab: 1,50 mm. Aufnahmeparameter: Auflösung: 5 µm. Anregung: 488 nm, Filter: 615±10 nm, PMT: 0,05.

Tabelle 13: Detektierte Fluoreszenz-Intensitäten bei verschiedenen Kupplungszeiten. Als Vergleich dient die gemessene Fluoreszenz-Intensität bei der Kupplung bei 90 °C.

Kupplungszeit	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min	Kupplung in Hitze
Fluoreszenz- intensität [AU]	0	7.000	8.000	10.000	5.000	20.000

Die Aufnahmen der Reaktion in Abbildung 49 zeigen eine deutlich schlechtere Qualität der im DCM-Dampf inkubierten Oberflächen (Abb. 49A - E) im Vergleich zur Reaktionsführung durch eine hitzeinduzierte Durchmischung der Materialschichten (Abb. 49F). Bereits nach 15-30 min kann eine Zerstörung der Akzeptorbeschichtung beobachtet werden. Diese ist auf kondensiertes Lösungsmittel bzw. die starke Verflüssigung der S-LEC-Schicht auf dem Glasträger zurückzuführen. Durch die Elution des Polymers durch den DCM-Dampf kommt es aufgrund der Oberflächenspannung der S-LEC-DCM-Lösung zu einer Kontraktion der Beschichtung, was in den zu beobachtenden Defektstellen resultiert. Ein Vergleich der Fluoreszenz-Werte des gebildeten DiPhABI **55** zeigt, dass die Reaktion auch nach 30 min noch nicht vollständig abgeschlossen zu sein scheint, da bei einer längeren Inkubation der Oberflächen von 45 min eine Zunahme der Fluoreszenzintensität nachzuweisen war. Dennoch erreicht die maximale Fluoreszenzintensität lediglich die Hälfte der Intensität, welche bei einer Reaktionsführung durch Inkubation der Syntheseoberfläche bei 90 °C erreicht werden konnte (vgl. Tab 13). Bei einer Untersuchung der Spotumrisse fällt auf, dass die Reaktionsführung im Lösungsmitteldampf zu unscharfen Reaktionsspots führt. Sowohl die verringerte Fluoreszenzintensität als auch die unscharfen Spotumrisse können zum einen auf eine verstärkte laterale Diffusion der Reaktionsspots durch die Verflüssigung der Transferschichten, zum anderen auch auf eine unzureichende Fokussierung des Fluoreszenzscanners durch die Zerstörung der Akzeptorbeschichtung zurückgeführt werden. Bereits bei der Kupplung von nicht-aktivierten Aminosäuren an eine funktionalisierte Oberfläche konnte festgestellt werden, dass die Inkubation der Oberflächen im Lösungsmitteldampf nicht ausschließlich zur Verbesserung der Kupplungsqualität führt.¹¹ Beim Übertrag von Fmoc-Gly-OH sowie verschiedenen Aktivierungsreagenzien konnte keine homogene Anknüpfung der Aminosäure an die Oberfläche erreicht werden. Analog zu diesen Ergebnissen kann auch bei einer anknüpfungsfreien Synthese von Fluorophoren keine Verbesserung der Spotqualität durch die Reaktionsführung im Lösungsmitteldampf erreicht werden. Durch eine mögliche 3D-Strukturierung der verwendeten Syntheseoberfläche kann gegebenenfalls in Zukunft eine solche Syntheseführung ermöglicht werden, wenn längere

Reaktionszeiten ohne eine Zerstörung der Akzeptorbeschichtung gewährleistet werden können (s. Ausblick Kap. 5.4.).

4.2.5.3. Untersuchung der Abhängigkeit der Reaktionsqualität von der übertragenen Materialmenge

Die beim Lasertransfer übertragene Materialmenge hängt von zahlreichen Parametern ab. Unter anderem spielen bislang nicht identifizierte, stoffspezifische Eigenschaften eine wichtige Rolle (vgl. Kap. 4.1.6.). Aufgrund dessen ist die individuelle Optimierung der übertragenen Materialmenge ein sowohl material- als auch zeitaufwendiger Prozess. In Kap. 4.1.4.2. konnte anhand der Kupplung von lasertransferiertem Fmoc-Gly-OPfp **27** an einer NH₂-β-Ala-10:90-PEGMA-co-MMAoberfläche gezeigt werden, dass die Kupplungsqualität der Aminosäure jedoch nicht von der übertragenen Materialmenge abhängt. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass die Optimierung der übertragenen Materialmenge einzelner Stoffe ggf. zu keiner Verbesserung der Qualität der durchgeführten Reaktionen führt. Im Folgenden wurde daher untersucht, inwieweit die Qualität einer laserunterstützten Synthese von der übertragenen Materialmenge abhängt. Für dieses Experiment wurde DiPhABI **55** mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der Edukt-Donoren synthetisiert. Einerseits wurden Donoren mit einem Gewichtsanteil von 10 w% der eingebetteten Edukte verwendet. Zusätzlich wurden Donoren mit lediglich 5 w% der eingebetteten Edukte hergestellt.

Zunächst wurde der Materialübertrag unter Verwendung der entsprechenden Donoren per VSI untersucht und die maximal übertragene Spothöhe auf einer gereinigten Glasoberfläche festgestellt. Die Ergebnisse der VSI-Messung sind in Tabelle 14 aufgeführt und decken sich mit den in Kap. 4.1.6. detektierten Spothöhen.

Tabelle 14: Maximal detektierte Spothöhen der verwendeten Edukte bei unterschiedlicher Donorbeschichtung.

Stoffname	Maximale Spothöhe [nm]	
	10 w% Donoren	5 w% Donoren
DiPhABA	15	10
1,3-Indandion	2	n. b.
DMAN	10	2

Anschließend wurde die laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** unter Verwendung der verschiedenen Donoren durchgeführt. Beim Lasertransfer wurde zunächst DiPhABA **29** als erste Lage auf einen S-LEC-beschichteten Akzeptor übertragen. Anschließend wurde

1,3-Indandion **30** und zuletzt DMAN **62** transferiert. Das Transfurmuster ist in Abbildung 50 aufgeführt. Die übertragenen Edukte wurden nach dem Transfer in einem Hitzeschritt zur Reaktion gebracht. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Akzeptoren per Fluoreszenz-Scan ausgewertet. Der Fluoreszenz-Scan ist in Abbildung 51 dargestellt.

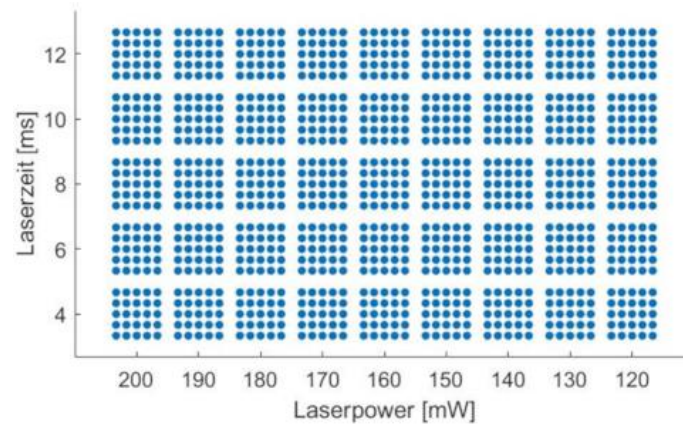


Abbildung 50: Lasermuster zur Untersuchung der Synthesequalität von DiPhABI in Abhängigkeit der übertragenen Eduktmenge.

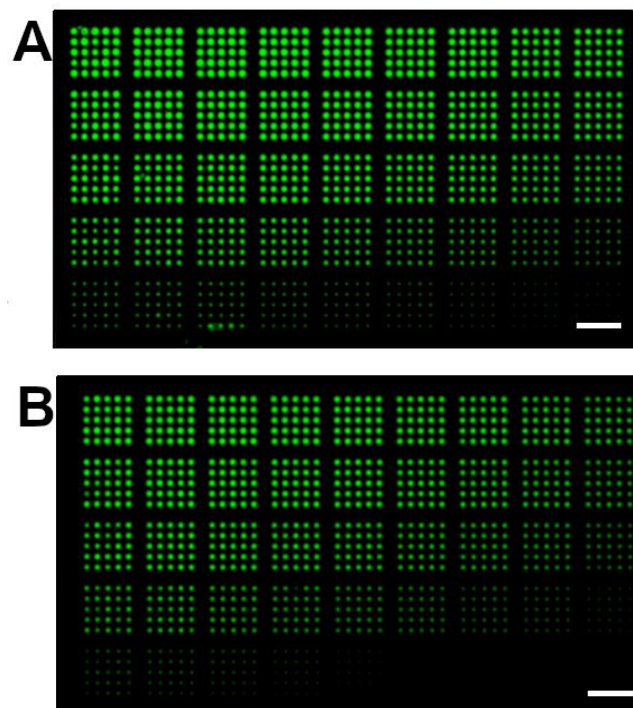


Abbildung 51: Fluoreszenzaufnahme der Synthese von DiPhABA 29 in Abhängigkeit der übertragenen Eduktmenge. A: Synthese unter Verwendung von 10 w%-Donoren. B: Synthese unter Verwendung von 5 w%-Donoren. Aufnahmeparameter: Maßstab: 1,00 mm. Aufnahmeparameter: Auflösung: 5 μm . Anregung: 488 nm, Filter: 615 \pm 10 nm, PMT: 0,05.

Ein Vergleich von Abbildung 51A und 51B zeigt, dass die übertragene Materialmenge auch bei der Durchführung von anknüpfungsfreien Reaktionen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Auch bei der Verwendung von Donoren, welche mit nur 5 w% Transfermaterial beschichtet wurden, konnte dieselbe Fluoreszenzintensität von ca. 25.000 AU detektiert werden. Die Durchmesser der generierten Spots hingegen korrelieren mit der in der Donorbeschichtung eingebetteten Materialmenge. Spots, welche unter Verwendung von 10 w%-Donoren erzeugt wurden, wiesen im Mittel 12,5% größere Durchmesser auf, als die Spots von 5 w%-Donoren. In Anbetracht der vergleichbaren Fluoreszenzintensität der beiden Reaktionsansätze ist davon auszugehen, dass die Variation der Spotdurchmesser eher auf die allgemeine Zunahme der Durchmesser von Transferspots bei einem verstärkten Materialtransfer, als auf die tatsächlich übertragene Materialmenge zurückzuführen ist (vgl. Kap. 4.1.3.).

Selbst bei Reaktionen, bei denen kein Übertrag der Edukte im VSI zu detektieren war, konnte eine intensive Fluoreszenz des gebildeten Reaktionsproduktes festgestellt werden (Abb. 51 bzw. Tab. 14). Diese Beobachtung deckt sich mit der Kupplung von aktivierten Aminosäuren an funktionalisierten Syntheseoberflächen (Kap. 4.1.4.2.). Daraus ist zu schließen, dass die übertragene Materialmenge nicht der ausschlaggebende Faktor bei der Durchführung laserunterstützter Synthesen ist. Aufgrund dieser Beobachtung wurde in den folgenden Versuchen keine Optimierung der übertragenen Materialmengen durchgeführt. Stattdessen wurden die Transferparameter anhand der Fluoreszenz bei verschiedenen Transfereinstellungen ausgewählt.

4.2.6. Materialtransfer unter Verwendung definierter Abstände zwischen Donor und Akzeptor

Der Transfermechanismus des nano3D-Lasersystems basiert auf einem Kontaktverfahren. Dabei dehnt sich die Kaptonbeschichtung des Donors nach der Absorption des Laserimpulses in Richtung der Akzeptoroberfläche aus. Wird ausreichend Energie absorbiert, tritt die Hitzeblase des Donors in Kontakt mit dem Akzeptor. Nach der Rückbildung der Hitzeblase bleiben nanometerdicke Materialschichten auf dem Akzeptor zurück (s. Kap. 4.1.3.). Untersuchungen des Materialtransfers über einen definierten Abstand konnten zeigen, dass der Donor für einen homogenen Materialübertrag aus diesem Grund in unmittelbare Nähe des Akzeptors gebracht werden muss.^{12, 71} In der Regel wird dies durch das direkte Auflegen des Donors auf den Akzeptor erreicht. Jedoch konnte auch unter über Abstände von bis zu 40 µm ein ausreichend homogener Übertrag nachgewiesen werden⁷¹.

Vor allem bei der Verwendung von flüssigen Transfermaterialien, welche beispielsweise in der chemischen Synthese verwendet werden konnten, in der Vergangenheit jedoch zahlreiche Probleme festgestellt werden. Einerseits gestaltet sich die Donorherstellung bei Flüssigkeiten

deutlich schwieriger, da die Transferschicht nicht vollständig trocknen kann bzw. darf. Ein zu hoher Anteil an Restflüssigkeit in der Transferschicht führt beim Transferprozess dazu, dass der aufgelegte Donor am Akzeptor festklebt. Selbst die Reduzierung der Konzentration von Flüssigen Transfermaterialien in der Donorbeschichtung führt in vielen Fällen zu einem unspezifischen Übertrag während des Transferprozesses. Beispielsweise konnte Daniela Mattes bei der Kupplung von nicht aktivierten Aminosäuren zeigen, dass durch den anschließenden Transfer von DIC **5** als Kupplungsreagenz auch in benachbarten Spots eine Kupplung der Aminosäuren verifiziert werden konnte, ohne dass an diesen Stellen ein DIC-Transfer stattfand. Es wird daher vermutet, dass Flüssigkeiten von der Transfermatrix nicht vollständig zurückgehalten werden können bzw. während des Auflegens des Donors auf den Akzeptor allein durch den Dampfdruck über die Diffusion in der Gasphase übertragen werden.¹¹

Robin Rastetter verglich in seiner Masterarbeit verschiedene Basenkatalysatoren für eine KNOEVENAGEL-Kondensation zur Herstellung von Fluorophoren. Dabei konnte er zeigen, dass die Reaktion unter Verwendung von DMAN **62** im Vergleich zu Piperidin zu einer Verbesserung der Homogenität sowie der detektierten Fluoreszenzintensität führt. Aufgrund des niedrigen Siedepunkts von Piperidin bei 106 °C wird angenommen, dass dieses während des Transfers bzw. während der Reaktionsphase bei 90 °C verdunstet.¹⁰⁶

Für eine umfassende Anwendung des Lasersystems zur Herstellung großer Bibliotheken ist es jedoch notwendig, eine Vielzahl unterschiedlicher Stoffe übertragen zu können. Vor allem bei Flüssigkeiten oder Stoffen mit geringen Schmelzpunkten besteht deshalb Optimierungsbedarf.

Im Folgenden soll aus diesem Grund untersucht werden, ob der Übertrag von Materialien über einen definierten Abstand zwischen Donor und Akzeptor zu einer Verbesserung bei der Verwendung von flüssigen Transfermaterialien führt. Um den Lasertransfer über Distanz bewerten zu können, wurde die Synthese von DiPhABI **55** bei verschiedenen Donor-Akzeptor-Abständen betrachtet. Als Abstandshalter wurden Edelstahlbänder (Hasberg-Präzisionsstreifen) mit Dicken von 10 µm, 20 µm sowie 30 µm verwendet (s. Abb. 52).



Abbildung 52: Schematischer Versuchsaufbau für einen Lasertransfer über Distanz. Als Spacer wurden Hasberg-Präzisionsfolien unterschiedlicher Dicke verwendet.

Auf diese Weise wurden DiPhABI **55**, 1,3-Indandion und DMAN nacheinander übertragen und die so aufgebauten Reaktionsstapel im Ofen zur Reaktion gebracht. Per Fluoreszenz-Analyse wurde im Anschluss die Qualität der Synthesespots untersucht. Die Fluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 53 dargestellt.

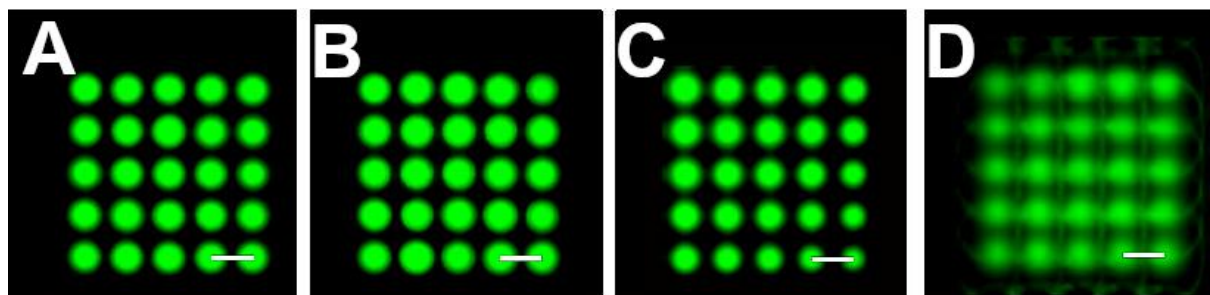


Abbildung 53: Fluoreszenzanalyse der Kondensationsreaktion von DiPhABI **55** unter Anwendung verschiedener Donor-Akzeptor Abstände. A: Direktes Auflegen des Donors (Abstand 0 μm). B: Synthese über einen Abstand von 10 μm . C: Synthese über einen Abstand von 20 μm . D: Synthese über einen Abstand von 30 μm . Aufnahmeparameter: Auflösung 5 μm , Anregung: 488 nm, Emissionsfilter: 615 ± 10 nm, PMT: 0,05. Maßstab: 250 μm .

Der Vergleich verschiedener Donor-Akzeptor-Abstände bei der Synthese von DiPhABI zeigt wie erwartet eine Abnahme der Spotqualität bei zunehmendem Spaltdicke. Beim Übertrag der Edukte über einen Abstand von 10 μm (Abb. 53B) kann kein Unterschied zu einer direkten Auflage der Donoren auf die Syntheseoberfläche (Abb. 53A) festgestellt werden. Die Verwendung von Abstandshaltern mit 20 μm Dicke resultiert in einer stärkeren Varianz der Spotdurchmesser (vgl. Abb. 53C), jedoch ohne eine messbare Abnahme der Fluoreszenz. Bei einer weiteren Vergrößerung des Abstandes der Donoroberfläche zum Akzeptor kann eine deutliche Abnahme der Spotqualität festgestellt werden (Abb. 53D). Einerseits nimmt die detektierte Fluoreszenz deutlich ab. Im Vergleich zu einem direkten Auflegen des Donors ohne Abstandshalter kann nur noch rund 60 % der entsprechenden Fluoreszenz detektiert werden. Des Weiteren kann die Ausbildung sog. Sattellitenringe beobachtet werden. Diese Ringe treten vor allem bei einem zu großen Abstand des Donors zum Akzeptor auf^{12, 71}. Bei diesen Abständen kann in der Regel keine aussagekräftige Analyse einzelner Spots mehr durchgeführt werden.

Dieser Versuch zeigt, dass eine laserunterstützte Synthese bis zu einem Abstand des Donors von der verwendeten Syntheseoberfläche von bis zu 20 μm erfolgreich durchgeführt werden kann. Als nächster Schritt wurde der Übertrag von Flüssigkeiten untersucht. Beim Übertrag von DIC **5** ist bereits bekannt, dass das direkte Auflegen des DIC-Donors zu einer

weitreichenden Kontamination der Syntheseoberfläche führt.¹¹ Aus diesem Grund wurde die Kupplung von übertragenem Fmoc-Gly-OH **28** an eine NH₂-β-Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche durch den zusätzlichen Transfer von DIC **5** als Kupplungsreagenz bei verschiedenen Abständen betrachtet. In diesem Versuch wurden erneut Hasberg-Streifen der Dicke 10 μm sowie 20 μm als Abstandshalter verwendet. Als Referenzkontrollen wurden Fmoc-Gly-OPfp **27** sowie Fmoc-Gly-OH **28** ohne zusätzliches DIC **5** auf eine zweite Oberfläche übertragen. Nach erfolgtem Lasertransfer wurden die Syntheseoberflächen im Ofen inkubiert, um eine Kupplung der Aminosäuren zu ermöglichen. Die Kupplung wurde im Anschluss durch eine Fluoreszenzfärbung der Aminosäuren mit TAMRA-NHS überprüft. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 55-58 dargestellt.

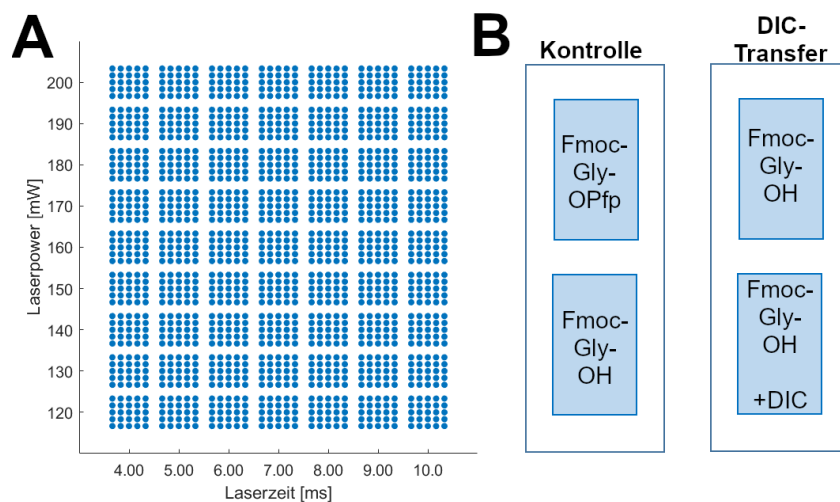


Abbildung 54: Lasermuster und Oberflächen zur Untersuchung des DIC-Transfers über definierte Abstände zwischen Donor und Akzeptor. A: Lasermuster. B: Transferlayout der Oberflächen.

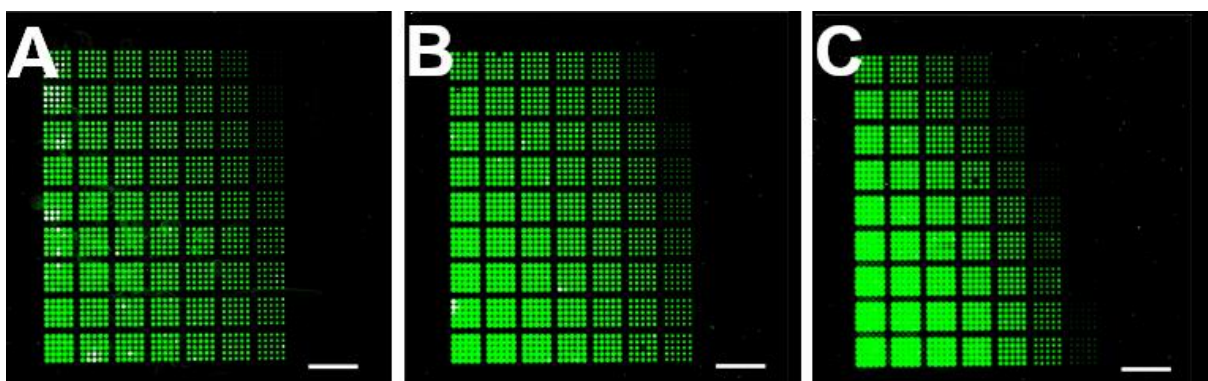


Abbildung 55: Transfer und Kupplung von Fmoc-Gly-OPfp **27** (Kontrolloberfläche). Vergleich des Transfers über verschiedene Donor-Akzeptor-Abstände. A: Transferabstand: 0 μm. B: Transferabstand: 10 μm. C: Transferabstand: 20 μm. Aufnahmeparameter: Auflösung 5 μm, Anregung: 532 nm, Emissionsfilter: 587±37,5 nm, PMT: 1,0. Maßstab: 1,00 mm.



Abbildung 56: Transfer und Kupplung von Fmoc-Gly-OH **28** (Kontrolloberfläche). Vergleich des Transfers über verschiedene Donor-Akzeptor-Abstände. A: Transferabstand: 0 μm . B: Transferabstand: 10 μm . C: Transferabstand: 20 μm . Aufnahmeparameter: Auflösung 5 μm , Anregung: 532 nm, Emissionsfilter: $587\pm 37,5$ nm, PMT: 1,0. Maßstab: 1,00 mm.

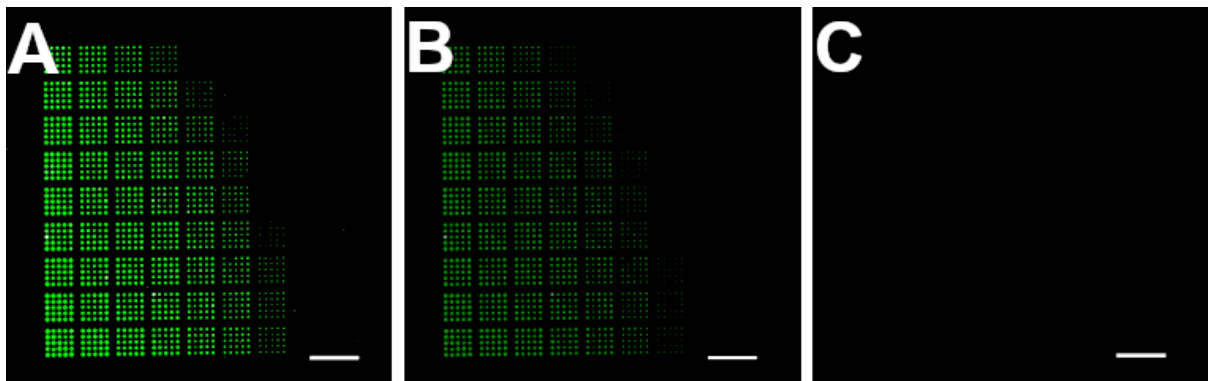


Abbildung 57: Transfer und Kupplung von Fmoc-Gly-OH **28** unter Verwendung eines zusätzlichen Transfers von DIC **5**. Vergleich des Transfers über verschiedene Donor-Akzeptor-Abstände. A: Transferabstand: 0 μm . B: Transferabstand: 10 μm . C: Transferabstand: 20 μm . Aufnahmeparameter: Auflösung 5 μm , Anregung: 532 nm, Emissionsfilter: $587\pm 37,5$ nm, PMT: 1,0. Maßstab: 1,00 mm.

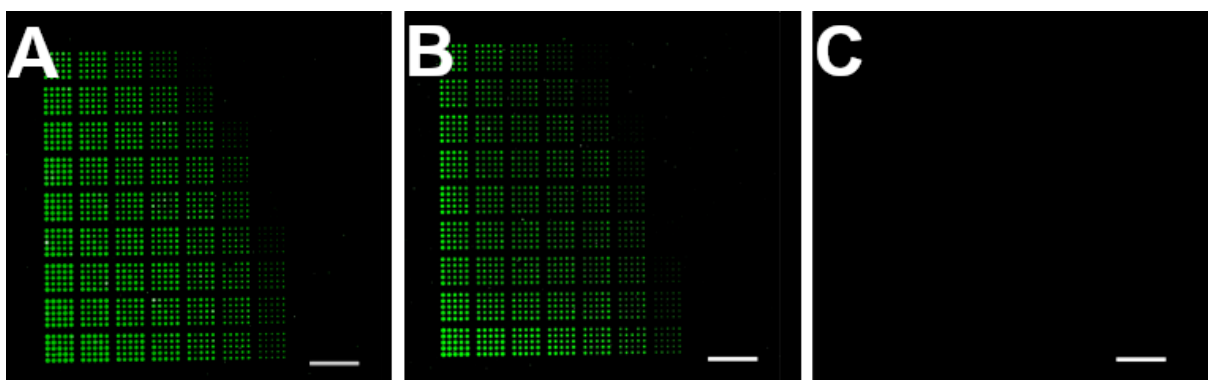


Abbildung 58: Transferpositionen zur Untersuchung der Diffusion von DIC **5** nach dem Lasertransfer. Vergleich des Transfers über verschiedene Donor-Akzeptor-Abstände. A: Transferabstand: 0 μm . B: Transferabstand: 10 μm . C: Transferabstand: 20 μm . Aufnahmeparameter: Auflösung 5 μm , Anregung: 532 nm, Emissionsfilter: $587\pm 37,5$ nm, PMT: 1,0. Maßstab: 1,00 mm.

Die Auswertung der Referenzoberflächen (Abb. 55 und 56) zeigt, dass Fmoc-Gly-OPfp **27** bis zu einem Abstand von 20 μm übertragen und an die Oberfläche gekuppelt werden kann (Abb. 55C). Durch die Zunahme der Spotdurchmesser bei größeren Abständen von Donor und Akzeptor kommt es jedoch vor allem bei hohen Transferparametern (Laserleistung: > 150 mW bzw. Laserzeit: > 7 ms) zu einer Überlappung der Transferspots und somit zu einem Verlust der Ortsinformation (Abb. 55C). Beim Übertrag von Fmoc-Gly-OH **28** (Abb. 56) konnte wie erwartet bei keiner Oberfläche eine Kupplung detektiert werden. Durch den zusätzlichen Übertrag von DIC **5** konnte eine Kupplung von Fmoc-Gly-OH **28** nachgewiesen werden (Abb. 57). Dabei war eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei zunehmendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor zu beobachten. Im Gegensatz zum Transfer von Fmoc-Gly-OPfp **27** (Abb. 55) konnte zudem eine Abnahme der Spotdurchmesser bei größeren Abständen festgestellt werden. Beim Übertrag über einen Abstand von 20 μm konnte keine Kupplung von Fmoc-Gly-OH **28** mehr festgestellt werden (Abb. 57C). Diese Beobachtung spricht dafür, dass DIC **5** über einen Abstand von bis zu 10 μm erfolgreich übertragen werden konnte, die Transferqualität jedoch mit zunehmendem Abstand abnimmt. Abbildung 58 zeigt die Kontrollpositionen zur Untersuchung der Diffusion des DIC **5** nach dem Lasertransfer. Hier wurde zunächst Fmoc-Gly-OH **28** übertragen. Im Anschluss wurde DIC an anderer Stelle der Synthesoberfläche transferiert (vgl. Abb. 57) nach der Kupplungsphase im Ofen konnte dennoch die Anknüpfung der übertragenen Aminosäure festgestellt werden. Dies zeigt, dass DIC **5** beim Transfer bzw. während der Kupplungsphase stark diffundiert und somit zu einer Kontamination weiterer Transferspots führte. Dieser Effekt war sowohl bei einer direkten Auflage des DIC-Donors (Abb. 58A) als auch bei einem Transfer über einen Abstand des Donors zum Akzeptor von 10 μm zu beobachten (Abb. 58B). Bei einem Übertrag über einen Abstand von 20 μm konnte keine Kupplung der Aminosäure nachgewiesen werden, was vermutlich daran liegt, dass bei diesem Abstand kein DIC mehr übertragen werden konnte (vgl. Abb. 57C).

Die Abstandsuntersuchungen zeigen, dass eine chemische Synthese sowie die Kupplung von Aminosäuren auch über einen Abstand des Donors zum Akzeptor von mehr als 10 μm möglich ist. Bei der Verwendung von Flüssigkeiten kann es dennoch zu einer unspezifischen Kontamination durch die Diffusion der Stoffe während einer Reaktionsphase unter Hitzeeinwirkung kommen (vgl. Abb. 58). Aus diesem Grund muss der Einsatz von flüssigen oder leicht flüchtigen Stoffen weiterhin im Voraus getestet werden, bis alternative Reaktionsbedingungen etabliert werden können.

Hauptteil

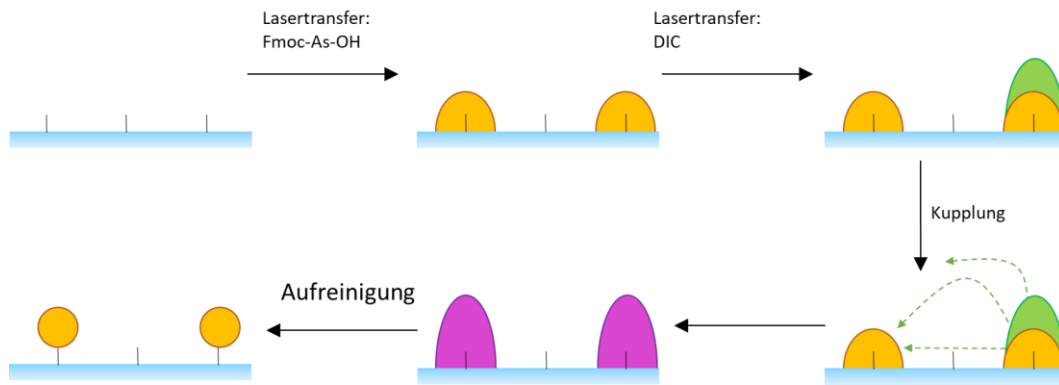


Abbildung 59: Unspezifische Kontamination von Spots bei der Verwendung von Flüssigkeiten anhand des Beispiels von DIC. Nach dem laserinduzierten Übertrag einer Aminosäure sowie von DIC kommt es während der Kupplungsphase zu einer Diffusion des transferierten DIC durch einen Übergang in die Gasphase. Durch diese Diffusion kommt es auch an benachbarten Reaktionssots zur Kupplung der Aminosäure an die Syntheseoberfläche.

4.2.7. Kombinatorische Synthese zur Herstellung eines Arrays fluoreszierender Moleküle

In den Kapiteln 4.2.2. – 4.2.5. wurde anhand von DiPhABI **55** gezeigt, dass eine anknüpfungsfreie Synthese kleiner Moleküle unter Verwendung des nano3D-Laserdruckers im Arrayformat möglich ist. Momentan können durch den laserinduzierten Übertrag der jeweiligen Reaktionsbausteine so Spotdichten von über 1000 Spots/cm² erreicht werden (s. Kap. 4.2.4.). Durch die Optimierung der Transferparameter zur Verringerung des Spotabstandes sind auch Spotdichten von bis zu 18 000 Spots/cm² möglich.¹⁰⁻¹² Im Folgenden soll das Lasersystem nun dazu verwendet werden, einen Array fluoreszierender Moleküle herzustellen. Für dieses Experiment sollten zahlreiche Edukte kombinatorisch übertragen werden. Nach einer hitzeinduzierten Reaktionsphase zur Durchmischung der erzeugten Materialstapel wurde der Array per Fluoreszenz-Scan untersucht und ausgewertet.

Die verwendeten Synthesebausteine sind in den Abbildungen 61 und 62 dargestellt. Die einzelnen Reaktionen wurden zu einer Mehrfachbestimmung in 25 Spots durchgeführt. Nach dem erfolgreichen Lasertransfer wurde der Array im Ofen inkubiert und anschließend per Fluoreszenz-Aufnahme ausgewertet. Abbildung 63 zeigt eine Fluoreszenz-Aufnahme des Arrays. In Tabelle 27 im Anhang (Kap. 11.) sind Literaturangaben der entsprechenden Syntheseprodukte aufgeführt und mit den gemessenen Emissionsbereichen in der laserunterstützten Synthese verglichen.

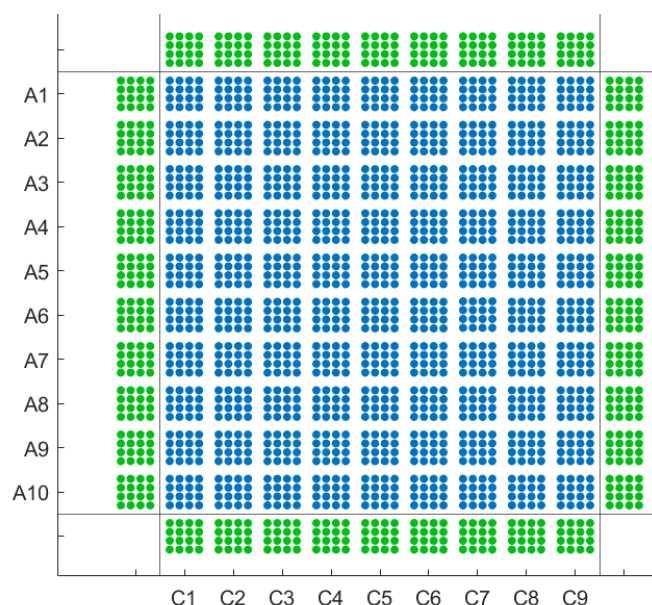


Abbildung 60: Lasermuster zur kombinatorischen Arraysynthese durch laserinduzierten Materialtransfer. Die verwendeten Aldehyde (A1-A10) wurden zeilenweise übertragen. Die verwendeten CH-Azide (C1-C9) wurden spaltenweise übertragen. Die eingesetzten Edukte wurden zusätzlich separat als Kontrollen (grün) übertragen.

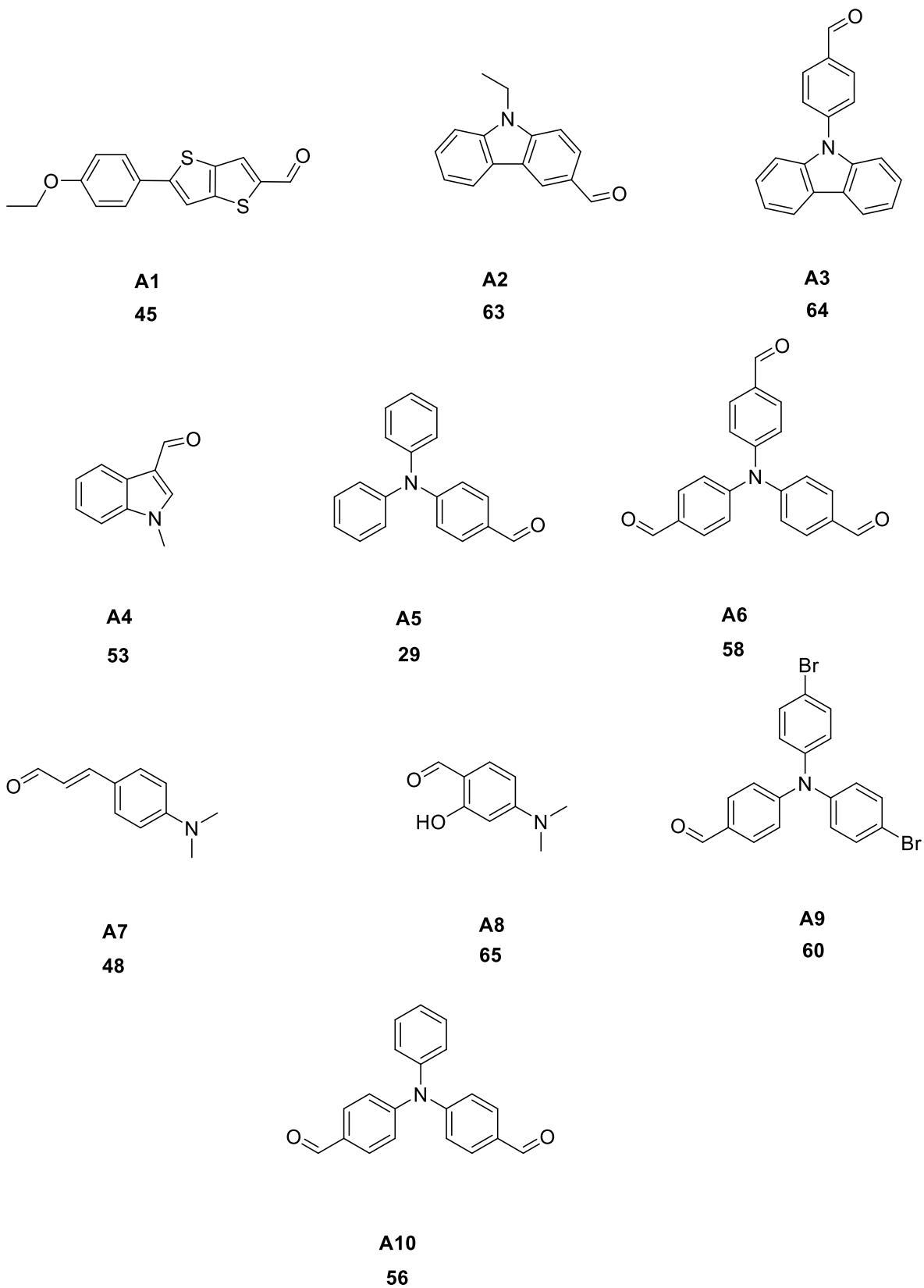
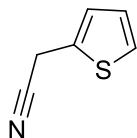
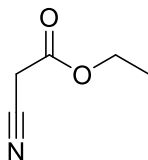


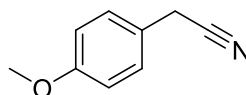
Abbildung 61: Strukturformeln der zur laserunterstützten Synthese eines Arrays fluoreszierender Moleküle verwendete Aldehyde.



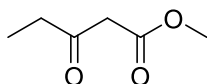
C1
65



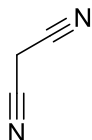
C2
66



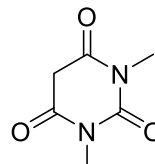
C3
67



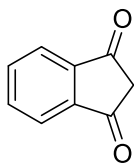
C4
68



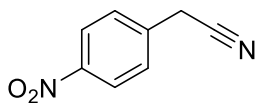
C5
46



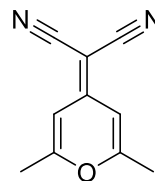
C6
69



C7
30



C8
70



C9
49

Abbildung 62: Strukturformeln der zur laserunterstützten Synthese eines Arrays fluoreszierender Moleküle verwendeten CH-Aziden Reaktionsbausteine.

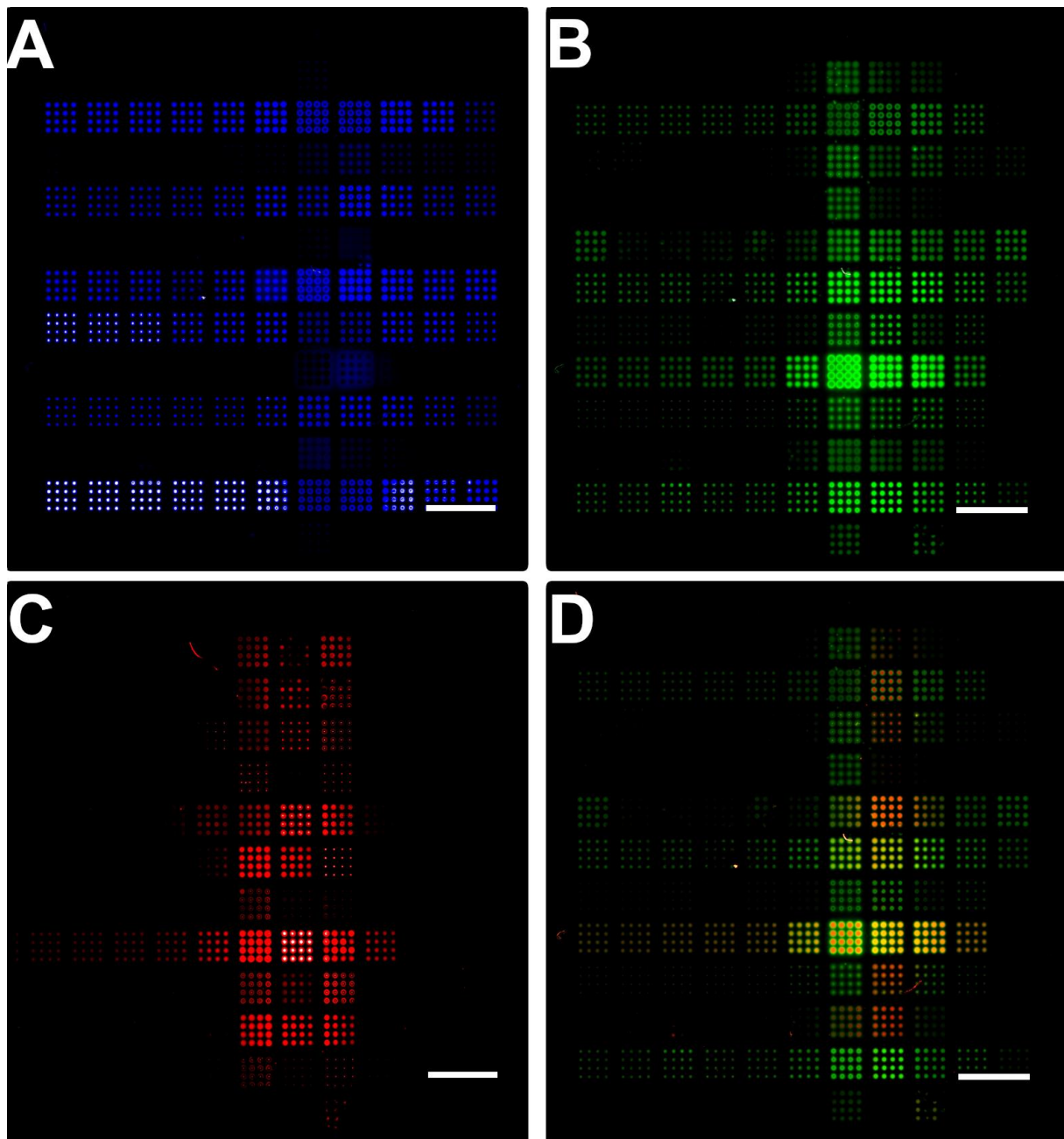


Abbildung 63: Fluoreszenzaufnahme eines kombinatorischen Molekülarrrays fluoreszierender Moleküle per laserinduziertem Materialtransfer. A: blauer Kanal ($520\pm 2,5$ nm). B: grüner Kanal (615 ± 10 nm) C: roter Kanal ($677\pm 22,5$ nm). D: Overlay aus rotem und grünem Fluoreszenzkanal. Aufnahmeparameter: Anregungswellenlängen: 488 nm, 532 nm, 635 nm. Emissionsfilter: $520\pm 2,5$ nm (PMT: 0,5), 615 ± 10 nm (PMT: 0,1), $677\pm 22,5$ nm (PMT: 0,8). Auflösung: 5 μm . Maßstab: 2,00 mm. Die Aufnahmen wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Die Analyse des Scans (Abb. 63) zeigt, dass ca. die Hälfte der gebildeten Reaktionsprodukte anhand ihrer Fluoreszenz verifiziert werden konnte. Vor allem die detektierte Fluoreszenz im blauen Kanal (Emissionsfilter: $520\pm 2,5$ nm) ist in vielen Fällen jedoch nicht auf das gebildete Produkt, sondern vielmehr auf die verwendeten Aldehyde C1, C3, C5, C6, C8 und C10

zurückzuführen. Dies wird vor allem durch die gleiche Fluoreszenzintensität der übertragenen Kontrollen der entsprechenden Aldehyde ersichtlich. Aus diesem Grund wurden für den Overlay des Fluoreszenz-Scans in Abbildung 63D nur die Aufnahmen aus dem grünen Kanal (Emissionsfilter: 615 ± 10 nm) und dem roten Kanal (Emissionsfilter: $677\pm 22,5$ nm) ausgewählt. Die detektierte Fluoreszenz der jeweiligen Positionen wurde zur Verifikation der einzelnen Reaktionsprodukte mit bekannten Emissionsdaten aus Literaturquellen verglichen. Die individuelle Auswertung aller Positionen ist in Tabelle 27 im Anhang aufgeführt. Im Folgenden werden ausgewählte Positionen diskutiert, um die Stärken und momentane Schwächen der laserinduzierten Synthese darzustellen.

Zunächst konnte durch den Array demonstriert werden, dass eine Vielzahl an unterschiedlichen Reaktionen erfolgreich durchgeführt werden konnte. In den Abbildungen 64A-64D sind beispielhaft die Synthesen der triphenylbasierten Fluorophore A5C7 (DiPhABI **55**), A6C7 (ATriBI **59**), A9C7 (DiBrPhABI **61**) und A10C7 (PhADiBI **57**), dargestellt. Die Synthesen dieser Fluorophore dienen unter anderem als ein Qualitätsmerkmal des Arrays, da vor allem die Synthese von A5C7 bzw. DiPhABI **55** als Modellreaktion zur Optimierung der laserunterstützten Synthese in den Kapiteln 4.2.2 – 4.2.5. gewählt wurde.

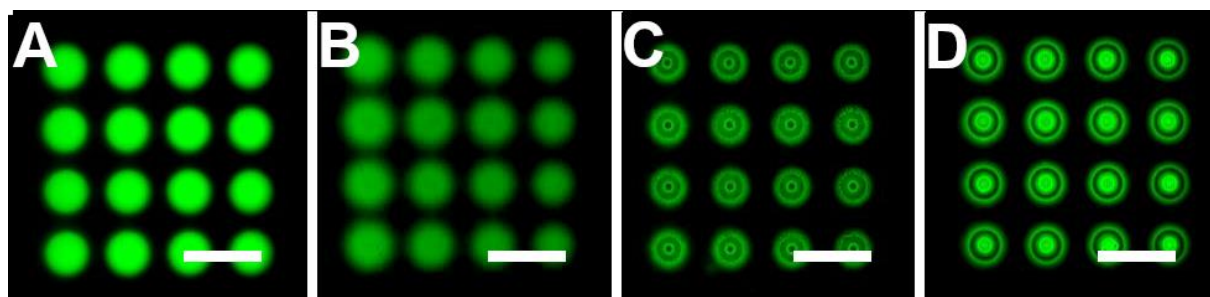


Abbildung 64: Detailaufnahme einzelner Reaktionen des kombinatorischen Molekülarrays. A: A5C7 (DiPhABI **55**), B: A6C7 (ATriBI **59**), C: A9C7 (DiBrPhABI **61**), D: A10C7 (PhADiBI **57**). Aufnahmeparameter: Anregung: 488 nm und 532 nm. Emissionsfilter: 615 ± 10 nm. PMT: 0,1. Auflösung: 5 μ m. Maßstab: 250 μ m. Die Aufnahmen wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.¹⁰⁸

Die Synthese von A5C7 (DiPhABI **55**) in Abbildung 64A weist dieselbe Qualität wie bereits in den Kapiteln 4.2.3.-4.2.5. auf. Aufgrund der starken Überlappung der Emissionsspektren der verschiedenen in Abbildung 64 dargestellten Fluorophore (vgl. Tab 11 Kap. 4.2.2.) kann lediglich die Bildung von DiPhABI **55** in Abbildung 64A und DiBrPhABI **61** in Abbildung 64C bestätigt werden. Bei der Synthese von PhADiBI **57** in Abbildung 64D und ATriBI **59** in Abbildung 64B muss von einem Gemisch der mono- und di- bzw. der mono-, di- und tri-Derivate ausgegangen werden, welche in einem Fluoreszenz-Scan jedoch nicht ohne weiteres unterschieden werden können. Bei der Spotform fallen vor allem bei der Synthese von

Hauptteil

DiBrPhABI **61** (Abb. 64C) und PhADiBI **57** (Abbildung 64D) Ringstrukturen auf. Diese erinnern an jene Ringstrukturen, welche beim Transfer über größere Abstände von Donor und Akzeptor auftreten (vgl. Kap. 4.2.6.). In den hier dargestellten Fällen ist jedoch keine Zunahme der Spotdurchmesser bzw. eine Abnahme der Spotqualität durch verschwommene Umrisse oder eine Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten. Es wird daher angenommen, dass dieser Effekt überwiegend auf eine unzureichende Durchmischung der Spots während der Reaktionsphase oder einen inhomogenen Materialübertrag der Aldehyde zurückzuführen ist. Des Weiteren wurde unter anderem die Synthese der Produkte A1C5 und A7C9 genauer betrachtet. Diese Reaktionsprodukte wurden bereits als Fluorophore **47** (A1C5) und **50/51** (A7C9) in Zusammenarbeit mit Robin Rastetter unter Verwendung eines 532 nm Lasersystems erfolgreich synthetisiert.¹⁰⁶ Die entsprechenden Detailaufnahmen sind in den Abbildungen 66 und 67 dargestellt.

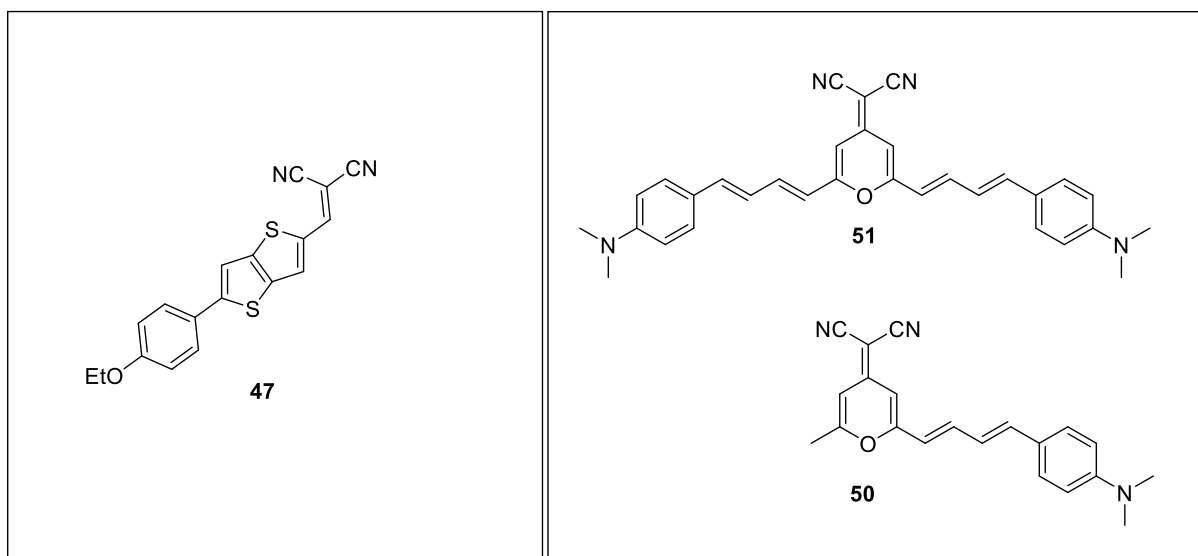


Abbildung 65: Strukturformeln der gebildeten Produkte A1C5 **47** und A7C9 **50** bzw. **51**.

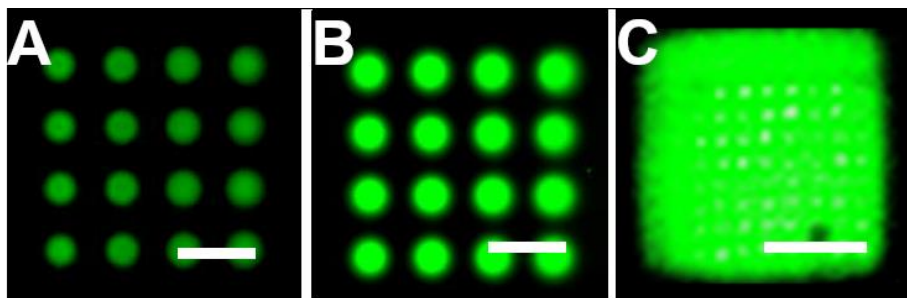


Abbildung 66: Detailaufnahme des Reaktionsansatzes A1C5 **47** des kombinatorischen Molekülarrays. A: Emissionsfilter: 615 ± 10 nm (PMT: 0,1). B: Emissionsfilter: $587\pm 37,5$ nm (PMT: 0,1). C: Flächiger Reaktionsansatz unter Verwendung eines 532 nm Lasersystems¹⁰⁶. Emissionsfilter: $587\pm 37,5$ nm (PMT: 0,1). Aufnahmeparameter: Anregungswellenlängen: 488 nm, 532 nm. Auflösung: 5 μm . Maßstab: 250 μm . Die Aufnahmen wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Abbildung 66A und 66B zeigen den Reaktionsansatz A1C5 des Thieno[3,2-b]thiophen-basierten Fluorophors **47** bei verschiedenen Aufnahmeparametern. Abbildung 66C zeigt im Vergleich dazu die Synthese des entsprechenden Fluorophors in einem flächigen Reaktionsansatz unter Verwendung eines 532 nm Lasersystems durch Robin Rastetter.¹⁰⁶ Der Vergleich der beiden Reaktionsansätze bestätigt, dass der Wechsel der Laserwellenlänge keinen Einfluss auf die generelle Durchführbarkeit laserunterstützter Synthesen spielt. In diesem Ansatz werden keine Nebenprodukte gebildet. Somit lässt sich die entstehende Fluoreszenz zur Gänze auf das gebildete Produkt **47**¹⁰⁷ zurückführen (vgl. dazu auch Abb. 30 Kap. 4.2.1.).

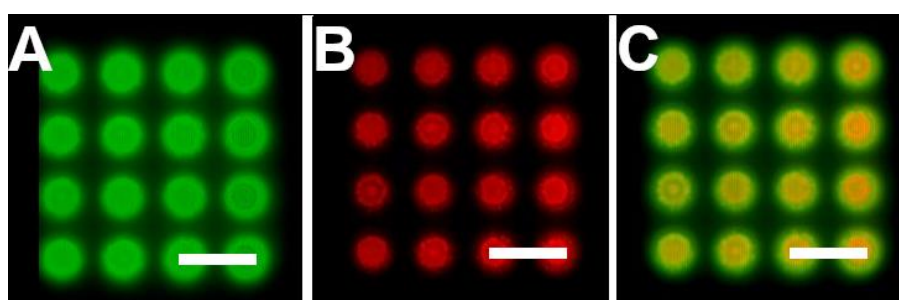


Abbildung 67: Detailaufnahme des Reaktionsansatzes A7C9 des kombinatorischen Molekülarrays. A: grüner Kanal (615 ± 10 nm) B: roter Kanal ($677\pm 22,5$ nm). C: Overlay aus rotem und grünem Fluoreszenzkanal. Aufnahmeparameter: Anregungswellenlängen: 488 nm, 532 nm, 635 nm. Emissionsfilter: 615 ± 10 nm (PMT: 0,1), $677\pm 22,5$ nm (PMT: 0,8). Auflösung: 5 μm . Maßstab: 250 μm . Die Aufnahmen wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Hauptteil

Die Reaktionsansätze unter Verwendung des Reaktionsbausteins C9 **49** resultieren ähnlich wie bereits in Abbildung 31 dargestellt in einem Reaktionsgemisch der mono- sowie disubstituierten Reaktionsprodukte. Bereits in der Masterarbeit von Robin Rastetter wurde der Umstand diskutiert, dass aufgrund der Bandbreite der zur Analyse verfügbaren Emissionsfilter die unterschiedlichen Floreszenzen nicht separat betrachtet werden können. Dennoch kann von der Bildung der beiden möglichen Fluorophore **50** und **51** ausgegangen werden, da sowohl im grünen Fluoreszenzkanal (Emissionsfilter: 615 ± 10 nm / λ_{em} (Fluorophor **50**): 636 nm¹⁰⁸) als auch im roten Kanal (Emissionsfilter: $677\pm 22,5$ nm / λ_{em} (Fluorophor **51**): 661 nm¹⁰⁸) deutliche Fluoreszenzintensitäten detektiert werden konnten. Neben den bereits ausführlich diskutierten Reaktionsansätzen konnten des Weiteren 26 Produkte anhand ihrer Fluoreszenz verifiziert werden (vgl. Tab 27 im Anhang Kap. 11.). Die Reaktionskontrolle via Fluoreszenz ist jedoch nur bedingt geeignet, um größere, kombinatorische Reaktionsansätze zu analysieren. Beispielsweise ist die Bildung von Produktgemischen wie beim Einsatz von Reaktionsbaustein C9 **49** anhand der Fluoreszenz nicht auszuschließen, da die entstehenden Produkte in vielen Fällen ähnliche Emissionseigenschaften aufweisen (vgl. Abb. 63). Ebenso ist bspw. bei der Synthese der Triphenylamin-basierten Fluorophore der Substitutionsgrad durch die Fluoreszenzanalyse per Scanner nicht ersichtlich. Die Verwendung von Emissionsfiltern deckt häufig einen breiten Wellenlängenbereich ab, wodurch überlappende Emissionsspektren bei denselben Aufnahmeparametern detektiert werden. Zusätzlich stehen bei der Verwendung von Fluoreszenz-Scannern (oder -Mikroskopen) nur definierte Wellenlängen zur Anregung der gebildeten Reaktionsprodukte zur Verfügung. Die meisten der kommerziell erhältlichen Fluoreszenz-Scanner im Bereich der Array-Analyse, wie der in dieser Arbeit verwendete InnoScan AL1100 (InnopSys, Frankreich), besitzen keine Anregungsmöglichkeit im UV-Bereich. Dies führt dazu, dass viele Fluorophore mit einem Anregungsmaximum unter 450 nm nicht angeregt und somit auch nicht per Fluoreszenzemission detektiert werden können. Ein Beispiel für eine solche Reaktion ist in Abbildung 69 anhand der Synthese von A2C5 **71** ($\lambda_{abs.}$: 416 nm, $\lambda_{em.}$: 490 nm¹²⁰) dargestellt.

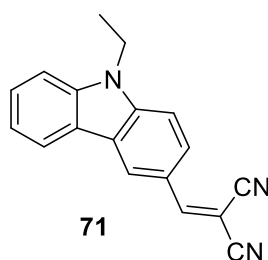


Abbildung 68: Strukturformel des Fluorophors A2C5 **71**.

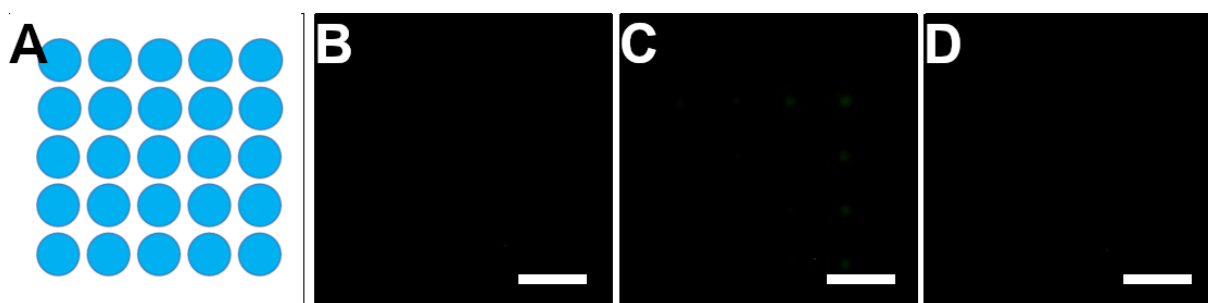


Abbildung 69: Fluoreszenzaufnahme der Syntheseposition A2C5. A: Lasermuster. B: blauer Kanal ($520\pm 2,5$ nm). C: grüner Kanal (615 ± 10 nm) D: roter Kanal ($677\pm 22,5$ nm). Aufnahmeparameter: Anregungswellenlängen: 488 nm, 532 nm, 635 nm. Emissionsfilter: $520\pm 2,5$ nm (PMT: 0,5), 615 ± 10 nm (PMT: 0,1), $677\pm 22,5$ nm (PMT: 0,8). Auflösung: 5 μ m. Maßstab: 250 μ m. Die Aufnahmen wurden in Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

Es ist davon auszugehen, dass bei einer potentiellen Anregung des Fluorophors A2C5 **71** eine Fluoreszenz im blauen Kanal zu detektieren wäre (Emissionsfilter $520\pm 2,5$ nm). Aufgrund der geringen Anregungswellenlänge von Fluorophor A2C5 **71** von 416 nm, kann dieses jedoch nicht durch die zur Verfügung stehenden Anregungswellenlängen des verwendeten Fluoreszenz-Scanners (488 nm, 532 nm, sowie 635 nm) angeregt werden. Somit kann bei diesem und verschiedenen weiteren Reaktionsansätzen (z.B.: A1C5, A2C8, A3C1, A5C5, etc.) keine Aussage über die Produktbildung getroffen werden.

Bei den Edukten C1 **65**, C2 **66** und C3 **67** handelt es sich um Flüssigkeiten, welche im jeweiligen Ansatz als letzte Schicht unter Verwendung von Abstandshaltern (Dicke: 20 μ m) zur Vermeidung von Kontaktkontaminationen beim Auflegen der Donoren übertragen wurden (vgl. Kap. 4.2.6.). Bei keinem Reaktionsansatz unter Verwendung der Edukte C1 **65**, C2 **66** und C3 **67** konnte eine Fluoreszenz, welche auf die Bildung eines Fluorophors während der Reaktionsphase zurückgeführt werden kann, detektiert werden. Es wird angenommen, dass hier entweder kein Materialübertrag stattgefunden hat (vgl. Kap 4.1.6.) oder die entsprechenden Stoffe während der Reaktionsphase im Ofen in die Gasphase übergegangen sind, und somit keine ausreichende Produktbildung stattfinden konnte. Eine weitere Erklärung ist die Bildung von Chromophoren statt Fluorophoren. Chromophore besitzen wie Fluorophore ein ausgeprägtes, konjugiertes π -Elektronensystem, weisen jedoch nicht zwingend fluoreszierende Eigenschaften auf.

In Abbildung 63 ist die erfolgreiche Synthese eines kombinatorischen Arrays durch den laserinduzierten Übertrag der entsprechenden Edukte dargestellt. Etwa 40-50 % der geplanten Reaktionsprodukte konnten erfolgreich per Fluoreszenzanalyse des Arrays detektiert werden. Durch die Synthese konnte bewiesen werden, dass das nano3D-Lasersystem in der Lage ist, eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle in ausreichendem Maße zu übertragen, sodass eine

chemische Umsetzung der Stoffe ermöglicht werden kann. Dennoch zeigt der Versuch auch, dass an verschiedenen Stellen eine Optimierung des Transfer- sowie des Analyse-Prozesses vonnöten ist. Einerseits muss ein definierter Übertrag von Flüssigkeiten gewährleistet werden, um einen umfassenden Einsatz des Lasersystems zur kombinatorischen Synthese zu ermöglichen. Andererseits müssen zusätzliche Analysemethoden etabliert werden, um eine zweifelsfreie Aussage über den Erfolg einer laserunterstützten Synthese zu treffen. Vor allem die Detektion von UV-Fluorophoren im Arrayformat sowie die Unterscheidung von Reaktionsprodukten mit ähnlichen Spektraleigenschaften (z.B. durch orts aufgelöste MALDI-MS) stellen die drängendsten Probleme in naher Zukunft dar.

4.3. Reaktionsnachweis über orts aufgelöste Massenspektrometrie

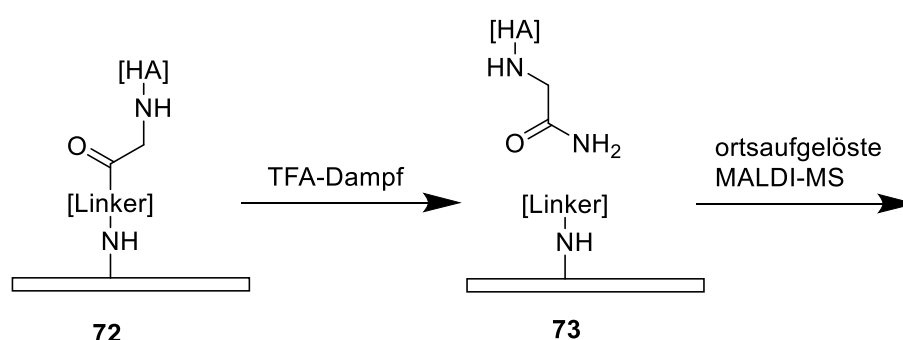
4.3.1. Vorarbeiten

Eine besondere Herausforderung bei der Analyse hochdichter Molekülarrays ist ein orts aufgelöster Reaktionsnachweis. In früheren Arbeiten wurden verschiedene Reaktionen unter Verwendung des Lasersystems durchgeführt und die dabei gebildeten Produkte auf unterschiedliche Arten verifiziert (vgl. Kap 4.2.1.). Unter anderem konnte die erfolgreiche Synthese des FLAG- bzw. HA-Peptids durch eine Immunfärbung mit fluoreszenz-markierten Antikörpern verifiziert werden.¹⁰ Antikörper zeichnen sich durch eine starke Selektivität gegenüber bestimmten Zielstrukturen aus.¹²¹⁻¹²² Aus diesem Grund kann eine Antikörper-Färbung als Nachweis ausgewählter Peptidsequenzen verwendet werden. Neben dem Nachweis durch Antikörper konnte auch eine direkte Markierung von Syntheseprodukten durch die Anknüpfung von Fluorophoren unter Verwendung bestimmter funktioneller Gruppen durchgeführt werden.^{10-11, 92, 123}

In vielen Fällen ist ein Reaktionsnachweis mittels Fluoreszenzmarkierung jedoch nicht möglich. Bei der Peptidsynthese können z.B. zahlreiche Sequenzen nicht selektiv detektiert werden. Außerdem ist eine direkte Markierung über Fluorophore oder andere Marker nur dann möglich, wenn entsprechende Gruppen zur Anknüpfung eines Fluorophors vorhanden sind. Fehlen diese Gruppen oder können nicht gezielt eingebaut werden, kann das Syntheseprodukt nicht über eine Fluoreszenzfärbung verifiziert werden.

Durch die Verwendung von spaltbaren Linkern war es dennoch möglich bestimmte Produkte flächig an der Oberfläche zu synthetisieren und diese nach dem Abspalten von der Oberfläche zu waschen. Die aufgefangenen Waschlösungen konnten wiederum über herkömmliche Analysemethoden wie HPLC, Massenspektroskopie oder Gaschromatographie analysiert werden^{10-11, 70}. Diese Nachweismethoden erlauben jedoch keine orts aufgelöste Analyse der Arrayoberflächen, da die Ortsinformation einzelner Spots beim Herunterwaschen verloren geht.

MALDI-MS-Imaging erlaubt es hingegen eine massenspektroskopische Untersuchung von Oberflächen ohne den Verlust der Ortsinformation durchzuführen (vgl. Kap. 2.4.4.).^{65, 67, 69} Daniela Mattes konnte unter Verwendung von orts aufgelöster Massenspektroskopie die Anknüpfung von Peptidsequenzen an einer funktionalisierten Oberfläche im Spotformat nachweisen.¹¹ Hierfür wurde die Oberfläche zunächst über einen Rink-Amid-Linker funktionalisiert. Anschließend wurde Fmoc-Gly-OPfp per Lasertransfer übertragen und gekuppelt. Nach der Anknüpfung eines HA-Peptids wurde der Linker durch Trifluoressigsäure (TFA) gespalten. Um den Verlust der Ortsinformation zu vermeiden, wurde die TFA in der Gasphase auf die Oberfläche geleitet. Das Reaktionsprodukt konnte anschließend per orts aufgelöster Massenspektrometrie verifiziert werden.



Schema 18: orts aufgelöster Massenachweis des Peptids HA-G-Amid **73** nach der Abspaltung von einem Rink-Amid Linker.

4.3.2. Nachweis anknüpfungsfreier Reaktionen

Ohne eine Anknüpfung der Produkte an die Syntheseoberfläche ist es nicht möglich die gebildeten Reaktionsprodukte über eine Fluoreszenzmarkierung nachzuweisen. Die fehlende Immobilisierung führt dazu, dass zum Nachweis übertragene Reporter-moleküle durch Waschstschritte nicht von der Oberfläche entfernt werden können, ohne auch die entsprechenden Produkte von der Syntheseoberfläche zu lösen. Das bedeutet, dass beim Transfer von fluoreszenten Stoffen zur Markierung bestimmter Stoffe lediglich der Übertrag der Fluorophore, keine selektive Färbung der Reaktionsprodukte detektiert werden kann.

Aus diesem Grund wurde unter anderem untersucht, ob es möglich ist anknüpfungsfreie Reaktionen allgemein durch ein Waschen der Oberfläche und einer anschließenden chromatographischen Analyse der entsprechenden Waschlösungen nachzuweisen. In diesem Fall bestand jedoch die Annahme, dass schon das Herablösen der übertragenen Materialien durch Lösungsmittel zu einer Reaktion führen könnte. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden DiPhABA **29** und 1,3-Indandion **30** auf eine Glasoberfläche transferiert. Die Oberfläche wurde direkt nach dem Lasertransfer ohne die Durchführung des Reaktionsschrittes mit

Acetonitril gewaschen und die Waschlösung per LC/MS auf die Bildung von DiPhABI **55** untersucht. Das Chromatogramm ist in Abbildung 70 dargestellt.

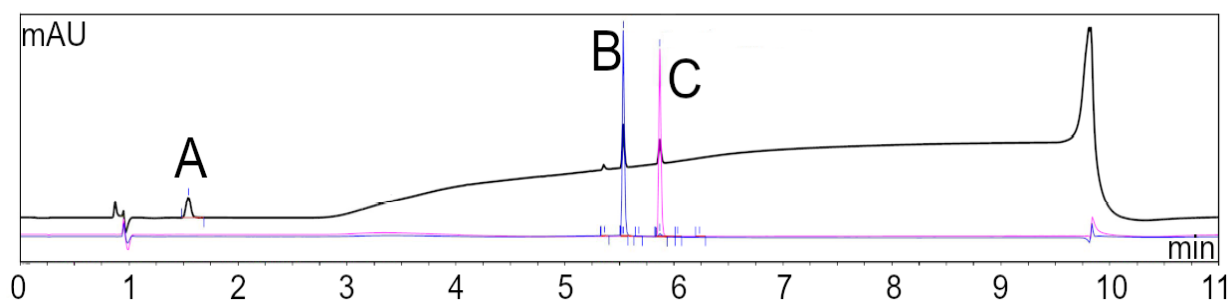


Abbildung 70: LC/MS-Chromatogramm des Transfers von 1,3-Indandion (A) und DiPhABA (B). Es konnte die Bildung des Reaktionsproduktes DiPhABI (C) nachgewiesen werden. Schwarz: Absorptionsmessung bei 225 nm, blau: Absorption bei 353 nm, pink: Absorption bei 461 nm.

Die Auswertung des Chromatogramms zeigt, dass schon das Waschen der Oberflächen ausreicht, dass DiPhABI **55** in nachweisbaren Mengen gebildet werden konnte. Die Analyse der einzelnen Peaks liefert eine detektierte Menge des DiPhABI **55** von 7.94 µg. Bei den transferierten Edukten konnte ein Übertrag von 9.78 µg 1,3-Indandion **30**, sowie 3.20 µg DiPhABA **29** detektiert werden. Somit konnte eine Reaktionsausbeute von 60% nachgewiesen werden. In Kap. 4.2.5.1. wurde jedoch festgestellt, dass bei dieser Reaktion keine Bildung des Produktes ohne die Durchmischung der übertragenen Edukte durch einen aktiv induzierten Reaktionsschritt beobachtet werden konnte. Das bedeutet, dass das Waschen der Synthesoberfläche die Reaktion der Edukte ermöglicht. Dieser Versuch demonstriert, dass eine Untersuchung von Waschlösungen als genereller Reaktionsnachweis anknüpfungsfreier Synthesen per Lasertransfer nicht geeignet ist.

4.3.3. Identifikation geeigneter Akzeptoroberflächen für einen ortsaufgelösten Massenachweis

Wie bereits erwähnt ist es mittels MALDI-MS-Imaging möglich eine ortsaufgelöste, massenspektroskopische Analyse von Substraten durchzuführen (s. Kap. 2.4.4.). Eine rasterförmige Untersuchung der Substratoberfläche ermöglicht es, sogenannte Ionen-Bilder zu erzeugen, die das lokale Vorkommen ausgewählter Molekülmassen im untersuchten Probenbereich darstellen. Die detektierten Molekülmassen können wiederum bestimmten Verbindungen zugeordnet werden.^{65, 67-68} In der Regel werden bei einer massenspektroskopischen Analyse via MALDI-MS Targets aus Edelstahl oder anderen

Metallen verwendet, auf welchen die zu analysierende Probe fixiert wird. Das hat den Hintergrund, dass durch die hohe Spannung, welche bei einer MALDI-Messung angewandt wird ein Transport der entstehenden Gegenionen von der Targetoberfläche gewährleistet werden muss, um ein gutes Signal/Hintergrund-Verhältnis zu erzeugen.¹²⁴ Durch die Verwendung von leitfähigen Klebefolien konnten auch verschiedene nicht-leitende Oberflächen soweit modifiziert werden, dass eine MALDI-MS Analyse ermöglicht werden konnte.¹²⁵⁻¹²⁷

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich MALDI-MSI zum Nachweis anknüpfungsfreier Synthesen unter Verwendung des nano3D-Lasersystems eignet. Neben dem zu übertragenden Material wird bei jedem Transferschritt zusätzlich die verwendete Transfermatrix transferiert. Aus diesem Grund muss zunächst überprüft werden, ob S-LEC, bei den angewandten Versuchsbedingungen im betrachteten Messbereich massenspektroskopisch detektiert werden kann. Für die automatisierte Analyse einer Vielzahl von Verbindungen im Arrayformat ist es notwendig, die bei der Messung detektierten Signale zweifelsfrei den entsprechenden Produkten zuordnen zu können. Das Auftreten von Messsignalen, die auf S-LEC zurückzuführen sind, verhindert jedoch diese Zuordnung. Eine massenspektroskopische Untersuchung des S-LEC-Polymers zeigte jedoch keine Massesignale im Messbereich von 500 – 14 000 m/z . Dies lässt sich auf die schlechte Ionisierbarkeit des Polymers zurückführen.

Nachdem mögliche S-LEC Signale während der MALDI-MSI-Analyse ausgeschlossen werden konnten, wurde untersucht inwiefern sich verschiedene Akzeptoroberflächen für einen massenspektroskopischen Nachweis lasertransferierter Stoffe eignen. Für dieses Experiment wurden die Aminosäuren Fmoc-Cys(Trt)-OPfp **74** (MW: 751.18 g/mol) und Fmoc-Asn(Trt)-OPfp **75** (MW: 762.22 g/mol) auf eine gereinigte Glasoberfläche, eine Indium-Zinnoxid (ITO) beschichtete sowie eine S-LEC-beschichtete Glasoberfläche übertragen.

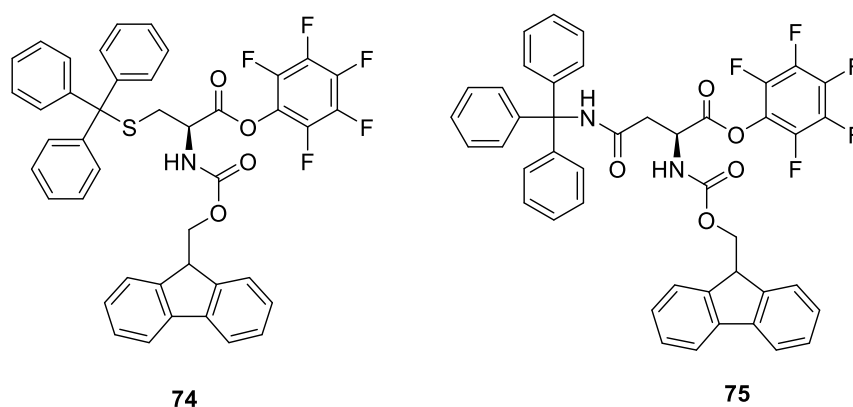


Abbildung 71: Strukturformeln der transferierten Aminosäuren Fmoc-Cys(Trt)-OPfp **74** sowie Fmoc-Asn(Trt)-OPfp **75**.

Der Lasertransfer wurde in geschlossenen Flächen aus 10x10 Spots bei einer Laserleistung von 170 mW und einer Laserzeit von 6,00 ms durchgeführt um eine Detektion durch die Raster-Auflösung des Massenspektrometers sicherzustellen. Nach dem Lasertransfer wurde die MALDI-Matrix 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) **78** über ein Sprühverfahren auf die Oberflächen aufgebracht (vgl. Abb. 72). Die Ergebnisse der massenspektroskopischen Untersuchung sind in den Abbildungen 73 und 74 aufgeführt.

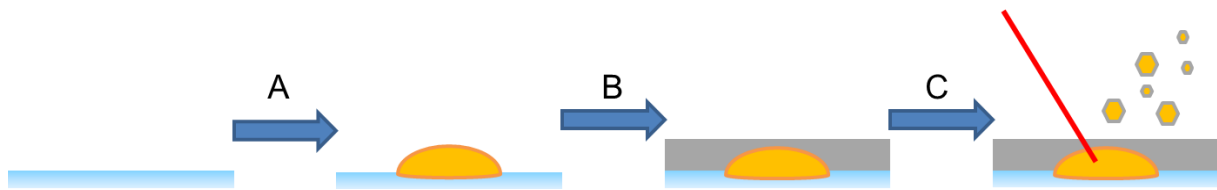


Abbildung 72: Probenvorbereitung zur massenspektroskopischen Untersuchung von lasertransferierten Stoffen. A: Lasertransfer auf eine Akzeptoroberfläche. B: Beschichtung des gesamten Akzeptors mit der MALDI-Matrix über ein Sprühverfahren. C: MALDI-MS-Messung

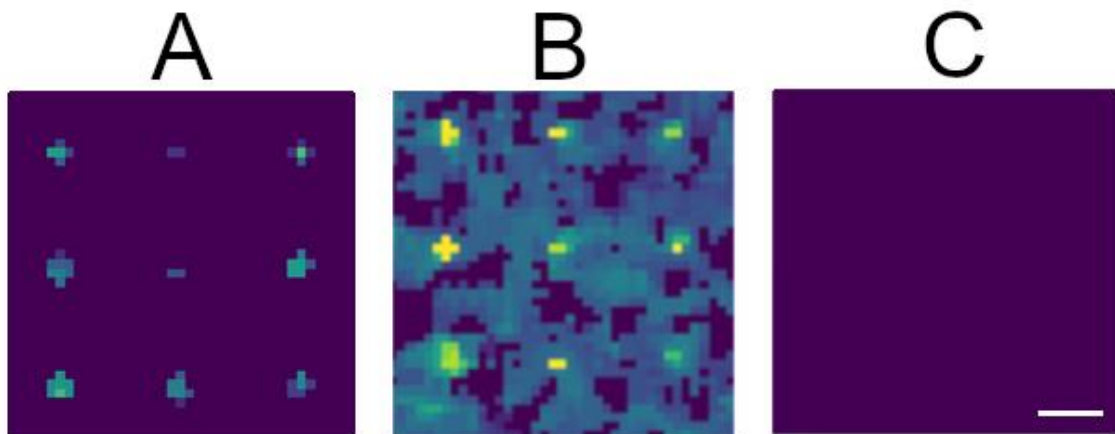


Abbildung 73: MALDI-Imaging-Aufnahme von Fmoc-Cys(Trt)-OPfp **74**. $m/z = [M+Na]^+$ ber.: 774.2, gef.: 774.2. A: Transfer auf Glas, B: Transfer auf ITO, C: Transfer auf S-LEC-Beschichtetes Glas. Verwendete MALDI-Matrix: 2,5-DHB. Maßstab: 1.00 mm.

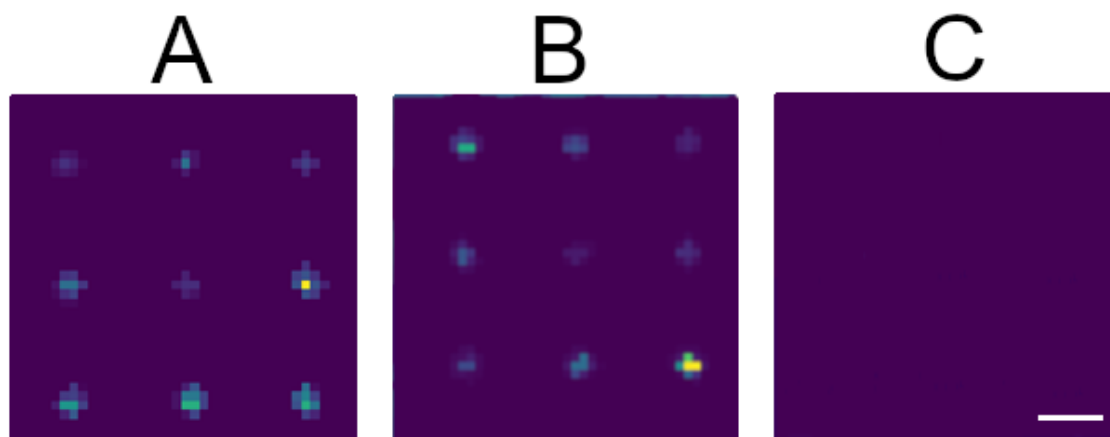


Abbildung 74: MALDI-Imaging-Aufnahme von Fmoc-Asn(Trt)-OPfp **75**. $m/z = [M+Na]^+$ ber.: 785.2, gef.: 785.2. A: Transfer auf Glas, B: Transfer auf ITO, C: Transfer auf S-LEC-Beschichtetes Glas. Verwendete MALDI-Matrix: 2,5-DHB. Maßstab: 1.00 mm.

Die Auswertung der Ionenbilder zeigt, dass der Übertrag der Aminosäuren erfolgreich massenspektroskopisch verifiziert werden konnten. Unter Verwendung einer Glasoberfläche konnten beide Aminosäuren mit einem guten Signal/Hintergrundverhältnis detektiert werden. Die Verwendung eines ITO-beschichteten Akzeptors führte zwar zu einer allgemeinen Zunahme der detektierten Signalintensität um den Faktor 10 (Intensität auf Glas: 2.000 – 4.000 im Gegensatz zu ITO: ca. 50.000), jedoch konnte vor allem Fmoc-Cys(Trt)-OPfp **74** nur schlecht detektiert werden (vgl. Abb. 73B). Die schlechte Nachweisqualität des übertragenen Fmoc-Cys(Trt)-OPfp **74** lässt sich auf einen verringerten Materialtransfer unter Verwendung eines ITO-beschichteten Glaträgers zurückführen. Beim Übertrag auf einen S-LEC-beschichteten Akzeptor konnte kein massenspektroskopischer Nachweis der Aminosäuren erbracht werden. Der Übertrag konnte jedoch über VSI-Untersuchungen bestätigt werden. Diese Beobachtung lässt sich sowohl durch den sog. *Matrix-Effekt* bei MALDI-MS-Messungen sowie die isolierende Eigenschaft des S-LEC-Polymeren erklären. Der *Matrix Effekt* beschreibt eine unterdrückte Ionisierung von Molekülen während einer MALDI-MS-Messung durch das Vorhandensein von Polymeren oder schwer flüchtigen Lösungsmitteln.¹²⁸

Während der Optimierung der laserunterstützten Synthese von DiPhABI **55** konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung der Syntheseoberfläche mit S-LEC jedoch zu einer deutlichen Verbesserung der Spotqualität und einer Zunahme der durch das Reaktionsprodukt hervorgerufenen Fluoreszenz führt. (Kap. 4.2.3.) Es wurde angenommen, dass die S-LEC-Beschichtung des Akzeptors Entnetzungseffekten entgegenwirkt und eine verbesserte Durchmischung der übertragenen Materialschichten während der Reaktionsphase begünstigt.

Aus diesem Grund wurde überprüft, ob durch eine Variation der Beschichtungsdicke dennoch ein massenspektroskopischer Nachweis lasertransferierter Materialien zu ermöglichen ist. Die isolierende Wirkung der S-LEC-Beschichtung korreliert mit der Schichtdicke des aufgetragenen Dünnschichtes. Im folgenden Experiment wurde daher untersucht, ob eine Verringerung der Schichtdicke des S-LEC-Films zu einer verbesserten Detektion übertragener Stoffe bei einer MALDI-MSI-Messung führt. Für diesen Versuch wurde erneut der Transfer von Fmoc-Asn(Trt)-OPfp **75**, sowie zusätzlich der Übertrag der Fluorophore DiPhABI **55** und DiBrPhABI **61** massenspektroskopisch untersucht. Zunächst wurden die Stoffe auf einen Glas-Akzeptor übertragen, welcher per Rakel mit einem 50 nm dicken S-LEC-Film beschichtet wurde. Zusätzlich wurde auf einem zweiten Akzeptor zunächst wiederholt S-LEC transferiert. Durch den wiederholten Transfer von S-LEC, konnten so ca. 10 nm dicke Polymerstapel generiert werden, auf welche anschließend die nachzuweisenden Stoffe übertragen wurden. Um die Nachweisgrenze der übertragenen Materialmenge festzustellen, wurden die beim Transfer erzeugten Transferflächen schrittweise verringert. Das verwendete Lasermuster ist in Abbildung 75A dargestellt.

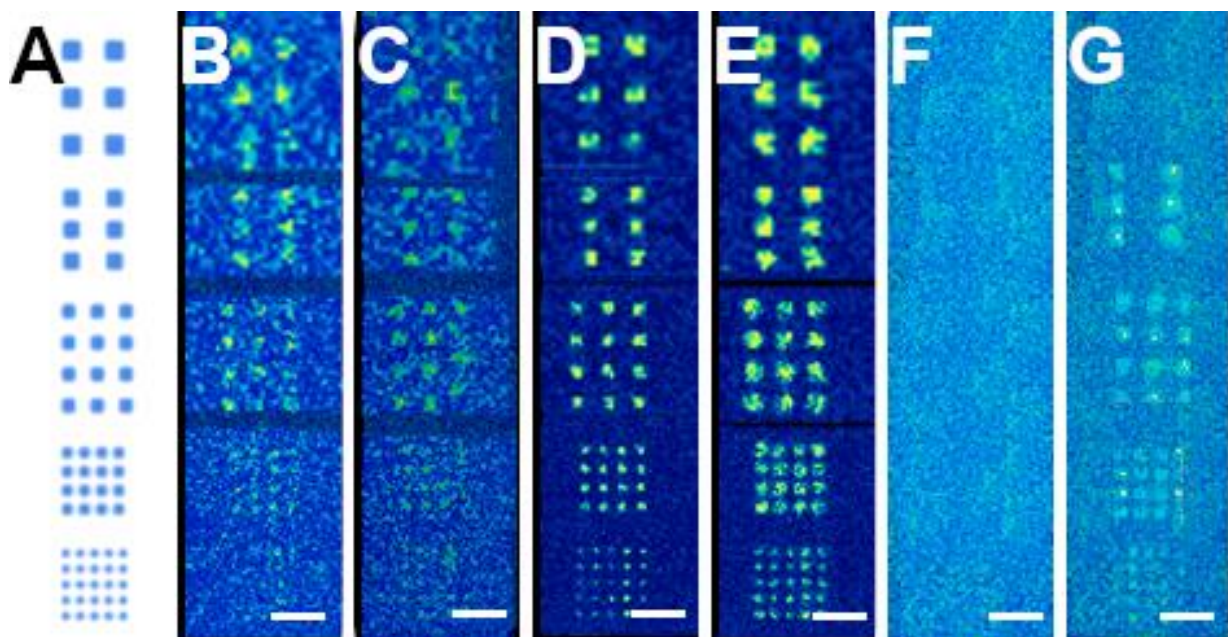


Abbildung 75: MALDI-MSI-Aufnahme des Übertrags von Fmoc-Asn(Trt)-OPfp **75**, sowie der Fluorophore DiPhABI **55** und DiBrPhABI **61** auf S-LEC-beschichteten Akzeptoroberflächen. A: Lasermuster. B: Fmoc-Asn(Trt)-OPfp **75** ($[M+H]^+$) auf lasertransferiertem S-LEC. C: Fmoc-Asn(Trt)-OPfp **75** ($[M+H]^+$) auf gerakeltem S-LEC. D: DiPhABI **55** ($[M+H]^+$) auf lasertransferiertem S-LEC. E: DiPhABI **55** ($[M+H]^+$) auf gerakeltem S-LEC. F: DiBrPhABI **61** ($[M+H]^+$) auf lasertransferiertem S-LEC. G: DiBrPhABI **61** ($[M+H]^+$) auf gerakeltem S-LEC. Verwendete MALDI-Matrix: 2,5-DHB **78**. Maßstab: 1.5 mm

Durch die Verringerung der S-LEC-Beschichtung ist es möglich, die übertragene Aminosäure Fmoc-Asn(Trt)-OPfp **75**, sowie die transferierten Fluorophore DiPhABI **55** und DiBrPhABI **61** massenspektroskopisch nachzuweisen. Vor allem beim Übertrag von DiPhABI **55** sowie DiBrPhABI **61** ist ein Nachweis in kleinen Flächen aus 2x2 Spots auf rakelbeschichteten Oberflächen (D_{S-LEC} : 50 nm) möglich (s. Abb. 75E und 75G). Diese Nachweisempfindlichkeit kann beim Übertrag von Fmoc-Asn(Trt)-OPfp **75** jedoch nicht erreicht werden. In diesem Fall kann das transferierte Material lediglich in Flächen aus 6x6 Spots detektiert werden. Ein Vergleich der Akzeptor-Beschichtungen wird deutlich, dass ein Übertrag auf einen per Rakeltechnik beschichteten Akzeptor zu homogeneren Ergebnissen führt als der Übertrag auf lasertransferiertes S-LEC. Vor Allem beim Nachweis von DiBrPhABI **61** auf lasertransferierten S-LEC-Stapeln (Abb. 75F) konnte kein Nachweis durchgeführt werden. Durch die dickere Beschichtung via Rakel kommt es nach dem Transfer vermutlich zu weniger Entnetzungeffekten bzw. Kontraktionen der Transferspots, wodurch ein insgesamt homogeneres Ergebnis erzielt werden kann. Auffällig ist, dass der Transfer von DiPhABI **55**, als kleinstes der verglichenen Moleküle, am besten detektiert werden konnte. Bei einem Nachweis kleiner Moleküle über MALDI-MS ist oft ein Suppressions-Effekt der verwendeten MALDI-Matrix zu beobachten. Dabei überlagern Signale von Matrix-Fragmenten bzw. -Clustern die Signale der Analyten. Dieser Effekt ist vor allem bei kleineren Molekülen ($m/z < 500$) zu beobachten.¹²⁹⁻¹³¹ Beim Nachweis von DiPhABI **55** tritt dieser Effekt jedoch nicht auf, was sich an der klaren Abgrenzung der Transferspots zum umliegenden Messbereich zeigt. Ein Grund für die starke Signalintensität des DiPhABI **55**-Nachweises im Vergleich zum Übertrag von DiBrPhABI **61** liegt unter Umständen in einer besseren Einbettung des Fluorophors in der Donorbeschichtung. Die homogenere Donorbeschichtung führte zu einem verbesserten Materialübertrag, wodurch das transferierte Fluorophor bei einer massenspektroskopischen Untersuchung des Akzeptors einfacher detektiert werden konnte.

Die Messergebnisse in Abbildung 75 zeigen, dass der massenspektroskopische Nachweis lasertransferierter Stoffe auch auf S-LEC-beschichteten Akzeptoren erfolgreich durchgeführt werden konnte. Es wurde festgestellt, dass die Dicke der Akzeptorbeschichtung per S-LEC einen großen Einfluss auf die Nachweisbarkeit lasertransferierter Stoffe ausübt. Durch eine Verringerung der Beschichtungsdicke des Akzeptors auf 50 nm war es möglich eine Verbesserung der Nachweisqualität der übertragenen Stoffe zu erreichen.

4.3.4. Massenspektroskopischer Nachweis der laserunterstützten Synthese von Fluorophoren

Nachdem der laserunterstützte Übertrag der Fluorophore DiPhABI **55** und DiBrPhABI **61** erfolgreich massenspektroskopisch verifiziert werden konnten, wurde im Folgenden untersucht, ob die Produkte laserunterstützter Synthesen ebenfalls per MALDI-MSI detektiert werden können. Für dieses Experiment wurde die laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** und DiBrPhABI **61** betrachtet. Zunächst wurden die jeweiligen Edukte auf einen S-LEC-beschichteten Akzeptor übertragen (s. Abb. 76). Die Schichtdicke der S-LEC-Schicht betrug 50 nm. Im Anschluss wurden die übertragenen Stoffe im Ofen miteinander zur Reaktion gebracht. Nach Abschluss der Reaktionsphase wurden die Oberflächen mit 2,5-Dihydroxyacetophenon (2,5-DHAP) **78** über ein Sprühverfahren überschichtet und per MALDI-MSI untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 78 und 79 dargestellt.

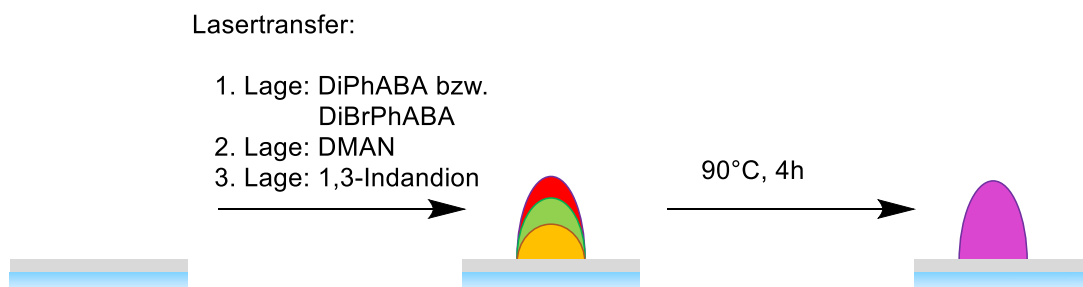


Abbildung 76: Laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** und DiBrPhABI **61**.

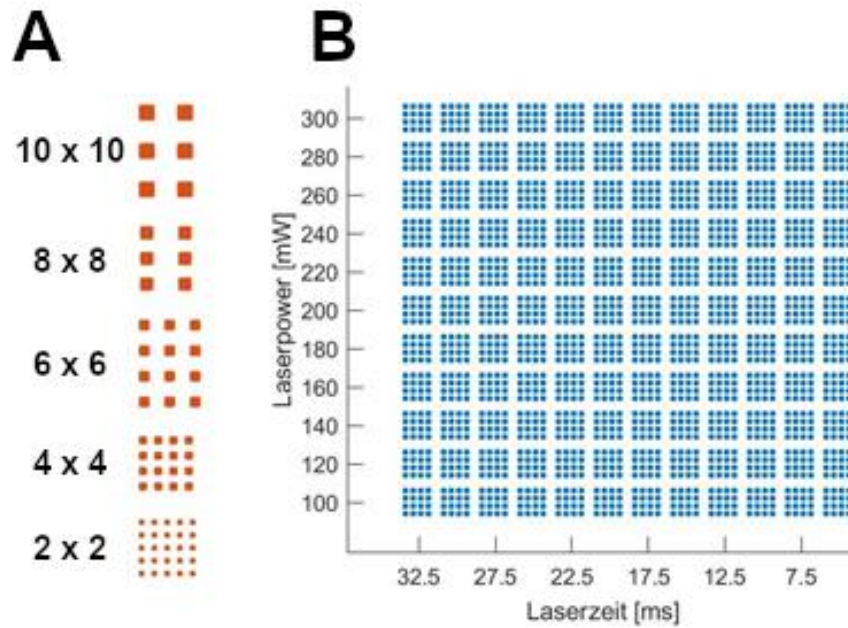


Abbildung 77: Lasermuster zur laserunterstützten Synthese von DiPhABI **55** bzw. DiBrPhABI **61**. A: Synthese in Transferflächen aus 10x10 Spots, 8x8 Spots, 6x6 Spots, 4x4 Spots bzw. 2x2 Spots bei konstanten Transferparametern (170 mW, 6,00 ms.. B: Transfer einer Lasermatrix.

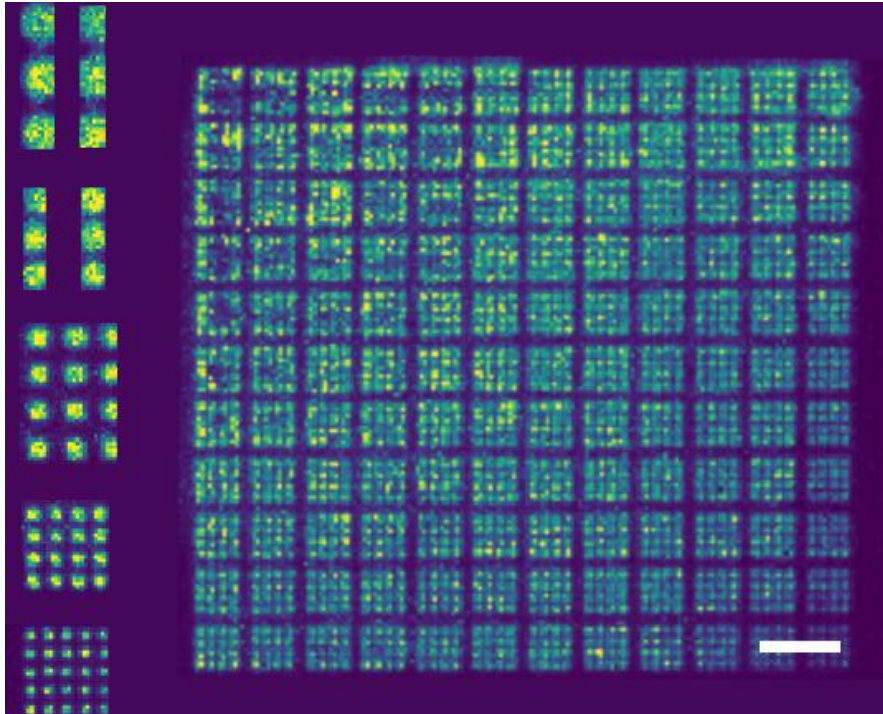


Abbildung 78: MALDI-MSI Aufnahme einer laserunterstützten Synthese von DiPhABI **55**. Verwendete MALDI-Matrix: 2,5-DHAP **79**. Detektiertes Molekulargewicht: 402,15 g/mol $[M+H]^+$. Maßstab: 2.00 mm

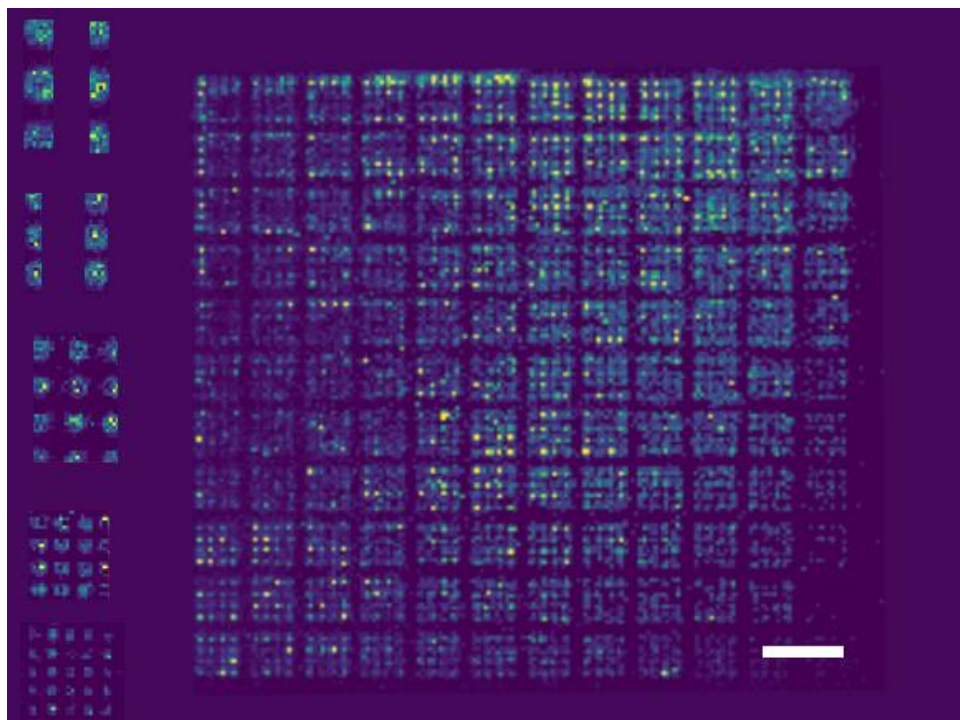


Abbildung 79: MALDI-MSI Aufnahme einer laserunterstützten Synthese von DiBrPhABI **61**. Verwendete MALDI-Matrix: 2,5-DHAP **79**. Detektiertes Molekulargewicht: **559,97** g/mol $[M+H]^+$. Maßstab: 2.00 mm

In den Abbildungen 78 und 79 ist zu erkennen, dass die laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** und DiBrPhABI **61** massenspektroskopisch verifiziert werden konnte. Im Vergleich der beiden Synthesen fällt erneut die bessere Nachweisqualität der Synthese von DiPhABI **55** auf. Dieser Vergleich konnte bereits beim Übertrag der Reinstoffe beobachtet werden (vgl. Abb. 75E und 75G) und lässt sich durch den unterschiedlichen Übertrag der jeweiligen Aldehyde DiPhABA **29** und DiBrPhABA **60** erklären. In beiden Fällen konnte die Bildung des Reaktionsprodukts auch bei niedrigen Transferparametern bei einer Laserleistung von 120 mW und einer Laserzeit von 7,50 ms verifiziert werden.

Als nächstes wurde untersucht, ob der Nachweis laserunterstützter Synthesen im Array-Format durchgeführt werden kann. Zu diesem Zweck wurde die Synthese von DiPhABI **55** und DiBrPhABI **61** in alternierenden Abfolgen auf einer S-LEC-beschichteten Syntheseoberfläche durchgeführt und die Oberfläche nach Ende der Reaktionsphase mit 2,5-DHAP **79** überschichtet (vgl. Abb. 76). Die Reaktionsprodukte konnten im Anschluss erfolgreich per MALDI-MSI detektiert werden (s. Abb. 80).

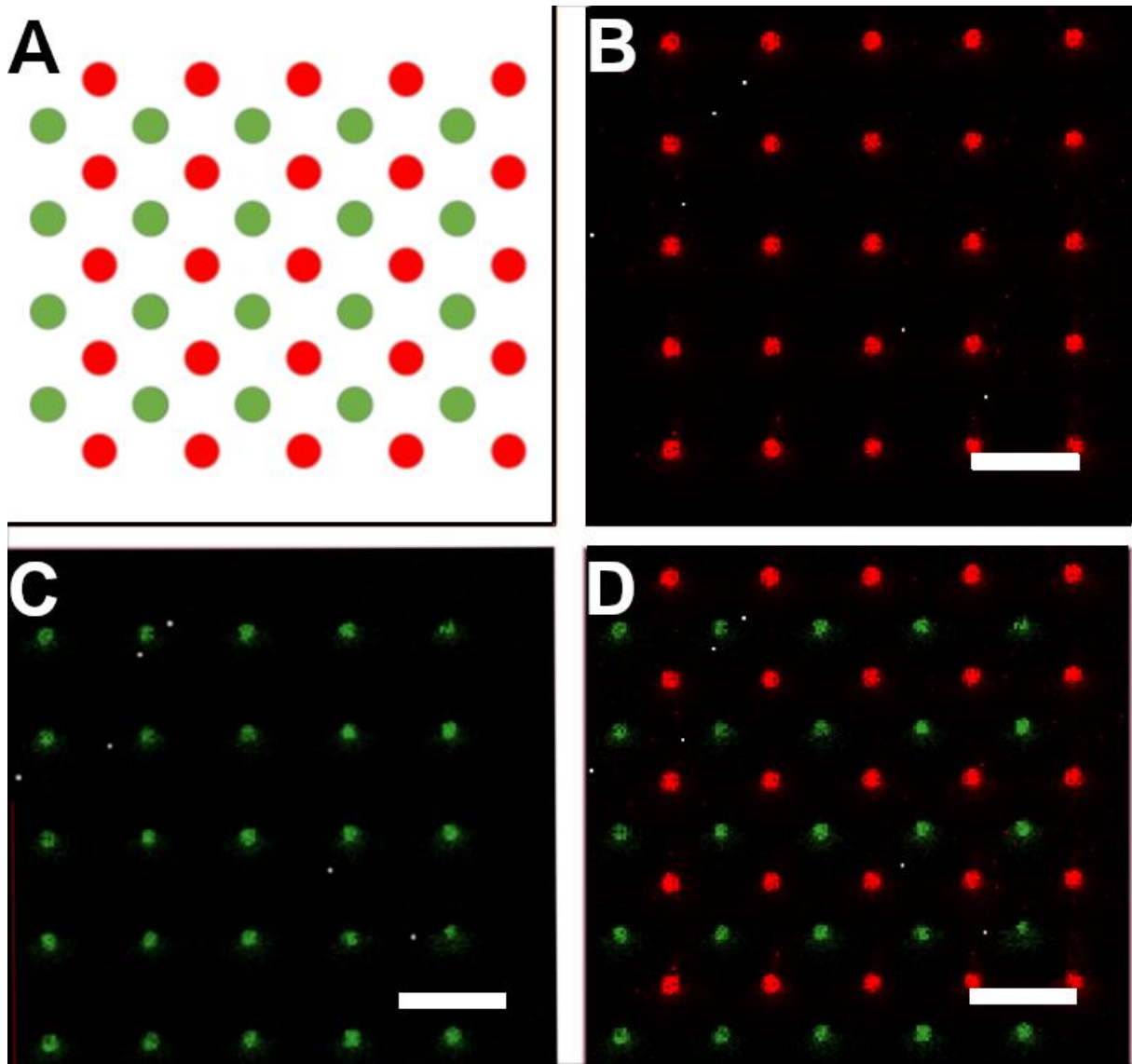


Abbildung 80: massenspektroskopischer Nachweis einer laserunterstützten Synthese von DiPhABI **55** und DiBrPhABI **61** im Arrayformat. A: Laserlayout. Rot: DiPhABI **55**, grün: DiBrPhABI **61**. B: ortsaufgelöste MALDI-MS-Aufnahme zum Nachweis von DiPhABI **55** ($m/z = 402.15$) C: ortsaufgelöste MALDI-MS-Aufnahme zum Nachweis von DiBrPhABI **61** ($m/z = 560$). D: Overlay. Maßstab: 0.50 mm.

4.3.5. Massenspektroskopischer Reaktionsnachweis durch laserinduzierten Übertrag der MALDI-Matrix

Bei der Durchführung der MALDI-Messungen zum Nachweis laserunterstützter Synthesen konnte eine starke Abhängigkeit der Nachweisqualität bestimmter Moleküle von der verwendeten MALDI-Matrix beobachtet werden. Die Abhängigkeit von der verwendeten MALDI-Matrix beim Nachweis verschiedener Moleküle mittels MALDI-MS ist ein häufig auftretendes Phänomen.⁶⁹

Hauptteil

Unter Verwendung der MALDI-Matrizes α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (AHCCA) **76** oder Sinapinsäure **77** konnte beispielsweise kein Nachweis *per* Laserimpuls übertragenen Stoffe erbracht werden. Der Einsatz von 2,5-DHB **78** oder 2,5-DHAP **79** lieferte hingegen gute Signale.

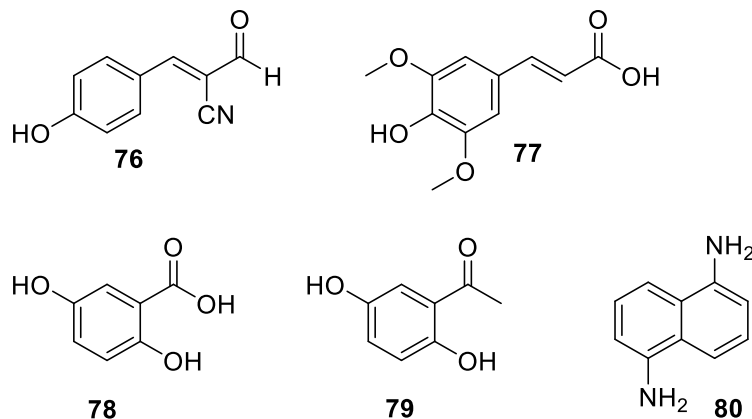


Abbildung 81: Darstellung ausgewählter Verbindungen, welche als Matrix-Substanz bei MALDI-MS-Analysen verwendet werden können^{69, 132}: AHCCA **76**, Sinapinsäure **77**, 2,5-DHB **78**, 2,5-DHAP **79**, sowie 2,5-Diaminonaphthalin (2,5-DAN) **80**.

Aus diesen Gründen wird in der Regel für verschiedene Moleküle eine optimierte MALDI-Matrix ermittelt, um einen zuverlässigen Nachweis zu garantieren^{69, 132}. Dieser Optimierungsschritt wird durch ein systematisches Austesten diverser Matrizes erreicht¹³². Aktuell sind jedoch zahlreiche Moleküle bekannt, welche als Matrix in einer MALDI-Analyse verwendet werden können, wodurch sich die Ermittlung einer geeigneten Matrix zu einem zeit- und kostenaufwendigen Verfahren entwickelt^{69, 132-133}.

Vor allem in den *life sciences* gewinnt der Nachweis ausgewählter Verbindungen durch MALDI-MS unter anderem dank des orts aufgelösten Nachweises von Zielverbindungen in Gewebeproben mithilfe von MALDI-MSI immer mehr an Bedeutung.^{65-69, 127, 132} Zur Probenvorbereitung werden die Analyten mit einer Lösung der verwendeten MALDI-Matrix auf eine Probenoberfläche pipettiert bzw. im Fall von Arrays oder biologischen Proben über verschiedene Methoden wie Sublimation oder Sprühverfahren mit der MALDI-Matrix überbeschichtet.^{67, 134} Aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen ist es aufgrund bei der massenspektroskopischen Analyse von Arrays nicht immer möglich, sämtliche Verbindungen unter Verwendung einer einzigen Matrix-Substanz nachzuweisen. Aufgrund einer flächigen Beschichtung der Arrayoberfläche mit der MALDI-Matrix muss die Analyse deshalb über die Untersuchung von Array-Replikaten durchgeführt werden, wobei jedes Replikat mit einer individuellen Matrix überschichtet wird. Der nano3D-Laserdrucker ist gerade für dieses systematische austesten verschiedener Matrix-Materialien besonders geeignet.

Durch das gezielte Aufbringen ausgewählter Matrizes auf definierte Array-Bereiche kann der Analysedurchsatz, sowie der Materialaufwand bei der Array-Herstellung und der Auswertung durch orts aufgelöste MALDI-MS stark verbessert werden. Die Verwendung von Donoren, welche mit den entsprechenden MALDI-Matrizes beschichtet wurden erlaubt ebendies, indem ausgewählte Spots gezielt überschichtet werden. Auf diese Weise können zahlreiche Moleküle mit der jeweils idealen MALDI-Matrix überschichtet und verifiziert werden.

Im folgenden Experiment wurde daher untersucht, inwiefern Donoren mit MALDI-Matrizes beschichtet werden können. Im Anschluss wurde überprüft ob ein massenspektroskopischer Nachweis von verschiedenen Verbindungen durch die Überschichtung mit der entsprechenden Matrix per Laserimpuls ermöglicht werden kann.

Es wurde versucht erneut die laserunterstützte Synthese von DiPhABI **55** massenspektroskopisch nachzuweisen. In diesem Ansatz wurde die zur Ionisation verwendete MALDI-Matrix im Anschluss an die Synthese ebenfalls per Laserimpuls übertragen. Zunächst wurden die entsprechenden Edukte DiPhABA **29**, DMAN **62**, sowie 1,3-Indandion **30** per Laserimpuls auf einen S-LEC-beschichteten Akzeptor übertragen. Nach der Reaktionsphase im Ofen wurde ein erneuter Lasertransfer durchgeführt. In diesem Schritt wurden die Spots mit unterschiedlichen MALDI-Matrizes überschichtet. Als MALDI-Matrix wurden 2,5-DHB **78**, 2,6-DHAP **79**, sowie 1,5-DAN **80** verwendet. Zur besseren Durchmischung und Cokristallisation der Fluorophore mit den MALDI-Matrizes wurde die Oberfläche erneut im Ofen inkubiert. Im Anschluss wurde eine Analyse der Spots via MALDI-MSI durchgeführt.

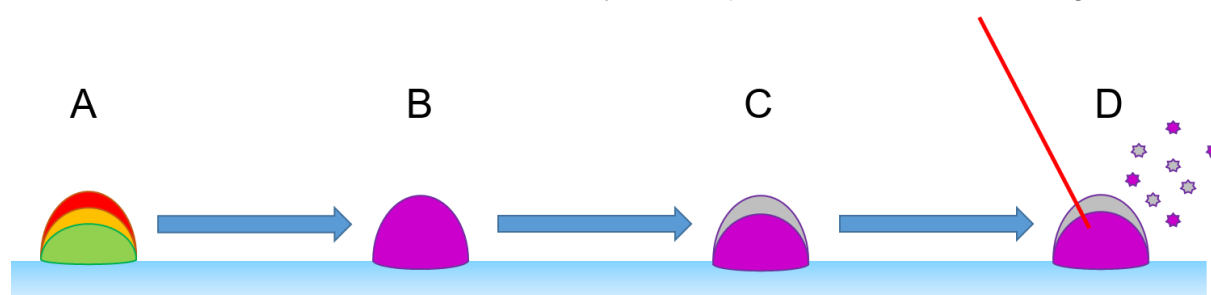


Abbildung 82: Probenvorbereitung zum massenspektroskopischen Reaktionsnachweis mithilfe lasertransferierter MALDI-Matrizes. A: Transfer der Edukte. B: Durchführung der Reaktion. C: Überschichtung der Synthesespots mit lasertransferierter MALDI-Matrix. D: MALDI-MSI-Analyse.

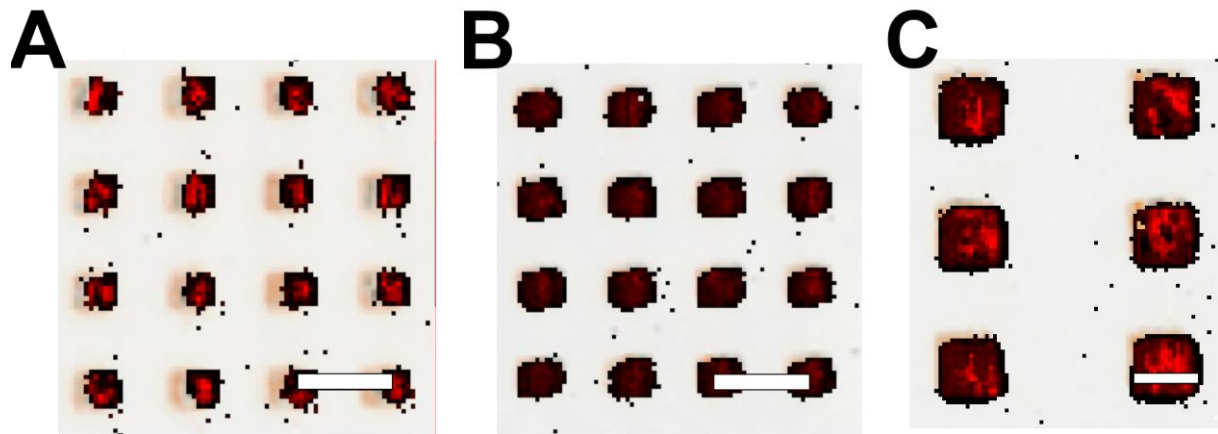


Abbildung 83: Ortsaufgelöster Nachweis der Synthese von DiPhABI **55** ($m/z = 402,15$) per MALDI-MSI: Die verwendete MALDI-Matrix wurde per Lasertransfer auf die Syntheseoberfläche aufgebracht. A: Synthese in Flächen aus 2x2 Spots. Verwendete Matrix: 2,5-DHAP **79**. B: Synthese in Flächen aus 2x2 Spots. Verwendete Matrix: 2,5-DHB **78**. C: Synthese in Flächen aus 6x6 Spots. Verwendete Matrix: 1,5-DAN **80** Maßstab: 500 μm .

Abbildung 83 zeigt, dass die Synthese der Fluorophore auch durch das Aufbringen der MALDI-Matrizes über einen Lasertransfer erfolgreich verifiziert werden konnte. Im Vergleich zu einer Überschichtung mittels Sprühverfahren zeigt sich jedoch eine geringfügig schlechtere Nachweisqualität. Während der Messung wird der Laser von der MALDI-Matrix absorbiert. Durch diese Absorption entsteht Wärme, welche sich bei einer hohen Rasterauflösung anstaut. Die entstehende Hitze führt ggf. zu einer vorzeitigen Sublimation der MALDI-Matrix, was zu einer Abnahme der Nachweisqualität bei langen Messzeiten führt. Durch die vergleichsweise geringe Menge an MALDI-Matrix, welche bei einem Lasertransfer unter Verwendung des nano3D-Laserdruckers übertragen wird, kann dieser Effekt bei mittels Laser übertragener Matrix verstärkt beobachtet werden.

Durch den laserinduzierten Übertrag von verschiedenen MALDI-matrizes konnte die Synthese von DiPhABI **55** erfolgreich verifiziert werden. Diese Methode erlaubt es verschiedene Matrizes gezielt auf einer Substratoberfläche abzulagern. Auf diese Weise können verschiedene Moleküle unter Verwendung angepassten Bedingungen analysiert werden. Des Weiteren kann eine laterale Diffusion von Transferspots während der Matrix-Applikation unterbunden werden, was ggf. höhere Spotdichten ermöglicht. Durch die Einsparung der eingesetzten Menge der Matrix-Substanzen, sowie der Möglichkeit verschiedene Matrizes auf einer einzigen Oberfläche zu verwenden ermöglicht diese Methode eine große Material- und Zeitersparnis bei der massenspektroskopischen Analyse von Molekülararrays. Aufgrund der langen Messzeit bei einer entsprechenden Rasterauflösung muss dennoch der Übertrag der

MALDI-Matrizes weiter optimiert werden, um eine gleichbleibende Nachweisqualität zu gewährleisten.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Laserinduzierter Materialtransfer

Der erste Teil dieser Arbeit befasste sich mit dem laserinduzierten Materialtransfer, sowie dessen Abhängigkeit von diversen Prozessparametern. Hierfür wurde zunächst eine minimale Transferenergie von 0.5. mJ identifiziert, um einen nachweisbaren Materialübertrag durchzuführen. Bei der genaueren Betrachtung verschiedener Transfereinstellungen konnte gezeigt werden, dass die übertragene Materialmenge einerseits proportional zu der angewandten Transferenergie zunimmt. Der Übertrag bei einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Transferenergie zeigte, dass je nach Energiezusammensetzung ein unterschiedliches Spotvolumen erzielt werden konnte. Dies legt den Schluss nahe, dass die untergeordneten Parameter Laserleistung und Laserzeit einen individuellen Einfluss auf den Materialübertrag ausüben. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die maximale Materialmenge, welche bei einem einzelnen Laserimpuls übertragen wird, begrenzt ist. Dies führt dazu, dass ab einer bestimmten Spothöhe auch bei einer weiteren Steigerung der Transferenergie kein zusätzlicher Materialtransfer mehr erreicht werden kann. Durch einen wiederholten Transferprozess ist es dennoch möglich die erzeugte Spothöhe durch ein Stapeln einzelner Transferschichten weiter zu steigern (s. Abb. 84). Letzteres ist ein Nachweis dafür, dass es möglich ist, gleiche oder auch unterschiedliche Materialien in frei wählbaren Kombinationen übereinander zu stapeln.

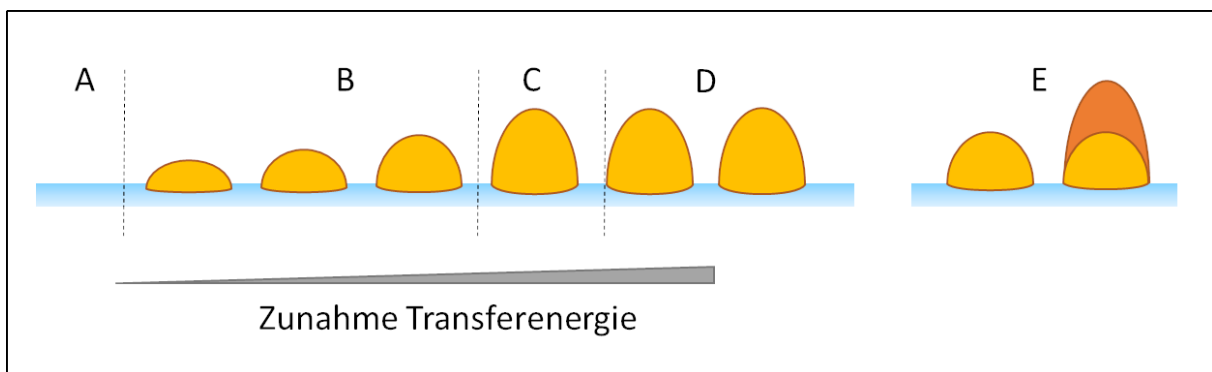


Abbildung 84: beobachtetes Verhalten der übertragenen Materialmenge beim Lasertransfer via nano3D-Laserprinting. Vor dem Erreichen der minimalen Transferenergie kann kein Materialtransfer beobachtet werden (A). nach dem Überschreiten dieses Grenzwertes korreliert die übertragene Materialmenge mit der angewandten Transferenergie (B). Durch die Limitation der maximal übertragbaren Materialmenge (C) kommt es auch bei einer weiteren Steigerung der Transferenergie zu keiner weiteren Zunahme des transferierten Materials (D). Durch einen wiederholten Transfer (E) ist es möglich mehrere Materialschichten übereinander zu stapeln.

Die Untersuchung der Donoroberflächen zeigt eine weitere Abhängigkeit der übertragenen Materialmenge sowohl von der Konzentration, als auch der Dicke der Transferschicht des Donors. Bei der Betrachtung von verschiedenen stoffspezifischen Eigenschaften konnten keine klaren Verbindungen zur jeweils übertragenen Materialmenge festgestellt werden. Des Weiteren wurde die Rakeltechnik als weitere Beschichtungsmethode für Donoroberflächen etabliert. Es wurde gezeigt, dass bei der Kupplung von Aminosäuren auf NH_2 - β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-funktionalisierten Oberflächen kein qualitativer Unterschied bei der Verwendung von gerakelten zu gescincoateten Donoren festgestellt werden konnte.

5.2. Anknüpfungsfreie kombinatorische Fluorophorsynthese

Durch die Eigenschaft verschiedene lasertransferierte Materialschichten übereinander zu stapeln ist es möglich Nanostapel aus verschiedenen Reaktionsbausteinen zu generieren. Die Durchmischung dieser Nanostapel in einem Hitzeschritt erlaubt es die eingebetteten Moleküle miteinander zur Reaktion zu bringen. Die geringe laterale Diffusion der einzelnen Spots erlaubt es auf diese Weise definierte, voneinander abgegrenzte Reaktionsorte zu schaffen. Im zweiten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der laserinduzierte Materialtransfer dazu verwendet werden kann chemische Reaktionen, ohne eine Anknüpfung der Reaktionspartner oder Reaktionsprodukte an die Arrayoberfläche durchzuführen. Durch den Übertrag entsprechender Edukte (u.a. Aldehyde und Nitrile) konnte die Synthese von fluoreszenten Molekülen per KNOEVENAGEL-Kondensation erfolgreich durchgeführt werden. Nach der Optimierung verschiedener Kupplungsparameter konnte ein kombinatorischer Array von Fluorophoren als *proof-of-concept* hergestellt werden.

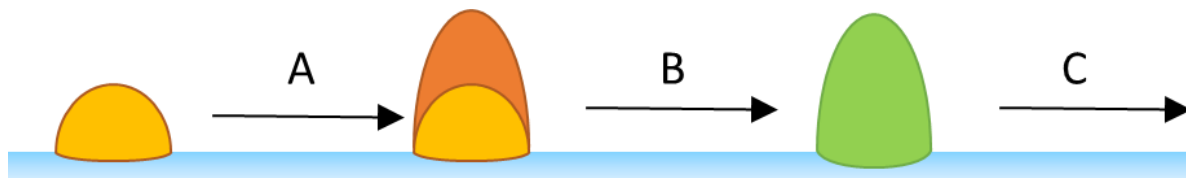


Abbildung 85: Anknüpfungsfreie Synthese von fluoreszenten Molekülen durch schrittweisen Materialtransfer der jeweiligen Edukte. Durch das Übereinanderstapeln verschiedener Reaktionsbausteine ist es möglich Nanostapel zu erzeugen (A). Eine Durchmischung der Nanostapel in einem Hitzeschritt erlaubt es die einzelnen Schichten miteinander zur Reaktion zu bringen (B). Nach Abschluss der Reaktion können die individuellen Spots per Fluoreszenzanalyse oder orts aufgelöster MALDI-MS analysiert werden (C).

5.3. Reaktionsnachweis über orts aufgelöste Massenspektrometrie

Neben dem Reaktionsnachweis mittels Fluoreszenzanalyse konnte auch eine Verifizierung *via* orts aufgelöster MALDI-MS etabliert werden. Durch eine Verringerung der S-LEC-Beschichtung der Akzeptoroberfläche auf eine Dicke von 10-50 nm konnte eine massenspektroskopische Analyse unter Erhalt der Synthesequalität durchgeführt werden. Der erfolgreiche Nachweis von übertragenen Aminosäuren beweist außerdem, dass MALDI-MSI in Zukunft genutzt werden kann, vor allem nicht-fluoreszente Reaktionsprodukte nachzuweisen. Durch die Applikation der MALDI-Matrix durch den nano3D-Laserdrucker ist es zudem möglich einzelne Spots mit unterschiedlichen MALDI-Matrizes zu überschichten. Eine erneute Inkubation des Arrays im Ofen ermöglicht die Durchmischung und Cokristallisation der Reaktionsprodukte mit den Matrix-Molekülen. Auf diese Weise kann für jeden Spot ein optimierter Massenachweis erbracht werden.

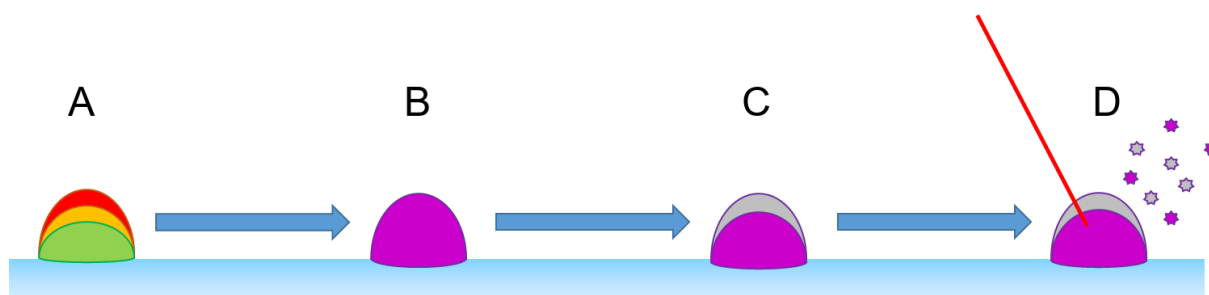


Abbildung 86: Massenspektroskopischer Nachweis von Syntheseprodukten durch eine individuelle Applikation der MALDI-Matrix mittels Lasertransfer. A: Laserinduzierter Übertrag der Reaktionsbausteine. B: Produktbildung durch eine Durchmischung der einzelnen Materialstapel. C: Matrixapplikation per Laserimpuls. D: orts aufgelöster massenachweis per MALDI-MSI.

5.4. Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen das Potential des nano3D-Laserdruckers zur Herstellung hochdichter Molekülarrays. Durch die geringe Materialmenge, welche zur Beschichtung von Donoroberflächen eingesetzt werden muss, ist es möglich tausende unterschiedliche Reaktionen im Piko- bis Femtomol-Maßstab auf nur einer einzigen Arrayoberfläche durchzuführen. Durch die erfolgreiche Synthese eines kombinatorischen Arrays konnte zudem bewiesen werden, dass auch zahlreiche Stoffe abseits des bisherigen Anwendungsspektrums übertragen werden konnten. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit eines Reaktionsnachweises mittels Fluoreszenzanalyse oder Massenspektroskopie konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Reaktionsqualität im Allgemeinen unabhängig von der absolut übertragenen Materialmenge ist. Diese Eigenschaften können in Zukunft dafür genutzt werden den nano3D-Laserdrucker als eine Syntheseplattform zu etablieren, mit der zahlreiche

Reaktionen unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden können. Durch quantitative Massenspektroskopie (qMS) kann in Zukunft voraussichtlich auch die gebildete Produktmenge einzelner Spots bei verschiedenen Reaktionsbedingungen verglichen werden.

Auf der anderen Seite konnte ebenfalls gezeigt werden, dass an vielen Stellen noch Optimierungsbedarf besteht, bevor das nano3D-Lasersystem zu einer umfassenden Array-Synthese verwendet werden kann. Zunächst muss der stoffspezifische Einfluss auf die übertragene Materialmenge ermittelt werden, um eine langwierige Optimierung der eingesetzten Materialien zu vermeiden. Außerdem muss untersucht werden, unter welchen Bedingungen Flüssigkeiten zuverlässig und ohne Kontamination von benachbarten Reaktionen transferiert werden können. Für diese Herausforderungen müssen in Zukunft weitere Reaktionsmechanismen identifiziert werden, welche mit dem nano3D-Lasersystem umsetzbar sind. Aktuell werden verschiedene Aldol-Kondensationen oder auch Multi-Komponenten-Reaktionen wie die Groebke-Blackburn-Bienaymé (GBB) Reaktion auf ihre Durchführung mit dem Lasersystem untersucht.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, bei der Kupplung von Aminosäuren an eine funktionalisierte Oberfläche eine Inkubation der Arrays im Lösungsmitteldampf zu einer verbesserten Kupplung führt. Durch die Verflüssigung der Transfermatrix im Lösungsmitteldampf konnte eine verbesserte Diffusion der übertragenen Stoffe im Transferspot erreicht werden, was die Kupplungsgeschwindigkeit und -qualität begünstigte. Im Falle von anknüpfungsfreien Synthesen konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Inkubation der Syntheseoberflächen im Lösungsmitteldampf hingegen zu einer lateralen Diffusion der aufgedruckten Materialien, sowie einer Entnetzung der Akzeptorbeschichtung führte. Aktuell werden Untersuchungen durchgeführt, inwiefern die Strukturierung der verwendeten Oberflächen diesem Effekt entgegenwirkt. Erste Versuche zeigen, dass durch den Übertrag auf hervorstehende Säulen die übertragenen Materialien auch bei einer Inkubation im Lösungsmitteldampf an Ort und Stelle gehalten werden. Die Mikrostrukturierung der verwendeten Glasträger soll einerseits zu einer weiteren Steigerung der Spotdichte beitragen, andererseits verhindert eine Strukturierung der Syntheseoberfläche die laterale Diffusion bei einer Reaktionsführung im Lösungsmitteldampf (vgl. Abb. 87). Dies liegt an der drastischen Änderung des Kontaktwinkels an den Kanten der hervorstehenden Strukturen. Deshalb soll eine Strukturierung der Akzeptoroberfläche dazu beitragen die miniaturisierten Synthesen durch die Durchmischung der Reaktionsspot im Lösungsmitteldampf zu ermöglichen.

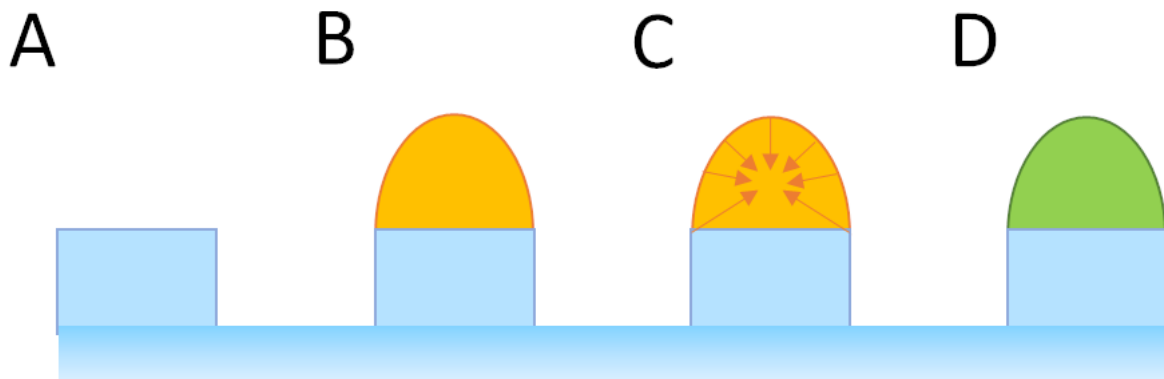


Abbildung 87: Materialtransfer auf mikrostrukturierte Glasträger. A: Mikrostrukturierung in Form hervorstehender Säulen. B: laserinduzierter Materialtransfer auf die Mikrostrukturen. C: Bei der Durchmischung der Transferschichten verhindert die Oberflächenspannung der Transferspots ein Herabfließen der übertragenen Materialien. D: Gebildetes Reaktionsprodukt.

In dieser Arbeit wurde der Materialtransfer und die Durchführung der verschiedenen Reaktionen mit mehreren Analysemethoden untersucht. Zur Analyse der übertragenen Materialmenge können Methoden wie VSI oder Rasterelektronenmikroskopie verwendet werden. Fluoreszenzuntersuchungen, sowie Massenspektrometrie dienen zum Nachweis der synthetisierten Produkte. Dabei ist oft die Lokalisation individueller Spots bei verschiedenen Geräten eine zeitaufwendige Herausforderung. Des Weiteren wird die Zuordnung und Zusammenführung der gewonnenen Messdaten aufgrund unterschiedlicher Datenformate zusätzlich erschwert. Die korrelative Analytik befasst sich damit diese Probleme durch eine Vereinheitlichung der jeweils verwendeten Koordinatensysteme bzw. einer zusammengeführten Datenbank entsprechender Messergebnisse zu lösen. Am KIT werden aktuell Modelle für eine korrelative Analytikplattform entworfen und getestet. Das individuelle Lasermuster eines Arrays kann hierbei beispielsweise als Grundstruktur für eine arrayspezifische Datenbank verwendet werden, da bereits die jeweiligen Positionen und Sequenzen aller Spots enthalten sind. Durch eine systemübergreifende Kalibrierung der Spotpositionen wird es ermöglicht einzelne Spots in den unterschiedlichen Analysegeräten gezielt anzusteuern, ohne viel Zeit bei der für das Auffinden individueller Spots zu verlieren. Die bei der Untersuchung gewonnenen Messdaten können im Anschluss automatisch in die Datenbank eingefügt werden. Durch eine Automatisierung von Synthese- und Screening-Prozessen soll es somit in Zukunft möglich sein, innerhalb kürzester Zeit eine umfassende Analyse ausgewählter Spots durchzuführen und die Messergebnisse abzurufen und zu vergleichen. Auf diese Art können hochdichte Molekülarrays gezielt für Screening und Prozessoptimierung verschiedener Anwendungen genutzt werden.

Die Informationen, welche in diesen Datenbanken gespeichert werden, können wiederum dazu verwendet werden Simulationsprogramme zu verbessern. Wie eingangs erwähnt ist

eines der großen Probleme einer effektiven Reaktionsvorhersage über Modellierungsprogramme die Unvollständigkeit vorhandener Datenbanken bezüglich komplexer Ausgangsstoffe, sowie das Fehlen einheitlicher Reaktionsbedingungen. Der nano3D-Laserdrucker ist in der Lage diese Probleme zu beheben. Einerseits können in Zukunft theoretisch beliebig komplexe Moleküle übertragen werden und die Reaktionsführung bzw. Reaktionsausbeute *per* qMS bewertet und bestimmt werden. Durch die Reaktionsführung im Arrayformat können sehr viele diese Reaktionen zudem gleichzeitig und gemeinsam unter verschiedenen Reaktionsbedingungen verglichen werden.

6. Experimentaltteil

6.1. Analytik und Geräte

Laseraufbau (nano3D-Laserdrucker)

Der Laseraufbau wurde von Dr. Laura Weber (IMT/Karlsruhe) konstruiert. Er basiert auf einem veränderten Aufbau des von Dr. Tobias Foertsch und Dr. Felix Löffler konstruierten cLift-Systems. Zur Verwendung kommt ein Laser der Wellenlänge 405 nm (300 mW, IBEAM-SMART-405-S-HP, Toptica Photonics), welcher über einen Scanhead (intelliSCAN III 10, Scanlabs) auf die Laserstage lenkt wird. Zur Fokussierung des Laserstrahls wird eine F θ -Linse (S4LFT5110/322, Sill Optics) verwendet. Zur automatisierten Auflegen der Donoroberflächen kommt ein Roboter-Arm (SCARA Robot SR-6iA, Fanuc) zum Einsatz.

Vertikale Scanning Interferometrie (VSI)

Die topographischen Untersuchungen des Materialtransfers wurden mithilfe eines Contour GT-KOX-14-157 der Firma Bruker durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Untersuchung bei 2.5-facher Vergrößerung. Die Auswertung der VSI-Messungen erfolgte mithilfe des Programms Vision64.

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Analyse der für die Reaktionen synthetisierten Edukte wurde das NMR-Spektrometer Avance 400 (400 MHz) von Bruker (Massachusetts/USA) verwendet. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die verwendeten deuterierten Lösungsmittel Chloroform-d₁ sowie Dimethylsulfoxid-d₆ wurden von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim/Deutschland) käuflich erworben. Die chemische Verschiebung δ wurde in parts per million (ppm) angegeben. Die Restprotonensignale von Chloroform (1H: δ = 7.26 ppm) bzw. Dimethylsulfoxid (1H: δ = 2.50 ppm) dienen für die 1H-Spektroskopie als Referenz. Verwendete Abkürzungen für die Charakterisierung von Signalaufspaltungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett, bs = breites Singulett, m = Multiplett. Die erhaltenen Spektren wurden nach 1. Ordnung ausgewertet und die Kopplungskonstanten J als Betrag in Hertz (Hz) angegeben.

Ortsaufgelöste Massenspektroskopie (MALDI-MSI)

Zur ortsaufgelösten Massenspektrometrie wurde das Massenspektrometer timsTOF flex von Bruker (Massachusetts/USA) verwendet. Die Ionenbilder wurden mit einer räumlichen Auflösung von 100 µm und 30 Schüssen pro Spot aufgenommen.

Sprühbeschichtung

Zur Applikation der MALDI-Matrix per Sprühbeschichtung wurde das Gerät HTX3 der Firma HTX Technologies (Chapel Hill, USA) verwendet. Die Matrix wurde dabei in einer Konzentration von 10 mg/mL in einer Lösung aus 70% Acetonitril, 30% Wasser und 0,1% TFA bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,12 ml/min aufgebracht. Die Temperatur der Sprühdüse betrug 60°C.

Spincoater

Es wurde der K.L.M Spin Coater der Firma Schaefer (Langen/Deutschland) sowie eine Vakuumpumpe der Firma KNF Neuberger (Freiburg/Deutschland) verwendet.

Laminiergerät

Zum Bekleben der Donor Oberflächen wurde ein Laminiergerät LM 330 Laminator der Firma Vogt Papiertechnik (Böblingen-Altendorf/Deutschland)) verwendet.

Rakel

Der verwendete Filmziehappikator ZUA 2000 wurde von der Firma Proceq AG (Schwerzenbach/Schweiz) erworben. Das automatische Filmziehgerät AB3655 wurde von der Firma TQCsheen (Hilden/Deutschland) bezogen.

Schüttler

Es wurde der Schüttler WS 10 der Firma Edmund Bühler GmbH (Hechingen/Deutschland) eingesetzt.

Experimentalteil

Analysenwaage

Es wurde die Analysenwaage AE 240 der Firma Mettler Toledo (Greifensee/Schweiz) verwendet.

Photometer

Zur photometrischen Beladungsmessung wurden das Photometer Jenway 7305 der Firma Bibby Scientific Ltd (Staffordshire/UK) sowie die Küvetten „UV-Cuvette Micro“ der Marke GmbH & Co. KG (Wertheim/Deutschland) verwendet.

Ultraschallbad

Für die Reinigung von Objektträgern wurde das Ultraschallbad Elmasonic S30 Ultraschallreiniger des Herstellers Elma eingesetzt.

Fluoreszenzscanner

Es wurde der Fluoreszenz-Scanner InnoScan1100-AL der Firma InnopSys (Carbonne/Frankreich) verwendet. Zur Anregung wurden Laser der Wellenlängen 488 nm, 532 nm sowie 635 nm verwendet. Soweit nicht anders angegeben wurde der simultane Scan-Modus verwendet. Die Auflösung der Scans betrug idR 5.00 µm. Die Bearbeitung und Analyse der Fluoreszenz-Aufnahmen erfolgte mithilfe des Programms Mapix.

6.2. Lösungsmittel, Chemikalien und Syntheseoberflächen

Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von Thermo Fisher Scientific (Schwerte/Deutschland) bezogen.

Polymermatrix:

Die Matrix (S-LEC-P LT 7552) wurde von der Firma Sekisui Chemical Co. Ltd. (Osaka/Japan) gekauft.

Ultrapures Wasser (MilliQ-Wasser)

Ultrapures Wasser wurde mit einem Synergy® Water Purification System, ausgestattet mit einem Synergy Pak 2 von Merck (Darmstadt/Deutschland), generiert.

Funktionalisierte Glasträger

Die verwendeten Fmoc-NH- β -Ala-10:90 PEGMA-co-MMA Oberflächen wurden von der Firma PEPperPRINT GmbH (Heidelberg/Deutschland) bezogen.

Glasträger

Die Verwendeten Objektträger wurden bei der Firma Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshafen/Deutschland) erworben.

Polyimid-Folie

Die Kapton-Folie ® (Polyimid) des Typ 70110 (25,0 μ m Trägermaterial; 60,0 μ m Gesamtstärke) wurde von der Firma CMC Klebtechnik GmbH (Frankenthal/Deutschland) bezogen.

6.3. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV1: Fmoc-Entschützung von funktionalisierten Oberflächen

a) Entschützung ohne Beladungsmessung

Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde eine Fmoc-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-funktionalisierte Glasoberfläche für 10 min in DMF vorgequollen. Im Anschluss wurde die Oberfläche für 20 min in einer Lösung aus 20 % Piperidin in DMF (v/v) auf einem Schüttler inkubiert. Nach der erfolgten Entschützung wurde die Oberfläche 3x5 min in DMF, 1x2 min in MeOH und 1x1 min in DCM gewaschen. Abschließend wurde die Oberfläche unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C unter Inertgas aufbewahrt.

b) Entschützung mit spektroskopischer Beladungsmessung

Bei der spektroskopischen Messung der Beladung einer Fmoc-NH- β -Ala-10:90-PEGMA-co-MMA-funktionalisierte Glasoberfläche wurde diese trocken in eine eben gelagerte Petrischale gegeben. Anschließend wurde 1.00 mL einer Lösung aus 20 % Piperidin in DMF (v/v) so auf die Oberfläche pipettiert, dass diese flächig benetzt wurde. Nach 20 min wurde die Lösung von der Oberfläche abpipettiert und in eine UV-Küvette überführt. Es folgte eine spektroskopische Absorptionsmessung der Entschützungslösung bei 301 nm. Als Nullprobe diente eine Absorptionsmessung einer 20% Piperidin Lösung in DMF (v/v). Die Oberflächenbeladung wurde mit Hilfe des

Experimentalteil

Lambert Beer'schen Gesetzes berechnet. Abschließend wurde die Oberfläche 3x5 min in DMF, 1x2 min in MeOH und 1x1 min in DCM gewaschen. Zuletzt wurde die Oberfläche unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C unter Inertgas aufbewahrt.

Lambert Beer'sches Gesetz:

$$\text{Beladung (nmol/cm}^2\text{)} = \frac{EV \times 10^6}{d\varepsilon A}$$

Mit: A = Fläche der Oberfläche: 19.76 cm², E = gemessene Extinktion: ε : molarer Absorptionskoeffizient: 5129 Lmol⁻¹cm⁻¹; d = Distanz: 1.00 cm.

AAV2: Acetylierung

Zur Acetylierung einer R-H-10:90-PEGMA-co-MMAoberfläche wurde diese zunächst für 10 min in DMF gequollen. Anschließend wurde die Oberfläche in einer Lösung aus 10% ESA, 20% DIPEA und 70% DMF (v/v/v) über einen Zeitraum von 4- 16 h geschüttelt. Abschließend wurde die Oberfläche 3x5 min in DMF, 1x2 min in MeOH und 1x1 min in DCM gewaschen. Zuletzt wurde die Oberfläche unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C unter Inertgas aufbewahrt.

AAV3: Fluoreszenz-Färbung von Oberflächen

Eine R-NH-10:90-PEGMA-co-MMAoberfläche wurde zunächst für 10 min in PBS-T vorgequollen. Anschließend wurde eine 200 mM TAMRA-NHS-Lösung in DMF mit einer Verdünnung von 1:20.000 in PBS-T auf die Oberfläche gegeben und über einen Zeitraum von 16 h unter Lichtausschluss inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Oberfläche 1x 5 min in PBS-T, 1x1 min in MilliQ-Wasser, 1x5 min in DMF, 2x5 min EE, 1x2 min in MeOH und 1x1 min in DCM gewaschen. Zuletzt wurde die Oberfläche unter Argon getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C unter Inertgas aufbewahrt.

AAV4: Herstellung der Donoroberflächen*a) Generelle Vorbereitung der Donoroberflächen*

Zunächst wurden Standard-Mikroskopie-Objektträger für jeweils 5 Minuten im Ultraschallbad mit einer Seifen-Lösung, MilliQ-Wasser, Isopropanol und Aceton gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger unter Argon getrocknet. Bei hartnäckigen Verschmutzungen wurden die Oberflächen manuell mit einem fusselfreien Tuch und Aceton poliert. Die so gereinigten Objektträger wurden als nächstes mit einer selbstklebenden Kapton-Folie (Kapton, DuPont/USA; cmc Klebetechnik GmbH, Frankenthal/Germany) laminiert.

b) Rotationsbeschichtung

Zur Beschichtung der Donoroberflächen via Rotationsbeschichtung wurde eine gereinigte und beklebte Oberfläche auf Drehteller eines Spin Coaters befestigt. Anschließend wurde die Oberfläche auf eine Drehzahl von 80.0 rps beschleunigt und 1.00 mL der Beschichtungslösung aufpipettiert. Nach einer Beschichtungszeit von 45 s wurde die Oberfläche aus dem Spin Coater entnommen und die Rückseite der Oberfläche mit Aceton und einem fusselfreien Tuch gesäubert.

c) Blade-Coating (Rakeln)

Zur Beschichtung einer Donoroberfläche via Blade-Coating wurde eine gereinigte und Kapton-beklebte Oberfläche auf dem Ziehtisch des Rakel-Geräts befestigt. Anschließend wurden 70.0 μL der Beschichtungslösung in den Rakelspalt (Höhe: 1500 μm) pipettiert und die Oberfläche mit einer Ziehgeschwindigkeit von 10 mm/s beschichtet.

AAV5: Herstellung der Beschichtungslösung

Zur Herstellung der Beschichtungslösung der Donoren wurden 15.0 mg des zu transferierenden Stoffes mit 135 mg S-LEC-Polymermatrix in 1.00 ml wasserfreiem DCM gelöst.

AAV6: Vorbereitung der Akzeptoroberflächen

Zunächst wurden Standard-Mikroskopie-Objektträger auf der Rückseite mithilfe eines Glas-Schreibers beschriftet. Anschließend wurden die Oberflächen für jeweils 5 Minuten im Ultraschallbad mit einer Seifen-Lösung, MilliQ-Wasser, Isopropanol und Aceton gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger unter Argon getrocknet. Bei hartnäckigen Verschmutzungen wurden die Oberflächen manuell mit einem fusselfreien Tuch und Aceton poliert. Die so gereinigten Oberflächen wurden bis zur weiteren Verwendung staubfrei aufbewahrt.

Bei der Beschichtung der Akzeptoren mit einem Polymerfilm wurden die gereinigten Oberflächen auf dem Ziehtisch eines Rakelgeräts fixiert. Anschließend wurden 70.0 µL einer 10 – 100 mg/mL Lösung des entsprechenden Polymers in DCM in den Rakelspalt (Höhe: 1500 µm) pipettiert und die Oberfläche mit einer Ziehgeschwindigkeit von 10 mm/s beschichtet.

AAV7: Lasertransfer via nano3D-Laserdrucker

Beim Materialtransfer unter Verwendung des nano3D-Laserdruckers wurde zunächst die Akzeptoroberfläche mit der zu bedruckenden Seite nach oben in die dafür vorgesehene Aussparung der Laserstage gelegt und fixiert. Anschließend wurde die zu verwendende Donoroberfläche mit der beschichteten Seite nach unten auf dem Akzeptor abgelegt. Per Computerbefehl wird das gewünschte Lasermuster übertragen. Nach Abschluss des Lasertransfers wird die verbrauchte Donoroberfläche entnommen. Dieser Vorgang wird für entsprechend zahlreiche Donoren wiederholt, bis sämtliche Materialien übertragen wurden. Zum Schluss wird die Akzeptoroberfläche entnommen und sofort umgesetzt bzw. bis zur weiteren Untersuchung unter Argon gelagert.

AAV8: Reaktionskupplung

a) Hitzeinduzierte Reaktionsführung

Zur Reaktionsführung wurden die Syntheseeoberflächen nach erfolgtem Übertrag der jeweiligen Edukte in eine argongefüllte Reaktionskammer gelegt und im Ofen für mindestens 1 h bei 90°C inkubiert. Bei der Kupplung von Aminosäuren wurde die Oberfläche im Anschluss 3x1 min mit Aceton im Ultraschallbad gewaschen.

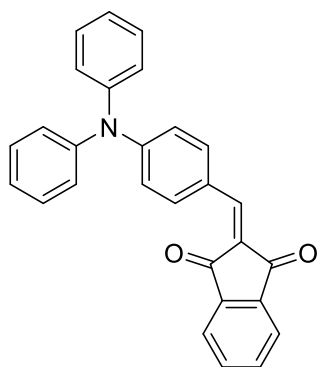
b) Reaktionsführung im Lösungsmitteldampf

In einer Glaskammer wurden einige Milliliter des jeweiligen Lösungsmittels in eine offene Petrischale pipettiert. Anschließend wurde die Glaskammer verschlossen. Nach 30 min zur Ausbildung der Lösungsmittelatmosphäre wurden die vorbereiteten Synthesoberflächen in die Kammer gelegt und für die entsprechende Reaktionszeit inkubiert.

6.4. Versuchsbeschreibungen

6.4.1. Synthese und Charakterisierung verwendeter Fluorophore

2-(4-(Diphenylamino)benzyliden)-1H-indan-1,3-dion **55** (DiPhABI)

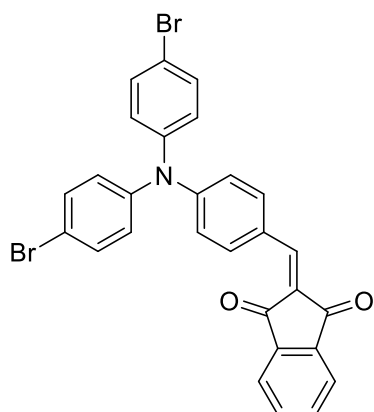


In einem Vial wurden 545 mg 4-(Diphenylamino)benzaldehyd **29** (2 mmol, 1.00 Äquiv.) mit 350 mg 1,3-Indandion **30** (2.4 mmol, 1.2 Äquiv.) in 2.00 mL gelöst. Nach der Zugabe von einigen Tropfen Piperidin wurde das Vial verschlossen und die Lösung bei 80°C über Nacht gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktion wurde der Niederschlag abfiltriert und mehrmals mit kaltem Methanol gewaschen. Ohne weitere Aufarbeitung wurden 500 mg 2-(4-(Diphenylamino)benzyliden)-1H-indan-1,3dion (1,2 mmol) als orangener Feststoff erhalten. Ausbeute: 80%. Die spektroskopischen Daten entsprachen denen aus der Literatur.¹¹⁴

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.41 (d, 2H), 7.97-7.93 (m, 2H), 7.78-7.73 (m, 3H), 7.38-7.37 (m, 4H), 7.26-7.18 (m, 6H), 7.021 (d, 2H)

MALDI (C₂₈H₁₉NO₂): *m/z* = ber. 402,1454 [M]⁺, gef.: 402,1465

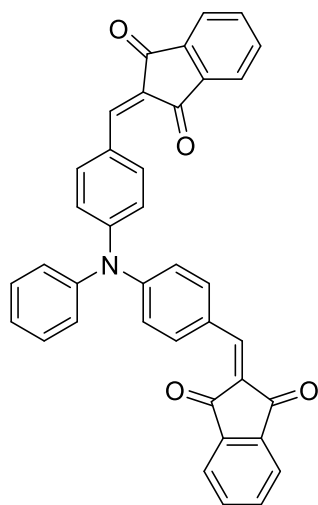
2-(4-(Bis(4-bromophenyl)amino)benzyliden)-1H-indan-1,3-dion **61** (DiBrPhABI)



In einem Vial wurden 215 mg 4-(Bis(4-Bromphenyl)amino)benzaldehyd **60** (0.5 mmol, 1.00 Äquiv.) mit 87.6 mg 1,3-Indandion **30** (0.6 mmol, 1.2 Äquiv.) in 2.00 mL gelöst. Nach der Zugabe von einigen Tropfen Piperidin wurde das Vial verschlossen und die Lösung bei 80°C über Nacht gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktion wurde der Niederschlag abfiltriert und mehrmals mit kaltem Methanol gewaschen. Ohne weitere Aufarbeitung wurden 198 mg 2-(4-(Bis(4-bromophenyl)amino)benzyliden)-1H-indan-1,3-dion (1,38 mmol) als hellorangener Feststoff erhalten. Ausbeute: 51%. Die spektroskopischen Daten entsprachen denen aus der Literatur.¹¹⁴

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.34 (d, 2H), 7.92-7.87(m, 2H), 7.73-7.68 (m, 3H), 7.41-7.37 (m, 4H), 7.00-6.94 (m, 6H)

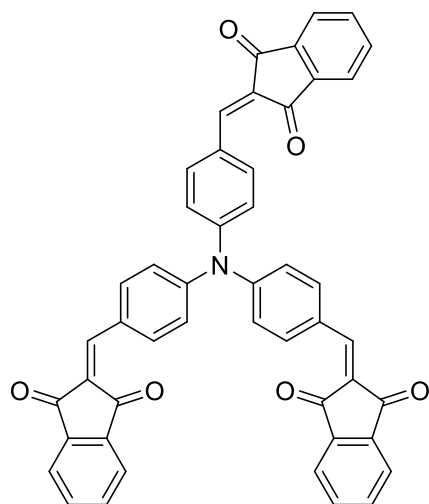
MALDI (C₂₈H₁₇Br₂NO₂): *m/z* = ber.: 559.9626 [M]⁺, gef.: 559.9652

Di(4-((1,3-Indandion-2-ylidene)methyl)phenyl)phenylamin 57 (PhADiBI)

In einem Vial wurden 600 mg 4,4'-Diformyltriphenylamin **56** (2 mmol, 1.00 Äquiv.) mit 642 mg 1,3-Indandion **30** (4.4 mmol, 2.2 Äquiv.) in 2.00 mL gelöst. Nach der Zugabe von einigen Tropfen Piperidin wurde das Vial verschlossen und die Lösung bei 80°C über Nacht gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktion wurde der Niederschlag abfiltriert und mehrmals mit kaltem Methanol gewaschen. Ohne weitere Aufarbeitung wurden 727 mg PhADiBI (1,20 mmol) als dunkelroter Feststoff erhalten. Ausbeute: 60%. Die spektroskopischen Daten entsprachen denen aus der Literatur.¹¹⁴

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.41 (d, 3H); 8.00 (q, 3H); 7.75-7.70(m, 5H); 7.36 (t, 2H); 7.030(m,7H); 7.23(m, 3H)

MALDI (C₃₈H₂₃NO₄): *m/z* = ber.: 557.1627 [M]⁺, gef.: 557.1678

Tri(4-((1,3-Indanedion-2-ylidene)methyl)phenyl)amin 59 (TriABI)

In einem Vial wurden 660 mg 4-(Trisformphenyl)amin **58** (2 mmol, 1.00 Äquiv.) mit 642 mg 467 mg-1,3-Indandion **30** (6.4 mmol, 3.2 Äquiv.) in 2.00 mL gelöst. Nach der Zugabe von einigen Tropfen Piperidin wurde das Vial verschlossen und die Lösung bei 80°C über Nacht gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktion wurde der Niederschlag abfiltriert und mehrmals mit kaltem Methanol gewaschen. Ohne weitere Aufarbeitung wurden 641 mg ATriBI (0.98 mmol) als dunkelroter Feststoff erhalten. Ausbeute: 45%. Die spektroskopischen Daten

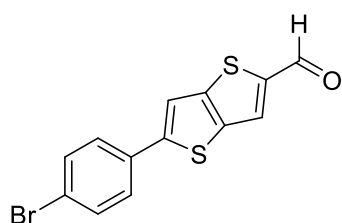
entsprachen denen aus der Literatur.¹¹⁴

¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.54(d, 6H); 7.96-7.90(m, 6H); 7.81-7.70(m, 12H); 7.32 (d, 3H).

MALDI (C₄₈H₂₇NO₆): *m/z* = ber.: 713.1838 [M]⁺, gef.: 713.1838

6.4.2. Synthesevorschriften und Charakterisierung eingesetzter Edukte

5-Bromothieno[3,2-b]thiophen-2-carbaldehyd



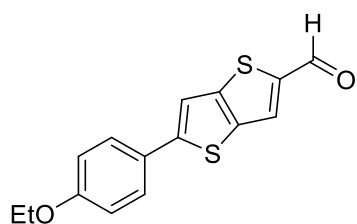
Zu Beginn wurden 1.00 g Thieno[3,2-b]thiophen-2-carbaldehyd (5.94 mmol, 1.00 Äq.) in 20 mL Chloroform gelöst. Die entstandene Lösung wurde anschließend auf 0 °C gekühlt und es wurden 0.54 g NaHCO₃ zugegeben. Im Anschluss wurden tropfenweise 0.300 mL Brom (5.94 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben.

Danach wurde die Lösung 2 h gerührt, während sie langsam auf Raumtemperatur gebracht wurde. Zur Neutralisation des überschüssigen Broms wurden der Reaktionsmischung im Anschluss 50 mL gesättigte Na₂S₂O₃-Lösung zugegeben. Im Anschluss wurden die wässrige von der organischen Phase getrennt. Die organische Phase wurde dreimal mit jeweils 20 mL Wasser extrahiert und die wässrige Phase wurde dreimal mit jeweils 20 mL DCM extrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen vereint und mit Na₂SO₄ getrocknet. Im Anschluss wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und es entstand eine schwarze, viskose Flüssigkeit, welche mittels Trockenbeladung säulenchromatographisch aufgereinigt (SiO₂, CH/EtOAc 6:1 → 1:1).

Auf diese Weise wurde reines 5-Bromothieno[3,2-b]thiophen-2-carbaldehyd in Form eines grauen Feststoffs erhalten (1.22 g, 4.94 mmol, 83 %). Die spektroskopischen Daten entsprachen denen der Literatur.¹⁰⁷

Rf (SiO₂, CH/EtOAc 2:1) = 0,65. - ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.97 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.36 (d, J = 0.7 Hz, 1H).

5-(4-(Ethoxy)phenyl)thieno[3,2-b]thiophen-2-carbaldehyd **45**



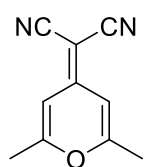
Es wurden 0.500 g 5-Bromothieno[3,2-b]thiophen-2-carbaldehyd (2.00 mmol, 1.00 Äq.) gemeinsam mit 0,440 g 4-(Ethoxy)phenylboronsäure (2.65 mmol, 1.33 Äq.) in einem verschließbaren Vial vorgelegt. Anschließend wurden 2.75 g K₂CO₃ (2.00 mmol, 10.0 Äq.) und 0.230 g Pd(PPh₃)₄ (0.200 mmol, 0.10 Äq.) zugegeben und das Vial fünf mal jeweils evakuiert und mit Argon geflutet.

Anschließend wurden 30 mL trockenes Toluol sowie 16 mL Ethanol zugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung 2 h bei 100 °C refluxiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur

wurde der Feststoff abfiltriert und mit DCM gewaschen. Das entstehende braun-grüne, feste Rohprodukt wurde säulenchromatisch aufgereinigt (SiO₂, CH/EtOAc 10:1 → 1:1). Auf diese Weise wurde reines 5-(4-(Ethoxy)phenyl)thieno[3,2-b]thiophen-2-carbaldehyd in Form eines hellgelben Pulvers erhalten (0.400 g, 1.23 mmol, 62 %). Die spektroskopischen Daten entsprachen denen aus der Literatur.¹⁰⁷

Rf (SiO₂, CH/EtOAc 2:1) = 0,70. - ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.94 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.58 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.42 (s, 1H), 6.95 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.09 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.45 (t, J = 7.0 Hz, 3H).

2-(2,6-Dimethyl-4H-pyran-4-yliden)malononitril **49**

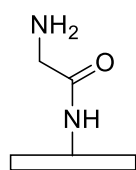


Zu Beginn wurden unter kräftigem Rühren 4.82 g 2,6-Dimethyl-γ-pyrinon (38.8 mmol, 1.00 Äq.) in 8 mL Acetanhydrid gelöst. Anschließend wurden 2.88 g (43.6 mmol, 1.12 Äq.) Malonsäuredinitril zugegeben. Die entstandene Lösung wurde 25 h bei 140 °C refluxiert. Im Anschluss wurde die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur gebracht und der entstandene schwarz-grüne Feststoff abfiltriert. Der Feststoff wurde aus Ethanol umkristallisiert und es entstand braunes Pulver. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt. Auf diese Weise wurde das reine 2-(2,6-Dimethyl-4H-pyran-4-yliden)malononitril in Form eines gelb-orangen Pulvers erhalten (4.20 g, 24.4 mmol, 63 %). Die spektroskopischen Daten entsprachen denen aus der Literatur.¹⁰⁸

Rf (SiO₂, CH/EtOAc 2:1) = 0.50. - ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 6.55 (s, 2H), 2.32 (s, 6H).

6.4.3. Laser-basierte Synthesen

NH₂-Glyoberflächengebunden



Eine Fmoc-NH-β-Ala-10:90-PEGMA-co-MMAoberfläche wurde nach AAV1 Fmoc-entschützt. Die benötigten Donoren wurden nach AAV 4 über Spincoating hergestellt.

a) Aktivestermethode

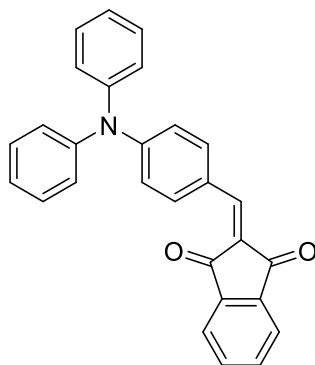
Nach AAV7 wurde Fmoc-Gly-OPfp per Laserimpuls übertragen. Im Anschluss wurde die Aminosäure nach AAV8 im Ofen für 90 min bei 90°C unter Argon an die Oberfläche gekuppelt.

b) Anknüpfung durch den Transfer von Kupplungsreagenzien

Nach AAV 7 wurden zunächst Fmoc-Gly-OH auf die Syntheseoberfläche übertragen. Als zweite Lage wurde DIC übertragen. Anschließend wurde die Aminosäure nach AAV8 im Ofen für 90 min bei 90°C unter Argon an die Oberfläche gekuppelt.

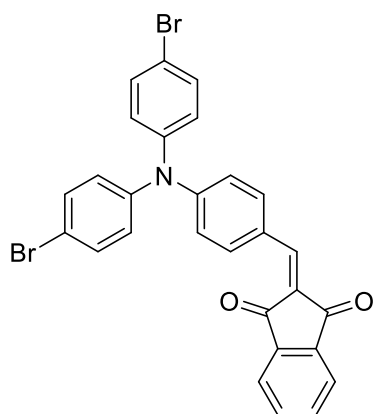
Nach der Kupplung wurden die Oberflächen für 3x1 min mit Aceton im Ultraschallbad gewaschen. Zur Acetylierung freier Reaktionsstellen wurde die Oberfläche nach AAV2 acetyliert. Am Ende wurde die Oberfläche erneut nach AAV1 entschützt. Die Produkte wurden via Fluoreszenzmarkierung detektiert. Dazu wurde nach AAV 3 die Oberfläche mit 10.0 mL TAMRA-NHS in PBS-T (1:10 000) bei RT inkubiert.

2-(4-(Diphenylamino)benzyliden)-1H-indan-1,3-dion 55 (DiPhABI)



Eine Glasoberfläche wurde nach AAV6 zur Verwendung als Akzeptor vorbereitet. Anschließend wurde DiPhABA **29** (1. Lage), 1,3-Indandion **30** (2. Lage) und DNAM **62** (3.Lage) nach AAV7 lasertransferiert. Nach dem Transfer wurde die Reaktion nach AAV8 für 16 h bei 90°C unter Argon im Ofen durchgeführt. Die erfolgreiche Synthese wurde *via* Fluoreszenz detektiert.

MALDI (C₂₈H₁₉NO₂): *m/z* = ber. 402,1454 [M]⁺, gef.: 402,1465

2-(4-(Bis(4-bromophenyl)amino)benzyliden)-1H-indan-1,3-dion (DiBrPhABI) 61

gef.: 559.9652

Eine Glasoberfläche wurde nach AAV6 zur Verwendung als Akzeptor vorbereitet. Anschließend wurde DiBrPhABA **60** (1. Lage), DNAM (2. Lage) und 1,3-Indandion **30** (3. Lage) nach AAV7 lasertransferiert. Nach dem Transfer wurde die Reaktion nach AAV8 für 16 h bei 90°C unter Argon im Ofen durchgeführt. Die erfolgreiche Synthese wurde *via* Fluoreszenz detektiert.

MALDI (C₂₈H₁₇Br₂NO₂): m/z = ber.: 559.9626 [M]⁺,

7. Lebenslauf

Andreas Klinkusch

Geburtsort: Pforzheim

Geburtsdatum: 30.03.1993

Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademischer Werdegang:

Seit 09/2017 Promotion Chemie

Institut für Mikrostrukturtechnik (IMT) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D)

- Thema der Doktorarbeit: *Miniaturisierte Synthese von kombinatorischen Arrays fluoreszierender Moleküle via nano3D Laserprinting*

09/2015 – 08/2017 Master Studium chemische Biologie

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D)

- Thema der Masterarbeit: *Evaluation neuer multimodaler Anti-Cancer-Wirkstoffe* am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D).
- 04/2016 – 08/2016 studentische Hilfskraft am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG I) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D).

09/2012 – 09/2015: Bachelor Studium chemische Biologie

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D)

- Thema der Bachelorarbeit: *Kombinatorische Synthese und Hochdurchsatzmikroskopie einer Peptidbibliothek* am Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D).

07/2012: Abitur

Gymnasium Neuenbürg (D)

Schulungen und Weiterbildungen:

2018: *Qualitätssicherung in der regulierten Forschung - GxP (GLP, GMP, GCLP)*

Fortbildungszentrum für Technik und Umwelt (FTU), Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D)

2019: *11th Short Course on Coating and Drying of Thin Films*

Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V.

2019: *Sicher arbeiten im chemischen Labor*

Fortbildungszentrum für Technik und Umwelt (FTU), Karlsruher Institut für Technologie (KIT) (D)

Publikationen

Grigori Paris, Andreas Klinkusch, Jasmin Heidepriem, Alexandra Tsouka, Junfang Zhang, Marco Mende, Daniela S. Mattes, Dario Mager, Hans Riegler, Stephan Eickelmann, Felix F. Loeffler, *Appl. Surf. Sci.*, **2020**, Vol. 508, 144973. *Laser-induced forward transfer of soft material nanolayers with millisecond pulses shows contact-based material deposition.*

Konferenzbeiträge

Andreas Klinkusch, Posterpräsentation beim Ideenwettbewerb Biotechnologie – „Von der Natur lernen“, 2019, Stuttgart, Deutschland. *Nanostapel – Laser-basierte Nanostrukturierung für die Materialforschung*

8. Danksagung

Ich danke zunächst Herrn Prof. Dr. Breitling für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen und den unermüdlichen Quell an Ideen, welche aus so mancher Sackgasse geholfen haben.

Ich danke dem Arbeitskreis für die lockere und offene Atmosphäre und hilfreichen Diskussionen. Besonderer Dank gilt Dr. Daniela Mattes für die allgemeine Unterstützung bei der Planung von zahlreichen Experimenten und Hilfestellungen. Dr. Laura Weber danke ich für die Zusammenarbeit während der Etablierung des neuen Lasersystems, sowie die einfache Umsetzung verschiedener Änderungswünsche. Außerdem danke ich Clarine Gedigk für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor.

Ich danke Peter Gödtel und Robin Rastetter für die Aufnahme der Fluoreszenz-Spektren, sowie die Durchführung der NMR-Messungen.

Carsten Hopf und seiner Gruppe an der HS Mannheim danke ich für die Kooperation zur Messung der MALDI-Imaging Aufnahmen. Besonders danke ich hier Qin Zhou für die Durchführung zahlreicher Messungen.

Ich danke Richard Thelen für die Einweisung und Hilfestellung bei diversen VSI-Messungen.

Dr. Benjamin Bitterer, Dr. Anna Meschkov und Dr. Daniela Mattes danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden, vor allem meiner Freundin Sabrina, sowie Anna, Adel und Kim, danke ich für ihre Unterstützung und Motivation.

9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µm	Mikrometer
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>engl.: atomic force microscopy</i>)
AHCCA	α-Cyano-4-hydroxymimtsäure
Ala	Alanin
AOM	Akustooptischer Modulator
Asn	Asparagin
ATriBI	Tri(4-((1,3-Indanedion-2-ylidene)methyl)phenyl)amin
BA-LIFT	Blasengesteuerter laserinduzierter Materialtransfer (<i>engl.: blister-actuated Laser-induced forward transfer</i>)
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl-
BODIPY	Bordipyrrromethan
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
cLIFT	kombinatorischer Laserinduzierter Materialtransfer (<i>engl.: combinatorial Laser-induced forward transfer</i>)
cm	Zentimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cys	Cystein
d	Duplett
DAN	1,5-Diaminonaphthalin
DANN	Desoxyribonucleinsäure
DBU	Diazabicycloundecen
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
DHAP	2,6-Dihydroxyacetophenon
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DiBrPhABI	4-(Dibromphenylamino)benzaldehyd
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin

Abkürzungsverzeichnis

DiPhABA	<i>p</i> -(Diphenylamino)benzaldehyd
DiPhABBA	5-(4-(diphenylamino)benzyliden)-1,3-dimethylbarbitursäure
DiPhABI	2-(4-(diphenylamino)benzyliden)-1H-indan-1,3(2H)-dion
DMAN	1,8-Bis(N,N-Dimethylamino)naphthalin
DMAN	1,8-Bis-(Dimethylamino)naphthalin
DMF	Dimethylformamid
EE	Essigsäureethylester
Em.	Emission
ESA	Essigsäureanhydrid
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
Fmoc	9H-Flouren-9-ylmethoxycarbonyl
G	Glycin
gef.	Gefunden
Gly	Glycin
h	Stunden
His	Histidin
HOMO	Höchstes besetztes Moleülorbital (<i>engl.: highest occupied molecular orbital</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC	interne Konversion
IMT	Institut für Mikrostrukturtechnik
ISC	Intersystem Crossing
ITO	Indiumzinnoxid
Kap.	Kapitel
KIT	Karlsruher Institut für Technologie
LED	Leuchtdiode (<i>engl.: Light emitting diode</i>)
LIFT	laserinduzierter Materialtransfer (<i>engl: Laser induced forward transfer</i>)
LUMO	niedrigstes unbesetztes Molekülorbital (<i>engl.: lowest unoccupied molecular orbital</i>)
m	Multipllett
<i>m/z</i>	Masseladungsverhältnis
MALDI	Matrix unterstützte Laser desorption/ ionization (<i>engl: Matrix assisted Laser desorption/ ionization</i>)
max.	maximal
MeOH	Methanol
Min	Minuten

min.	minimal
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
MMA	Methylmethacrylat
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MSI	ortaufgelöste Massenspektroskopie (<i>engl.: mass spectroscopy Imaging</i>)
MTP	Multititerplatte
mW	Milliwatt
mW	Milliwatt
MW	Molekulargewicht
nm	Nanometer
NMR	Magnetkernresonanz (<i>engl.: nuclear magnetic resonance</i>)
OLED	organische Leuchtdiode
Opfp	Pentafluorophenyl Ester
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEGMA	Poly(ethylenglycol)methacrylat
PhADiBI	Di(4-((1,3-Indandion-2-ylidene)methyl)phenyl)phenylamin
PMT	Photomultiplier
Pos.	Position
ppm	parts per million
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonucleinsäure
rps	Umdrehungen pro Sekunde (<i>engl.: revolutions per second</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
sog.	sogenannt
SPAAC	Spannungsgesteuerte Alkin-Azid Cycloaddition (<i>engl.: Strain promoted Alkyne Azide Cycloaddition</i>)
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>engl.: solid phase peptide synthesis</i>)
Tab.	Tabelle
TAMRA	5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin
tBu	<i>tert</i> -Butyl-
T _G	Glasübergangstemperatur
ToF	Flugzeit (<i>engl.: Time of Flight</i>)

Abkürzungsverzeichnis

Trt	Trityl-
UV	Ultraviolett
V	Volumen
vgl.	vergleiche
VR	vibronische Relaxation
VSI	Vertikale Scanning Interferometrie
w%	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel
μL	Mikroliter
μmol	Mikromol

10. Literaturverzeichnis

1. Cong, P.; Doolen, R. D.; Fan, Q.; Giaquinta, D. M.; Guan, S.; McFarland, E. W.; Poojary, D. M.; Self, K.; Turner, H. W.; Weinberg, W. H., High-Throughput Synthesis and Screening of Combinatorial Heterogeneous Catalyst Libraries. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38* (4), 483-488.
2. Stadler, V.; Felgenhauer, T.; Beyer, M.; Fernandez, S.; Leibe, K.; Güttler, S.; Gröning, M.; König, K.; Torralba, G.; Hausmann, M.; Lindenstruth, V.; Nesterov-Mueller, A.; Block, I.; Pipkorn, R.; Poustka, A.; Bischoff, F.; Breitling, F., Combinatorial Synthesis of Peptide Arrays with a Laser Printer. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2008**, *47*, 7132-5.
3. Wu, H.; Ge, J.; Uttamchandani, M.; Yao, S. Q., Small molecule microarrays: the first decade and beyond. *Chemical Communications* **2011**, *47* (20), 5664-5670.
4. Duffner, J. L.; Clemons, P. A.; Koehler, A. N., A pipeline for ligand discovery using small-molecule microarrays. *Current opinion in chemical biology* **2007**, *11* (1), 74-82.
5. Uttamchandani, M.; Yao, S. Q., The Expanding World of Small Molecule Microarrays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2017**, *1518*, 1-17.
6. Lam, K. S.; Renil, M., From combinatorial chemistry to chemical microarray. *Current opinion in chemical biology* **2002**, *6* (3), 353-8.
7. Benz, M.; Asperger, A.; Hamester, M.; Welle, A.; Heissler, S.; Levkin, P. A., A combined high-throughput and high-content platform for unified on-chip synthesis, characterization and biological screening. *Nat Commun* **2020**, *11* (1), 5391.
8. Burchak, O. N.; Mugheri, L.; Ostuni, M.; Lacapère, J. J.; Balakirev, M. Y., Combinatorial Discovery of Fluorescent Pharmacophores by Multicomponent Reactions in Droplet Arrays. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (26), 10058-10061.
9. Benz, M.; Molla, M. R.; Böser, A.; Rosenfeld, A.; Levkin, P. A., Marrying chemistry with biology by combining on-chip solution-based combinatorial synthesis and cellular screening. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 2879.
10. Loeffler, F. F.; Foertsch, T. C.; Popov, R.; Mattes, D. S.; Schlageter, M.; Sedlmayr, M.; Ridder, B.; Dang, F. X.; von Bojnacic-Kninski, C.; Weber, L. K.; Fischer, A.; Greifenstein, J.; Bykovskaya, V.; Buliev, I.; Bischoff, F. R.; Hahn, L.; Meier, M. A.; Brase, S.; Powell, A. K.; Balaban, T. S.; Breitling, F.; Nesterov-Mueller, A., High-flexibility combinatorial peptide synthesis with laser-based transfer of monomers in solid matrix material. *Nat Commun* **2016**, *7*, 11844.
11. Mattes, D. S. Synthese von Peptiden, Peptoiden und Protein-ähnlichen Strukturen im μ Arrayformat. Ph.D. thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2018.
12. Förtsch, T. C. Kombinatorischer laserinduzierter Vorwärtstransfer zur Herstellung von biomolekularen Mikroarrays. Ph.D. thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2017.
13. Ritchie, H. R., Max Germany: CO2 Country Profile. <https://ourworldindata.org/co2/country/germany?country=~DEU#what-are-the-country-s-annual-co2-emissions> (accessed 06.08.).
14. Lindsey, R. Climate Change: Atmospheric Carbon Dioxide. <https://www.climate.gov/news-features/understanding-climate/climate-change-atmospheric-carbon-dioxide> (accessed 06.08.).
15. Hannah, R. Who has contributed most to global CO2 emissions? <https://ourworldindata.org/contributed-most-global-co2> (accessed 06.08.).
16. Anatomie einer Katastrophe - was die Klimakrise wirklich bedeutet. <https://projekte.sueddeutsche.de/artikel/politik/was-die-klimakrise-wirklich-bedeutet-e946076/> (accessed 25.07.).
17. Hepburn, C.; Adlen, E.; Beddington, J.; Carter, E. A.; Fuss, S.; Mac Dowell, N.; Minx, J. C.; Smith, P.; Williams, C. K., The technological and economic prospects for CO2 utilization and removal. *Nature* **2019**, *575* (7781), 87-97.
18. Müller, T. E.; Leitner, W., CO2 Chemistry. *Beilstein journal of organic chemistry* **2015**, *11*, 675-677.

19. Hahndorf, I.; Buyevskaya, O.; Langpape, M.; Grubert, G.; Kolf, S.; Guillon, E.; Baerns, M., Experimental equipment for high-throughput synthesis and testing of catalytic materials. *Chemical Engineering Journal* **2002**, *89* (1), 119-125.
20. Lebl, M., New technique for high-throughput synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9* (9), 1305-1310.
21. Lin, S.; Dikler, S.; Blincoe, W. D.; Ferguson, R. D.; Sheridan, R. P.; Peng, Z.; Conway, D. V.; Zawatzky, K.; Wang, H.; Cernak, T.; Davies, I. W.; DiRocco, D. A.; Sheng, H.; Welch, C. J.; Dreher, S. D., Mapping the dark space of chemical reactions with extended nanomole synthesis and MALDI-TOF MS. *Science* **2018**, *361* (6402).
22. Krska, S. W.; DiRocco, D. A.; Dreher, S. D.; Shevlin, M., The Evolution of Chemical High-Throughput Experimentation To Address Challenging Problems in Pharmaceutical Synthesis. *Accounts of Chemical Research* **2017**, *50* (12), 2976-2985.
23. Muller, P., Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry* **1994**, *66* (5), 1077-1184.
24. Fields, G. B., Introduction to peptide synthesis. *Curr Protoc Protein Sci* **2002**, Chapter 18, Unit-18.1.
25. Merrifield, B., Solid phase synthesis. *Science* **1986**, *232* (4748), 341-7.
26. Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85* (14), 2149-2154.
27. Walters, D. E., Amino Acid and Peptide Synthesis. Second Edition By John Jones. Oxford University Press, New York. 2002. 92 pp. 19 x 25 cm. ISBN 0-19-925738-8. \$15.95. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46* (17), 3770-3770.
28. Montalbetti, C.; Falque, V., Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
29. Carpino, L. A.; Han, G. Y., 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37* (22), 3404-3409.
30. Wuts, P. G. M.; Greene, T. W., *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*. 2006; p 533-646.
31. Sheehan, J. C.; Hess, G. P., A New Method of Forming Peptide Bonds. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77* (4), 1067-1068.
32. Subirós-Funosas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F., PyOxP and PyOxB: the Oxyma-based novel family of phosphonium salts. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8* (16), 3665-3673.
33. Fields, C. G.; Lloyd, D. H.; Macdonald, R. L.; Otteson, K. M.; Noble, R. L., HBTU activation for automated Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Peptide research* **1991**, *4* (2), 95-101.
34. Knoevenagel, E., Condensation von Malonsäure mit aromatischen Aldehyden durch Ammoniak und Amine. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1898**, *31* (3), 2596-2619.
35. Cope, A. C.; Hofmann, C. M.; Wyckoff, C.; Hardenbergh, E., Condensation Reactions. II. Alkylidene Cyanoacetic and Malonic Esters. *Journal of the American Chemical Society* **1941**, *63*, 3452-3456.
36. Jones, G., The Knoevenagel Condensation. In *Organic Reactions*, pp 204-599.
37. Cope, A. C., Condensation Reactions. I. The Condensation of Ketones with Cyanoacetic Esters and the Mechanism of the Knoevenagel Reaction. *Journal of the American Chemical Society* **1937**, *59* (11), 2327-2330.
38. Kent, S., Bruce Merrifield (1921–2006). *Nature* **2006**, *441* (7095), 824-824.
39. Xiang, X.-D., High throughput synthesis and screening for functional materials. *Applied Surface Science* **2004**, *223* (1), 54-61.
40. Chighine, A.; Sechi, G.; Bradley, M., Tools for efficient high-throughput synthesis. *Drug Discovery Today* **2007**, *12* (11), 459-464.
41. Sutanto, F.; Shaabani, S.; Oerlemans, R.; Eris, D.; Patil, P.; Hadian, M.; Wang, M.; Sharpe, M. E.; Groves, M. R.; Dömling, A., Combining High-Throughput Synthesis and High-Throughput Protein Crystallography for Accelerated Hit Identification. *Angew Chem Int Ed Engl* **2021**, *60* (33), 18231-18239.

42. Houghten, R. A., General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1985**, *82* (15), 5131-5135.
43. Szymczak, L. C.; Kuo, H.-Y.; Mrksich, M., Peptide Arrays: Development and Application. *Analytical chemistry* **2018**, *90* (1), 266-282.
44. Ahn, J. M.; Kassees, K.; Lee, T. K.; Manandhar, B.; Yousif, A. M., 6.03 - Strategy and Tactics for Designing Analogs: Biochemical Characterization of the Large Molecules☆. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, Chackalamannil, S.; Rotella, D.; Ward, S. E., Eds. Elsevier: Oxford, 2017; pp 66-115.
45. Geysen, H. M.; Meloen, R. H.; Barteling, S. J., Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**, *81* (13), 3998-4002.
46. 96-Well Plate Dimensions [Standard Microplate]. <https://www.wellplate.com/96-well-plate-dimensions/> (accessed 06.08.).
47. Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchňák, V., The "One-Bead-One-Compound" Combinatorial Library Method. *Chemical Reviews* **1997**, *97* (2), 411-448.
48. Fodor, S. P.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D., Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **1991**, *251* (4995), 767-73.
49. Frank, R., Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* **1992**, *48* (42), 9217-9232.
50. Hansen, L. B.; Buus, S.; Schafer-Nielsen, C., Identification and Mapping of Linear Antibody Epitopes in Human Serum Albumin Using High-Density Peptide Arrays. *PLOS ONE* **2013**, *8* (7), e68902.
51. Breiting, F.; Nesterov, A.; Stadler, V.; Felgenhauer, T.; Bischoff, F. R., High-density peptide arrays. *Molecular BioSystems* **2009**, *5* (3), 224-234.
52. Oudeng, G.; Benz, M.; Popova, A. A.; Zhang, Y.; Yi, C.; Levkin, P. A.; Yang, M., Droplet Microarray Based on Nanosensing Probe Patterns for Simultaneous Detection of Multiple HIV Retroviral Nucleic Acids. *ACS Appl Mater Interfaces* **2020**, *12* (50), 55614-55623.
53. Benz, M. chemBIOS – Unifying On-Chip Solution-Based Organic Synthesis, Characterization and Biological Screening in Drug Discovery. Ph.D. thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2020.
54. Feng, W.; Li, L.; Ueda, E.; Li, J.; Heißler, S.; Welle, A.; Trapp, O.; Levkin, P. A., Surface Patterning via Thiol-Yne Click Chemistry: An Extremely Fast and Versatile Approach to Superhydrophilic-Superhydrophobic Micropatterns. *Advanced Materials Interfaces* **2014**, *1* (7), 1400269.
55. Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Michael, J. R.; Ritchie, N. W. M.; Scott, J. H. J.; Joy, D. C., Electron Beam—Specimen Interactions: Interaction Volume. In *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Springer New York: New York, NY, 2018; pp 1-14.
56. Michler, G. H., Richtungen der Elektronenmikroskopie. In *Kompakte Einführung in die Elektronenmikroskopie: Techniken, Stand, Anwendungen, Perspektiven*, Springer Fachmedien Wiesbaden: Wiesbaden, 2019; pp 7-31.
57. Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Michael, J. R.; Ritchie, N. W. M.; Scott, J. H. J.; Joy, D. C., Secondary Electrons. In *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Springer New York: New York, NY, 2018; pp 29-37.
58. Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Michael, J. R.; Ritchie, N. W. M.; Scott, J. H. J.; Joy, D. C., Image Defects. In *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, Springer New York: New York, NY, 2018; pp 133-146.
59. Zhong, J.; Yan, J., Seeing is believing: atomic force microscopy imaging for nanomaterial research. *RSC Advances* **2016**, *6* (2), 1103-1121.
60. Kajiyama, T.; Tanaka, K.; Ge, S. R.; Takahara, A., Morphology and mechanical properties of polymer surfaces via scanning force microscopy. *Progress in Surface Science* **1996**, *52* (1), 1-52.
61. Cappella, B.; Dietler, G., Force-distance curves by atomic force microscopy. *Surface Science Reports* **1999**, *34* (1), 1-104.

62. Bozec, L.; Horton, M., Topography and Mechanical Properties of Single Molecules of Type I Collagen Using Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* **2005**, *88* (6), 4223-4231.
63. Legutko, S.; Krolczyk, G.; Królczyk, J., Quality Evaluation of Surface Layer in Highly Accurate Manufacturing. *Manufacturing Technology* **2014**, *14*, 50-56.
64. Pignatelli, I.; Kumar, A.; Shah, K.; Balonis, M.; Bauchy, M.; Wu, B.; Sant, G., Vertical scanning interferometry: A new method to quantify re-/de-mineralization dynamics of dental enamel. *Dental Materials* **2016**, *32* (10), e251-e261.
65. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J., Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Analytical Chemistry* **1997**, *69* (23), 4751-4760.
66. Schulz, S.; Becker, M.; Groseclose, M. R.; Schadt, S.; Hopf, C., Advanced MALDI mass spectrometry imaging in pharmaceutical research and drug development. *Current Opinion in Biotechnology* **2019**, *55*, 51-59.
67. Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M., Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nature Medicine* **2001**, *7* (4), 493-496.
68. Reyzer, M. L.; Hsieh, Y.; Ng, K.; Korfmacher, W. A.; Caprioli, R. M., Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS* **2003**, *38* (10), 1081-92.
69. Zhou, Q.; Fülöp, A.; Hopf, C., Recent developments of novel matrices and on-tissue chemical derivatization reagents for MALDI-MSI. *Anal Bioanal Chem* **2021**, *413* (10), 2599-2617.
70. Mattes, D. S.; Streit, B.; Bhandari, D. R.; Greifenstein, J.; Foertsch, T. C.; Munch, S. W.; Ridder, B.; C, V. B.-K.; Nesterov-Mueller, A.; Spengler, B.; Schepers, U.; Brase, S.; Loeffler, F. F.; Breitling, F., Combinatorial Synthesis of Peptoid Arrays via Laser-Based Stacking of Multiple Polymer Nanolayers. *Macromol Rapid Commun* **2019**, *40* (6), e1800533.
71. Paris, G.; Klinkusch, A.; Heidepriem, J.; Tsouka, A.; Zhang, J.; Mende, M.; Mattes, D. S.; Mager, D.; Riegler, H.; Eickelmann, S.; Loeffler, F. F., Laser-induced forward transfer of soft material nanolayers with millisecond pulses shows contact-based material deposition. *Applied Surface Science* **2020**, *508*, 144973.
72. Park, B.; Han, M.-y., Organic light-emitting devices fabricated using a premetered coating process. *Opt. Express* **2009**, *17* (24), 21362-21369.
73. Spin Coating: Complete Guide to Theory and Techniques. <https://www.ossila.com/pages/spin-coating#spin-coating-thickness-equation> (accessed 31.07.2021).
74. Birnie, D. P., Spin Coating Technique. In *Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users*, Aegerter, M. A.; Mennig, M., Eds. Springer US: Boston, MA, 2004; pp 49-55.
75. Taruschkina, A. Peptidarrays für antibiotische und enzymatische Aktivitäten und laserbasierter Transfer von Materialien. Master Thesis, KIT, 2018.
76. Demirdögen, Y. N. Synthese von Peptidarrays mit der ein-Loch-ein-Peptid-Methode, sowie Herstellung von Donorfolien für die Materialforschung. Bachelor-Thesis, KIT, 2018.
77. Solution-Processing Techniques: A Comparison - Blade Coating. <https://www.ossila.com/pages/solution-processing-techniques-comparison#DoctorBlading> (accessed 31.07.2021).
78. Turner, G. P. A., 12 - General industrial paints. In *Paint and Surface Coatings (Second Edition)*, Lambourne, R.; Strivens, T. A., Eds. Woodhead Publishing: 1999; pp 502-528.
79. Berni, A.; Mennig, M.; Schmidt, H., Doctor Blade. In *Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users*, Aegerter, M. A.; Mennig, M., Eds. Springer US: Boston, MA, 2004; pp 89-92.
80. Valeur, B. B.-S., M. N., *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*. 2. Edition ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2012.
81. Vekshin, N., *Photonics of Biopolymers*. 1 ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 202.
82. Braslavsky, S. E., Glossary of terms used in photochemistry. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79* (3), 293-465.

83. Romero, N. A.; Nicewicz, D. A., Organic Photoredox Catalysis. *Chemical Reviews* **2016**, *116* (17), 10075-10166.
84. A. Jain, C. B., V. Subramaniam, *Advances in Biomedical Engineering*. Elsevier: 2009.
85. Kurreck, H., Spektroskopie an biologischen Beispielen: Spektroskopische Methoden in der Biochemie. Von H. J. Galla. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1988. 147 S., 214 Abb., 13 Tab. DM 40,-. ISBN 3-13-712301-1. *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* **1988**, *36* (9), 1008-1008.
86. Klán, P.; Wirz, J., Introduction. In *Photochemistry of Organic Compounds*, 2009; pp 1-23.
87. Bojničić-Kninski, C. v. Entwicklung von optischen Systemen für die kombinatorische Materialablagerung und die großflächige Detektion im Rahmen von Hochdurchsatzverfahren. Ph.D. thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2018.
88. Märkle, F. Laserbasierte Verfahren zur Herstellung hochdichter Peptidarrays. Ph.D. thesis, 2014.
89. Popov, R. Process Development for Manufacturing Stochastic Peptide Microarrays. Ph.D. thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2018.
90. Turkoz, E.; Fardel, R.; Arnold, C. B., Advances in Blister-Actuated Laser-Induced Forward Transfer (BA-LIFT). In *Laser Printing of Functional Materials*, 2018; pp 91-121.
91. Kattamis, N. T.; Brown, M. S.; Arnold, C. B., Finite element analysis of blister formation in laser-induced forward transfer. *Journal of Materials Research* **2011**, *26* (18), 2438-2449.
92. Streit, B. Kombinatorische Synthese von Peptiden und Peptoiden. Masterthesis, KIT, Karlsruhe, 2017.
93. Brown, M. S.; Kattamis, N. T.; Arnold, C. B., Time-resolved study of polyimide absorption layers for blister-actuated laser-induced forward transfer. *Journal of Applied Physics* **2010**, *107* (8), 083103.
94. Serra, P.; Piqué, A., Introduction to Laser-Induced Transfer and Other Associated Processes. In *Laser Printing of Functional Materials*, 2018; pp 3-16.
95. Münster, B. Entwicklung von Mikropartikeln für die kombinatorische Synthese hochdichter Peptidarrays durch laserbasierte Verfahren. Ph.D. thesis, 2014.
96. Zhang, J.; Zou, Y.; Eickelmann, S.; Njel, C.; Heil, T.; Ronneberger, S.; Strauss, V.; Seeberger, P. H.; Savateev, A.; Loeffler, F. F., Laser-driven growth of structurally defined transition metal oxide nanocrystals on carbon nitride photoelectrodes in milliseconds. *Nature Communications* **2021**, *12* (1), 3224.
97. Serra, P.; Piqué, A., Laser-Induced Forward Transfer: Fundamentals and Applications. *Advanced Materials Technologies* **2019**, *4* (1).
98. Gedigk, C. Entwicklung von Peptidarrays für die Erforschung von Autoimmunerkrankungen. Master Thesis, KIT, 2021.
99. Emslie, A. G.; Bonner, F. T.; Peck, L. G., Flow of a Viscous Liquid on a Rotating Disk. *Journal of Applied Physics* **1958**, *29* (5), 858-862.
100. Yimsiri, P.; Mackley, M., Spin and dip coating of light-emitting polymer solutions: Matching experiment with modelling. *Chemical Engineering Science* **2006**, *61*, 3496-3505.
101. Pfeffer, A. Beschichtungsverfahren im Kontext der Herstellung von Peptidarrays. Master Thesis, KIT, Karlsruhe, 2014.
102. Kryou, C.; Zergioti, I., Origins of Laser-Induced Transfer Processes. In *Laser Printing of Functional Materials*, 2018; pp 17-36.
103. Palla Papavlu, A.; Lippert, T., LIFT Using a Dynamic Release Layer. In *Laser Printing of Functional Materials*, 2018; pp 37-61.
104. Howatt, G. N.; Breckenridge, R. G.; Brownlow, J. M., FABRICATION OF THIN CERAMIC SHEETS FOR CAPACITORS*. *Journal of the American Ceramic Society* **1947**, *30* (8), 237-242.
105. Zuckermann, R. N., Peptoid origins. *Peptide Science* **2011**, *96* (5), 545-555.
106. Rastetter, R. Laserunterstützte kombinatorische Synthese von Fluorophoren. Master Thesis, KIT, Karlsruhe, 2020.
107. Manuela, M.; Raposo, M.; Herbivo, C.; Hugues, V.; Clermont, G.; Castro, M. C. R.; Comel, A.; Blanchard-Desce, M., Synthesis, Fluorescence, and Two-Photon Absorption

- Properties of Push-Pull 5-Arylthieno[3,2-b]thiophene Derivatives. *European Journal of Organic Chemistry* **2016**, 2016 (31), 5263-5273.
108. Zhu, B. Y.; Cheng, Y.; Li, G. B.; Yang, S. Y.; Zhang, Z. R., Synthesis and evaluation of styrylpyran fluorophores for noninvasive detection of cerebral beta-amyloid deposits. *Bioorg Med Chem* **2016**, 24 (4), 827-34.
109. Vaxelaire, C.; Winter, P.; Christmann, M., One-Pot Reactions Accelerate the Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50 (16), 3605-3607.
110. Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W., Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem Soc Rev* **2012**, 41 (3), 1130-72.
111. Loudet, A.; Burgess, K., BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chemical Reviews* **2007**, 107 (11), 4891-4932.
112. Boyer, J. H.; Haag, A. M.; Sathyamoorthi, G.; Soong, M.-L.; Thangaraj, K.; Pavlopoulos, T. G., Pyrromethene-BF₂ complexes as laser dyes: 2. *Heteroatom Chemistry* **1993**, 4 (1), 39-49.
113. Ridder, B. Surface structuring in xy- and z-direction on the examples of peptide array synthesis and molecular layer deposition. Ph.D. thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2016.
114. Hariharan, P. S.; Gayathri, P.; Kundu, A.; Karthikeyan, S.; Moon, D.; Anthony, S. P., Synthesis of tunable, red fluorescent aggregation-enhanced emissive organic fluorophores: stimuli-responsive high contrast off-on fluorescence switching. *CrystEngComm* **2018**, 20 (5), 643-651.
115. Hauck, M.; Stolte, M.; Schönhaber, J.; Kuball, H.-G.; Müller, T. J. J., Synthesis, Electronic, and Electro-Optical Properties of Emissive Solvatochromic Phenothiazinyl Merocyanine Dyes. *Chemistry – A European Journal* **2011**, 17 (36), 9984-9998.
116. Li, X.; Kim, S.-H.; Son, Y.-A., Optical properties of donor- π -(acceptor)_n merocyanine dyes with dicyanovinylindane as acceptor group and triphenylamine as donor unit. *Dyes and Pigments* **2009**, 82 (3), 293-298.
117. Alder, R. W.; Bowman, P. S.; Steele, W. R. S.; Winterman, D. R., The remarkable basicity of 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene. *Chemical Communications (London)* **1968**, (13), 723-724.
118. Bernasconi, C. F.; Pérez-Lorenzo, M.; Brown, S. D., Kinetics of the Deprotonation of Methylnitroacetate by Amines: Unusually High Intrinsic Rate Constants for a Nitroalkane. *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72 (12), 4416-4423.
119. Eickelmann, S.; Ronneberger, S.; Zhang, J.; Paris, G.; Loeffler, F. F., Alkanes as Intelligent Surface Thermometers: A Facile Approach to Characterize Short-Lived Temperature Gradients on the Micrometer Scale. *Advanced Materials Interfaces* **2021**, 8 (3), 2001626.
120. Adès, D.; Boucard, V.; Cloutet, E.; Siove, A.; Olivero, C.; Castex, M. C.; Pichler, G., Photoluminescence of donor-acceptor carbazole-based molecules in amorphous and powder forms. *Journal of Applied Physics* **2000**, 87 (10), 7290-7293.
121. Frank, S. A., Immunology and Evolution of Infectious Disease. In *4. Specificity and Cross-Reactivity*; Princeton University Press: 2020; pp 33-56.
122. Mixer, P. F., Fundamental Immunology (4th edn) edited by W.E. Paul. *Immunology Today* **1999**, 20 (12), 589.
123. Greifenstein, J. "All-Chemie" im Arrayformat. Zulassungsarbeit, KIT, Karlsruhe, 2016.
124. McCombie, G.; Knochenmuss, R., Enhanced MALDI Ionization Efficiency at the Metal-Matrix Interface: Practical and Mechanistic Consequences of Sample Thickness and Preparation Method. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, 17 (5), 737-745.
125. Goodwin, R. J. A.; Nilsson, A.; Borg, D.; Langridge-Smith, P. R. R.; Harrison, D. J.; Mackay, C. L.; Iverson, S. L.; Andrén, P. E., Conductive carbon tape used for support and mounting of both whole animal and fragile heat-treated tissue sections for MALDI MS imaging and quantitation. *Journal of proteomics* **2012**, 75 (16), 4912-4920.
126. Nakashima, Y.; Eto, F.; Ishihara, K.; Yamazaki, F.; Sato, S.; Sakurai, T.; Kahyo, T.; Setou, M., Development of sheet-enhanced technique (Set) method for matrix-assisted laser

- desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2020**, *34* (8), e8703.
127. Nakabayashi, R.; Hashimoto, K.; Toyooka, K.; Saito, K., Keeping the shape of plant tissue for visualizing metabolite features in segmentation and correlation analysis of imaging mass spectrometry in *Asparagus officinalis*. *Metabolomics* **2019**, *15*.
128. Niessen, W. M. A.; Manini, P.; Andreoli, R., Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **2006**, *25* (6), 881-899.
129. Chan, T.-W. D.; Colburn, A. W.; Derrick, P. J.; Gardiner, D. J.; Bowden, M., Suppression of matrix ions in ultraviolet laser desorption: Scanning electron microscopy and raman spectroscopy of the solid samples. *Organic Mass Spectrometry* **1992**, *27* (3), 188-194.
130. Knochenmuss, R.; Dubois, F.; Dale, M. J.; Zenobi, R., The Matrix Suppression Effect and Ionization Mechanisms in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10* (8), 871-877.
131. Wichmann, J. In *Matrix-gestützte Laser-Desorption und Ionisation (MALDI) mit ultrakurzen Laserpulsen*, 2011.
132. Fuchs, B.; Süß, R.; Schiller, J., An update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Progress in lipid research* **2010**, *49* (4), 450-75.
133. Yalcin, E. B.; de la Monte, S. M., Review of matrix-assisted laser desorption ionization-imaging mass spectrometry for lipid biochemical histopathology. *J Histochem Cytochem* **2015**, *63* (10), 762-771.
134. Gemperline, E.; Rawson, S.; Li, L., Optimization and Comparison of Multiple MALDI Matrix Application Methods for Small Molecule Mass Spectrometric Imaging. *Analytical Chemistry* **2014**, *86* (20), 10030-10035.
135. Singh, A.; Lim, C.-K.; Lee, Y.-D.; Maeng, J.-h.; Lee, S.; Koh, J.; Kim, S., Tuning Solid-State Fluorescence to the Near-Infrared: A Combinatorial Approach to Discovering Molecular Nanoprobes for Biomedical Imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5* (18), 8881-8888.
136. Lozano-Hernández, L.-A.; Maldonado, J.-L.; Garcias-Morales, C.; Espinosa Roa, A.; Barbosa-García, O.; Rodríguez, M.; Pérez-Gutiérrez, E., Efficient OLEDs Fabricated by Solution Process Based on Carbazole and Thienopyrrolediones Derivatives. *Molecules* **2018**, *23* (2), 280.
137. Kim, B.-S.; Yu, H.; Son, Y.-A., Synthesis and Solvatochromism Behaviors on Intramolecular Charge Transfer System of Novel D- π -A Dyes. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **2012**, *563* (1), 257-271.
138. Tao, F.; Zhang, H.; Ren, J.; Liu, X.; Cui, Y. Preparation method of 9-alkyl substituted carbazole compounds having aggregation-induced emission effect for detecting TNT. CN110746404, 2020.
139. Redon, S.; Eucat, G.; Ipuy, M.; Jeanneau, E.; Gautier-Luneau, I.; Ibanez, A.; Andraud, C.; Bretonniere, Y., Tuning the solid-state emission of small push-pull dipolar dyes to the far-red through variation of the electron-acceptor group. *Dyes Pigm.* **2018**, *156*, 116-132.
140. Cravino, A.; Roquet, S.; Leriche, P.; Alévêque, O.; Frère, P.; Roncali, J., A star-shaped triphenylamine π -conjugated system with internal charge-transfer as donor material for hetero-junction solar cells. *Chemical Communications* **2006**, (13), 1416-1418.
141. Lartia, R.; Allain, C.; Bordeau, G.; Schmidt, F.; Fiorini-Debuisschert, C.; Charra, F.; Teulade-Fichou, M.-P., Synthetic Strategies to Derivatizable Triphenylamines Displaying High Two-Photon Absorption. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, *73* (5), 1732-1744.
142. Pan, Q.; Fang, C.; Zhang, Z.; Qin, Z.; Li, F.; Gu, Q.; Wu, X.; Yu, J., Synthesis and characterization of nonlinear optical chromophores containing α -cyan with thermal stability. *Optical Materials* **2003**, *22* (1), 45-49.
143. Jamsheena, V.; Mishra, R. K.; Veena, K. S.; Sini, S.; Jayamurthy, P.; Lankalapalli, R. S., New 1,2-Dihydropyridine-Based Fluorophores and Their Applications as Fluorescent Probes. *ACS Omega* **2018**, *3* (1), 856-862.

Anhang

11. Anhang

Tabelle 15: Spothöhen (in nm) beim Übertrag von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine 10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche (Dicke Donorbeschichtung: 1,50 µm).

		Laserzeit [ms]												
		10.00	9.50	9.00	8.50	8.00	7.50	7.00	6.50	6.00	5.50	5.00	4.50	4.00
Laserleistung [mW]	120	24.36	21.02	17.38	14.77	12.29	9.85	7.76	7.35	5.25	2.47	1.73	0.00	0.00
	125	26.23	22.02	20.26	16.92	13.97	11.80	9.18	7.09	6.29	3.78	1.89	0.00	0.00
	130	30.90	26.77	23.89	20.21	17.31	15.02	11.89	9.04	7.73	5.45	3.18	0.00	0.00
	135	34.13	31.01	26.38	23.84	20.85	17.32	14.62	10.76	8.70	6.14	4.20	3.19	0.00
	140	41.06	36.56	32.47	30.50	26.81	27.57	19.81	15.11	12.47	8.44	6.39	4.57	2.19
	145	42.72	38.86	36.46	35.04	30.50	27.51	24.81	20.48	16.05	12.33	8.06	6.03	3.00
	150	47.90	44.00	40.64	41.54	35.04	32.40	29.52	24.85	19.39	14.73	10.58	8.03	4.32
	155	50.41	48.90	46.02	44.16	44.93	39.65	36.05	30.70	24.43	21.07	13.72	8.73	6.71
	160	49.62	49.43	46.09	46.41	46.07	44.10	37.61	34.15	29.77	23.74	17.20	10.71	7.38
	165	54.02	54.36	53.36	51.09	50.45	46.40	42.90	40.39	33.59	27.62	20.99	12.56	8.77
	170	56.77	55.72	55.31	53.27	51.24	48.49	45.57	50.20	36.24	28.87	22.05	16.48	9.29
	175	58.22	60.97	61.14	57.07	54.65	54.61	51.16	46.31	41.39	34.58	28.39	18.80	10.97
	180	60.35	60.37	61.20	60.83	57.37	58.83	55.58	50.49	48.17	39.43	31.14	26.21	16.62
	185	61.83	61.36	60.53	64.93	62.17	60.71	59.02	53.76	51.05	45.81	34.57	28.16	18.47
	190	63.19	62.61	62.93	64.77	63.30	60.17	62.65	58.99	52.88	48.75	40.00	29.63	20.91
	195	64.95	65.29	66.16	67.35	65.59	63.64	64.11	60.23	55.30	50.99	41.16	33.03	26.35
	200	66.86	66.83	66.67	63.60	66.24	64.61	63.38	60.55	50.89	47.89	38.38	27.86	20.90

Tabelle 16: Spothöhen (in nm) beim laserinduzierten Übertrag von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine Glasoberfläche (Dicke Donorbeschichtung: 1,50 µm).

		Laserzeit [ms]												
		10.00	9.50	9.00	8.50	8.00	7.50	7.00	6.50	6.00	5.50	5.00	4.50	4.00
Laserleistung [mW]	120	21.09	16.88	13.17	12.38	9.17	8.04	6.48	7.11	6.27	6.43	0.00	0.00	0.00
	125	23.64	18.56	15.56	13.60	10.73	8.66	6.60	5.85	5.80	5.39	0.00	0.00	0.00
	130	27.76	23.14	19.18	15.78	13.30	10.83	8.73	7.03	6.66	6.38	3.69	0.00	0.00
	135	30.42	26.21	22.94	20.16	16.93	14.66	11.73	9.68	7.70	6.87	4.60	3.57	0.00
	140	34.18	32.54	28.77	25.08	21.86	19.06	16.02	13.10	9.60	7.20	6.84	4.31	0.00
	145	37.43	33.73	30.94	26.57	24.06	20.75	17.69	14.07	10.42	7.49	5.70	5.06	0.00
	150	39.41	35.41	33.57	28.45	26.10	23.15	20.61	16.54	13.14	9.56	6.16	4.61	3.14
	155	44.05	40.33	35.89	32.32	31.47	27.50	24.08	21.11	17.58	13.50	9.98	7.31	5.23
	160	44.37	41.53	39.97	36.99	35.93	32.80	29.26	25.66	21.29	16.67	13.32	8.67	5.39
	165	48.18	43.30	42.03	40.04	38.69	35.33	32.57	28.91	25.11	19.74	15.29	10.04	6.44
	170	50.22	43.89	47.83	47.45	41.93	39.26	36.58	33.38	30.10	23.67	18.21	12.74	7.77
	175	51.67	49.14	49.01	48.20	47.53	43.72	41.15	39.44	34.42	27.51	22.77	15.95	10.06
	180	53.52	52.99	50.69	51.16	51.59	48.14	45.00	43.38	37.21	32.62	25.43	20.02	12.57
	185	54.39	54.24	53.12	51.58	54.24	51.25	51.61	46.80	41.29	35.72	28.87	22.08	14.26
	190	60.94	54.97	56.51	57.29	57.33	56.98	54.93	50.32	45.56	41.26	28.87	26.65	16.97
	195	59.05	56.78	56.57	57.71	56.76	56.81	52.44	47.84	46.37	44.85	35.93	28.60	18.14
	200	60.45	59.81	56.80	57.48	58.43	53.72	53.30	47.38	46.57	41.64	35.54	25.72	19.01

Tabelle 17: Spotvolumen (in μm^3) beim Übertrag von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine 10:90-PEGMA-co-MMA-Oberfläche (Dicke Donorbeschichtung: 1,50 μm).

		Laserzeit [ms]												
		10.0	9.5	9.0	8.5	8.0	7.5	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0	4.5	4.0
Laserleistung [mW]	120	136.27	114.20	90.29	71.20	54.59	38.08	25.16	18.67	5.99	2.45	0.91	0.00	0.00
	125	145.12	118.85	107.06	83.35	65.10	50.69	34.45	19.91	12.98	3.75	1.47	0.00	0.00
	130	178.08	150.34	131.21	101.27	83.24	68.93	45.31	28.55	18.58	7.74	2.82	0.00	0.00
	135	190.20	168.88	139.26	119.82	93.66	76.47	55.89	36.29	22.81	11.02	4.64	1.93	0.00
	140	222.29	194.09	162.94	146.70	116.50	117.78	75.68	52.88	34.60	20.60	10.99	4.69	1.41
	145	240.06	209.96	186.96	176.63	141.63	118.17	96.71	73.80	50.84	33.28	16.96	7.75	2.21
	150	287.84	247.48	222.83	207.79	168.25	144.13	116.67	88.12	61.54	40.20	22.84	12.04	3.30
	155	306.71	276.13	241.87	221.81	212.04	166.03	133.85	102.21	73.05	52.23	30.29	15.89	6.91
	160	305.69	288.64	258.84	232.22	216.13	186.66	144.28	120.90	90.39	65.11	37.88	20.93	8.24
	165	342.25	319.02	288.17	266.46	238.81	204.59	166.51	136.65	102.79	69.57	43.26	22.02	9.56
	170	355.30	330.12	302.72	276.32	233.32	205.05	168.81	171.57	104.30	73.15	48.72	25.42	10.87
	175	374.64	344.90	332.73	282.19	250.40	226.63	184.97	151.58	119.03	87.10	57.77	31.37	16.01
	180	384.59	368.42	339.48	316.10	273.88	247.29	206.35	172.21	143.70	101.47	71.29	42.92	21.65
	185	419.87	377.66	341.67	338.52	296.14	262.70	229.78	182.87	153.43	116.83	74.82	48.15	23.10
	190	433.96	390.84	357.02	331.36	296.28	263.93	239.17	198.32	150.65	119.82	81.72	50.84	26.61
	195	436.13	412.49	375.70	337.60	309.07	265.84	235.36	200.72	162.59	123.01	91.22	53.71	33.66
200	417.18	391.16	356.54	315.09	303.44	255.73	224.45	178.50	131.76	113.59	77.19	47.22	28.04	

Tabelle 18: Spotvolumen (in μm^3) beim Übertrag von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine Glasoberfläche (Dicke Donorbeschichtung: 1,50 μm).

		Laserzeit [ms]												
		10.00	9.50	9.00	8.50	8.00	7.50	7.00	6.50	6.00	5.50	5.00	4.50	4.00
Laserleistung [mW]	120	111.97	89.43	67.32	57.10	41.00	29.55	21.01	5.88	3.68	2.63	0.00	0.00	0.00
	125	123.86	95.71	77.94	67.29	47.42	35.70	23.22	13.94	6.12	1.71	0.00	0.00	0.00
	130	139.18	115.27	93.88	79.38	62.15	48.43	34.89	23.88	13.31	4.38	1.48	0.00	0.00
	135	154.91	133.28	117.03	99.34	80.84	66.78	52.02	38.07	24.86	10.74	3.98	1.70	0.00
	140	195.98	175.59	150.07	126.78	108.05	87.79	71.62	49.55	31.60	18.07	8.03	1.86	0.00
	145	211.27	187.35	160.69	137.28	116.09	92.46	73.33	50.94	30.87	14.65	8.10	2.67	0.00
	150	227.55	192.43	167.43	147.07	126.07	102.37	84.90	63.33	42.49	25.69	11.71	6.31	1.62
	155	250.15	226.39	191.88	158.87	146.21	124.85	100.68	77.89	58.04	38.50	22.70	9.69	3.30
	160	271.48	245.44	207.03	185.03	165.99	153.59	127.28	100.70	74.34	50.32	30.34	13.60	4.39
	165	308.86	263.68	236.22	201.19	185.70	165.91	141.53	111.85	88.70	62.80	39.97	20.03	7.77
	170	315.73	258.34	272.63	230.08	214.96	182.53	155.55	133.48	105.25	72.38	50.32	29.61	12.88
	175	0.00	0.00	0.00	252.33	237.80	207.36	177.14	154.65	123.01	88.97	62.61	36.73	18.37
	180	358.11	326.99	312.62	284.88	274.28	227.42	204.67	179.81	135.83	106.93	73.46	46.78	23.19
	185	383.76	358.93	339.87	307.12	283.79	258.00	232.24	186.95	153.94	116.89	83.50	54.14	27.28
	190	381.74	362.70	369.00	309.11	292.95	266.82	236.78	201.94	165.09	130.12	83.50	60.81	30.77
	195	387.91	366.07	343.20	325.64	288.33	276.06	233.46	191.82	173.75	137.94	97.63	66.29	34.04
200	347.07	327.02	320.72	303.84	267.80	249.89	217.10	184.17	165.36	120.66	93.99	56.83	33.44	

Tabelle 19: Spothöhe (in nm) beim einfachen Transfer von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine Glasoberfläche (Dicke Donorbeschichtung: 1,50 μm).

		Laserzeit [ms]						
		10.00	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00
Laserleistung [mW]	200	41.55	41.95	40.56	34.65	34.43	25.78	14.98
	190	39.71	39.69	36.85	30.97	30.91	23.05	11.61
	180	37.86	39.69	35.74	31.12	28.18	20.39	10.52
	170	36.61	35.97	33.82	27.97	23.47	16.50	8.20
	160	35.19	34.51	31.14	27.73	19.91	12.26	4.93
	150	34.58	31.84	28.86	23.30	17.39	10.25	4.03
	140	32.55	28.70	26.10	20.35	14.42	8.23	0.00
	130	27.23	24.19	20.30	15.82	10.46	4.38	0.00
	120	23.89	21.03	15.63	11.37	7.24	2.90	0.00

Tabelle 20: Spotvolumen (in μm^3) beim einfachen Transfer von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine Glasoberfläche (Dicke Donorbeschichtung: 1,50 μm).

		Laserzeit [ms]						
		10.00	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00
Laserleistung [mW]	200	355.51	321.89	278.91	202.93	152.46	97.78	40.12
	190	327.69	285.94	237.34	171.60	132.71	78.29	25.47
	180	259.85	325.92	213.56	171.42	121.95	66.08	22.43
	170	275.02	247.22	198.75	134.64	93.65	48.47	13.14
	160	241.14	218.74	170.66	130.43	75.34	32.94	6.29
	150	223.95	182.60	142.35	98.44	60.67	23.41	4.56
	140	194.79	151.76	120.36	79.03	44.18	15.34	0.00
	130	150.52	120.55	86.94	57.29	27.68	5.56	0.00
	120	122.04	93.32	61.50	41.10	14.77	5.05	0.00

Tabelle 21: Spothöhe (in nm) beim doppelten Transfer ohne Donorwechsel von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine Glasoberfläche (Dicke Donorbeschichtung: 1,50 μm).

		Laserzeit [ms]						
		10.00	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00
Laserleistung [mW]	200	41.36	37.55	38.04	34.21	30.23	23.32	14.23
	190	39.98	38.17	30.79	29.44	24.86	16.85	10.80
	180	37.05	36.45	32.77	25.86	21.82	16.16	10.58
	170	36.76	34.89	32.35	27.59	21.12	16.51	11.79
	160	31.96	30.84	28.74	23.63	18.45	11.14	0.00
	150	32.02	28.84	26.05	21.39	14.83	11.45	0.00
	140	30.47	26.86	25.02	20.79	13.21	10.94	0.00
	130	26.51	23.32	20.49	16.70	12.34	9.19	0.00
	120	23.27	21.06	16.44	12.89	14.45	0.00	0.00

Tabelle 22: Spotvolumen (in μm^3) beim doppelten Transfer ohne Donorwechsel von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine Glasoberfläche (Dicke Donorbeschichtung: 1,50 μm).

		Laserzeit [ms]						
		10.00	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00
Laserleistung [mW]	200	387.38	322.47	287.26	226.76	163.66	95.45	41.04
	190	339.01	298.59	199.69	170.68	112.81	59.45	12.89
	180	309.02	285.10	226.67	144.97	99.63	50.02	10.59
	170	299.04	254.00	218.78	153.28	94.74	55.63	10.62
	160	257.71	218.74	174.98	119.84	75.15	25.27	0.00
	150	214.87	176.79	146.66	103.71	48.97	15.78	0.00
	140	178.73	134.58	121.71	75.83	38.77	10.27	0.00
	130	164.36	130.58	94.97	52.47	27.22	4.83	0.00
	120	122.60	100.44	61.58	37.32	13.31	0.00	0.00

Tabelle 23: Spothöhe (in nm) beim doppelten Transfer mit Donorwechsel von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine Glasoberfläche (Dicke Donorbeschichtung: 1,50 μm).

		Laserzeit [ms]						
		10.00	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00
Laserleistung [mW]	200	79.34	70.38	70.68	67.94	53.93	39.99	18.72
	190	75.47	70.67	68.41	59.51	48.68	30.64	15.81
	180	71.58	68.33	62.47	55.45	45.77	28.93	12.34
	170	69.69	67.11	63.32	56.67	43.41	25.56	11.52
	160	68.42	66.32	64.09	51.77	39.51	24.33	9.76
	150	63.00	62.10	55.20	44.67	32.50	18.32	8.93
	140	63.90	59.55	48.25	38.39	25.85	13.18	0.00
	130	64.53	54.57	46.01	35.69	24.10	10.93	0.00
	120	59.73	51.49	39.89	28.59	18.74	8.91	0.00

Tabelle 24: Spotvolumen (in μm^3) beim doppelten Transfer mit Donorwechsel von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine Glasoberfläche (Dicke Donorbeschichtung: 1,50 μm).

		Laserzeit [ms]						
		10.00	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00
Laserleistung [mW]	200	673.15	566.16	506.09	407.06	261.29	163.26	52.97
	190	625.90	513.26	457.32	339.38	234.10	112.76	39.47
	180	562.39	470.44	407.31	295.52	220.91	102.57	29.54
	170	526.58	463.38	377.19	295.01	190.97	89.78	23.44
	160	485.73	421.28	361.14	252.33	162.50	76.03	13.56
	150	404.62	359.79	280.50	200.48	124.11	53.25	6.86
	140	371.48	299.44	227.10	157.42	87.46	28.12	0.00
	130	349.30	269.78	203.48	130.87	71.59	19.97	0.00
	120	279.71	223.32	158.03	92.76	47.38	10.65	0.00

Tabelle 25: Spothöhe (in nm) beim Transfer von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine Glasoberfläche unter Verwendung eines per Rakeltechnik beschichteten Donors (Dicke Donorbeschichtung: 1,00 μm).

		Laserzeit [ms]						
		10.00	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00
Laserleistung [mW]	200	44.80	40.38	39.14	33.97	23.53	12.67	0.00
	190	40.01	36.02	35.42	27.04	18.28	9.62	0.00
	180	34.58	32.75	28.66	21.94	15.35	8.87	0.00
	170	29.93	29.55	23.16	17.77	10.85	4.79	0.00
	160	25.50	22.31	19.25	13.89	10.17	2.96	0.00
	150	20.44	16.69	14.83	10.98	7.80	0.00	0.00
	140	15.38	13.14	12.22	10.33	3.96	0.00	0.00
	130	12.54	10.99	11.96	7.07	0.00	0.00	0.00
	120	11.72	9.19	6.79	3.32	0.00	0.00	0.00

Tabelle 26: Spotvolumen (in μm^3) beim Transfer von Fmoc-Gly-OPfp **27** auf eine Glasoberfläche unter Verwendung eines per Rakeltechnik beschichteten Donors (Dicke Donorbeschichtung: 1,00 μm).

		Laserzeit [ms]						
		10.00	9.00	8.00	7.00	6.00	5.00	4.00
Laserleistung [mW]	200	353.02	281.98	223.56	156.61	86.67	30.48	0.00
	190	310.65	228.66	199.01	122.35	65.18	19.91	0.00
	180	242.07	199.39	155.25	94.70	50.87	13.97	0.00
	170	209.34	174.32	115.98	71.48	33.21	8.86	0.00
	160	171.26	119.87	92.71	54.13	22.09	3.20	0.00
	150	127.40	86.19	66.01	31.52	9.11	0.00	0.00
	140	97.83	65.41	39.40	17.01	3.25	0.00	0.00
	130	64.92	39.66	20.06	6.50	0.00	0.00	0.00
	120	36.75	18.17	8.98	1.83	0.00	0.00	0.00

Tabelle 27: Laserleistungen und –schwankungen des verwendeten 405 nm OLED-Lasers.

Eingestellte Laserleistung [mW]	Tatsächliche Laserleistung [mW]	Laserleistung im Fokus [mW]	Schwankung [mW]
10	15.39	10.13	0.07
20	25.5	16.86	0.03
30	35.67	23.57	0.02
40	45.77	30.35	0.01
50	55.02	36.95	0.01
60	66.18	43.64	0.01
70	76.33	50.38	0.01
80	86.57	57.2	0.02
90	96.98	64.06	0.02
100	107.09	70.77	0.02
110	117.24	77.5	0.02
120	127.47	84.26	0.02
130	137.73	91.13	0.02
140	147.86	97.86	0.02
150	158.05	103.9	0.01
160	168.05	111.23	0.01
170	178.19	117.93	0.01
180	188.03	124.65	0.01
190	198.24	131.28	0.01
200	208.13	137.64	0.01
210	217.96	144.22	0.01
220	227.89	150.85	0.01
230	236.84	157.36	0.01
240	246.74	163.86	0.01
250	256.59	170.33	0.01
260	266.33	176.83	0.01
270	276.01	183.26	0.01
280	285.7	189.74	0.02
290	294.24	196.15	0.02
300	304.79	202.52	0.02

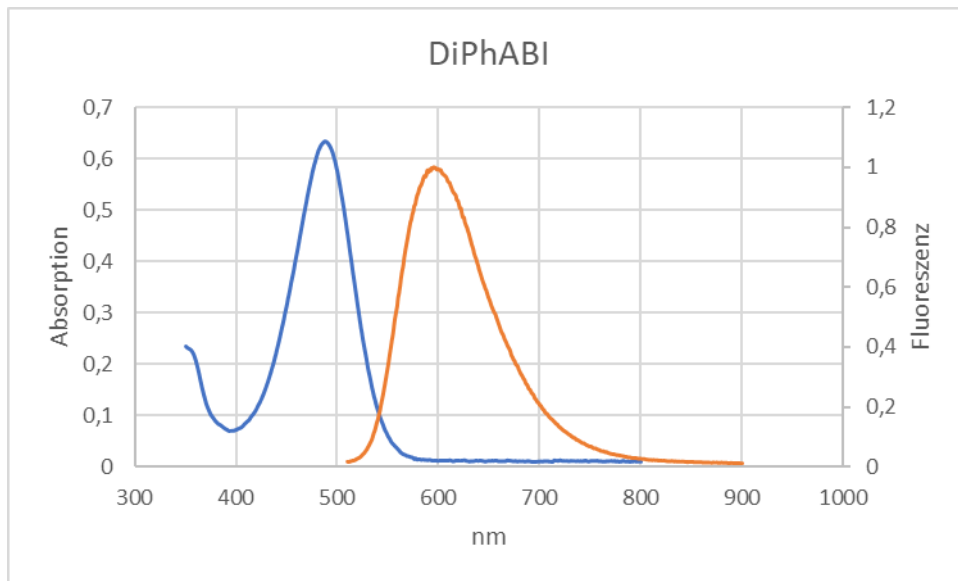


Abbildung 88: Absorptions- und Emissionsspektrum von DiPhABI

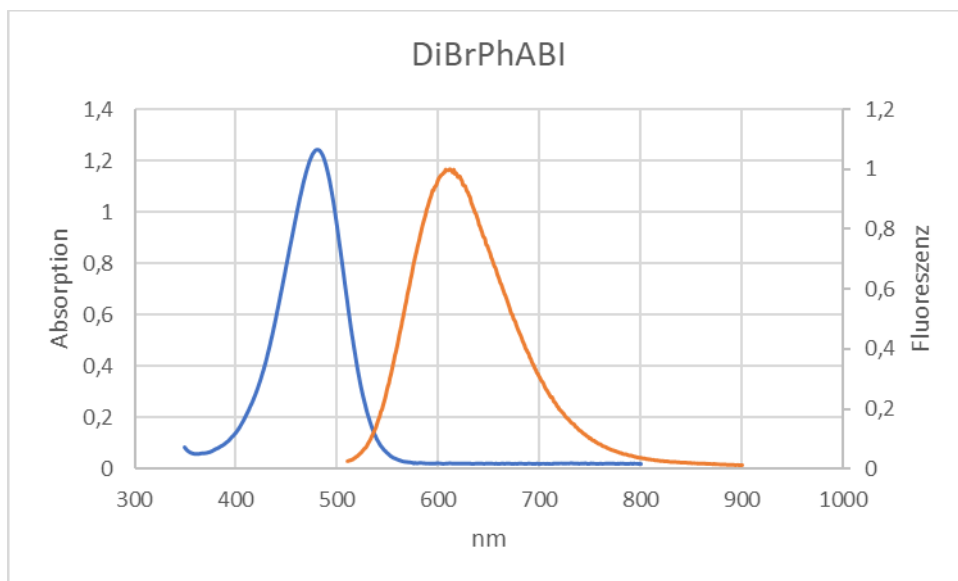


Abbildung 89: Absorptions- und Emissionsspektrum von DiBrPhABI

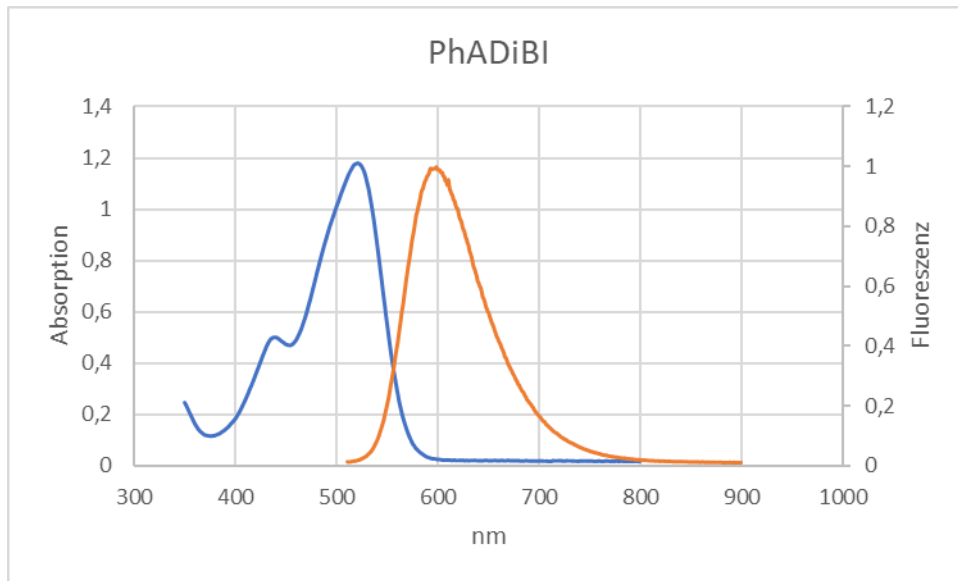


Abbildung 90: Absorptions- und Emissionsspektrum von PhADiBI

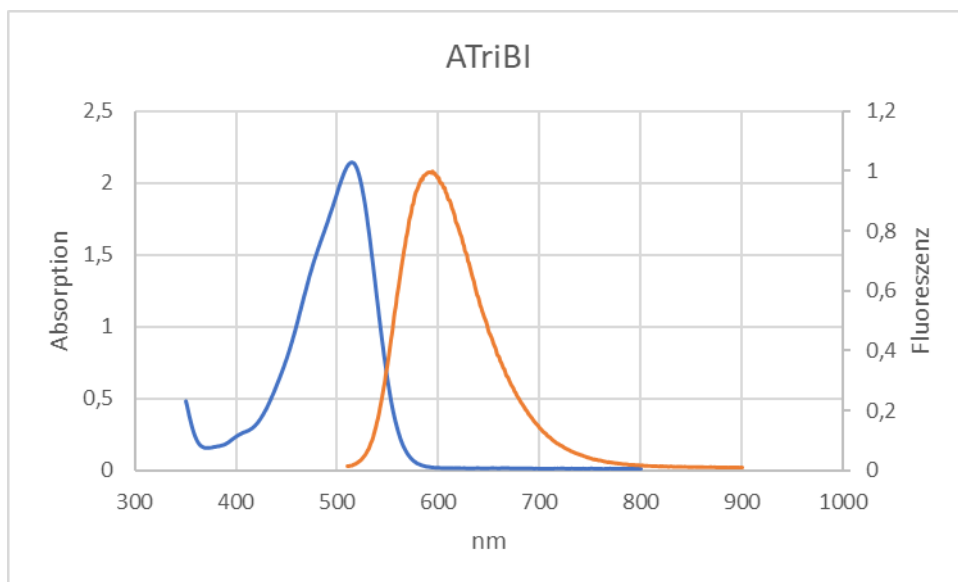


Abbildung 91: Absorptions- und Emissionsspektrum von PhADiBI

Tabelle 28: Absorptions- und Emissionswellenlängen der jeweiligen Reaktionsansätze des kombinatorischen Arrays. Absorptionswerte sind i.d.R. erst ab einem Absorptionsmaximum > 400 nm angegeben

Ansatz	λ_{\max} Absorption [nm]	λ_{\max} Emission [nm]	Detektierte Fluoreszenz	Nachgewiesenes Reaktionsprodukt
A1C1	-	-	520±2,5	X
A1C2	-	-	520±2,5	X
A1C3	-	-	520±2,5	X
A1C4	-	-	520±2,5	X
A1C5	457 ¹⁰⁷	532 ¹⁰⁷	520±2,5 / 587±37,5	✓
A1C6	514 ¹⁰⁷	579 ¹⁰⁷	520±2,5 / 587±37,5 / 677±22,5	✓
A1C7	-	-	520±2,5 / 587±37,5	✓
A1C8	-	-	520±2,5 / 587±37,5 / 677±22,5	✓
A1C9	-	-	520±2,5 / 587±37,5	✓
A2C1	370 ¹³⁵	447/548 ¹³⁵	-	X
A2C2	394 ¹³⁵	460 ¹³⁵	-	X
A2C3	-	-	-	X
A2C4	-	-	-	X
A2C5	416 ¹³⁵	490 ¹³⁵	-	X
A2C6	-	-	587±37,5	X
A2C7	448 ¹³⁵	510 ¹³⁵	587±37,5	X
A2C8	426 ¹²⁰	490 ¹²⁰	587±37,5	X
A2C9	-	-	-	X
A3C1	391 ¹³⁶	498 ¹³⁶	520±2,5	X
A3C2	-	-	520±2,5	X
A3C3	-	-	520±2,5	X
A3C4	-	-	520±2,5	X
A3C5	419 ¹³⁷	564 ¹³⁷	520±2,5	X
A3C6	426 ¹³⁸	569 ¹³⁸	520±2,5	X
A3C7	440 ¹³⁷	570 ¹³⁷	520±2,5	X
A3C8	404 ¹³⁹	654 ¹³⁹	520±2,5	X
A3C9	443	565	520±2,5	X
A4C1	-	-	-	X
A4C2	-	-	-	X
A4C3	-	-	-	X
A4C4	-	-	-	X
A4C5	-	-	-	X
A4C6	-	-	587±37,5 / 677±22,5	X

Ansatz	λ_{\max} Absorption [nm]	λ_{\max} Emission [nm]	Detektierte Fluoreszenz	Nachgewiesenes Reaktionsprodukt
A4C7	-	-	-	X
A4C8	-	-	-	X
A4C9	-	-	-	X
A5C1	510 ¹⁴⁰	-	520±2,5	X
A5C2	441	-	520±2,5	X
A5C3	519	-	520±2,5	X
A5C4	-	-	520±2,5 / 587±37,	X
A5C5	446 ¹⁴¹	609 ¹⁴¹	520±2,5 / 587±37,5	✓
A5C6	471	579	520±2,5 / 587±37,5	✓
A5C7	477	602	520±2,5 / 587±37,5 / 677±22,5	✓
A5C8	546 ¹³⁹	717 ¹³⁹	520±2,5 / 587±37,5 / 677±22,5	✓
A5C9	487	620	520±2,5 / 587±37,5	✓
A6C1	427	526	520±2,5	X
A6C2	449	536	520±2,5	X
A6C3	372	489	520±2,5	X
A6C4	-	-	520±2,5	X
A6C5	476 ¹⁴¹	535 ¹⁴¹	520±2,5 / 587±37,5	✓
A6C6	451	585	520±2,5 / 587±37,5 / 677±22,5	✓
A6C7	514	594	520±2,5 / 587±37,5 / 677±22,5	✓
A6C8	434	516	520±2,5 / 587±37,5	✓
A6C9	510	632	520±2,5 / 587±37,5	✓
A7C1	-	-	587±37,5	X
A7C2	-	-	587±37,5	X
A7C3	-	-	587±37,5	X
A7C4	-	-	587±37,5	X
A7C5	-	-	587±37,5	X
A7C6	-	-	587±37,5	X
A7C7	-	-	587±37,5	X
A7C8	460 ¹⁴²	(c) ¹⁴²	587±37,5	X
A7C9	477 ¹⁴³	636 / 661 ¹⁴³	587±37,5 / 677±22,5	✓
A8C1	-	-	520±2,5	X
A8C2	-	-	520±2,5	X
A8C3	-	-	520±2,5	X
A8C4	-	-	520±2,5	X

Anhang

Ansatz	λ_{\max} Absorption [nm]	λ_{\max} Emission [nm]	Detektierte Fluoreszenz	Nachgewiesenes Reaktionsprodukt
A8C5	-	-	520±2,5 / 587±37,5 / 677±22,5	X
A8C6	-	-	520±2,5 / 587±37,5 / 677±22,5	X
A8C7	-	-	520±2,5 / 587±37,5 / 677±22,5	X
A8C8	-	-	520±2,5 / 587±37,5 / 677±22,5	X
A8C9	425	600	520±2,5	X
A9C1	505	-	-	X
A9C2	440	-	-	X
A9C3	529	-	-	X
A9C4	-	-	-	X
A9C5	420	609	520±2,5	✓
A9C6	471	580	587±37,5 / 677±22,5	✓
A9C7	481	609	587±37,5 / 677±22,5	✓
A9C8	551	705	587±37,5 / 677±22,5	✓
A9C9	477	625	587±37,5	✓
A10C1	435	524	520±2,5	X
A10C2	460	530	520±2,5	X
A10C3	385	482	520±2,5	X
A10C4	-	-	520±2,5	X
A10C5	461 ¹⁴¹	550 ¹⁴¹	520±2,5 / 587±37,5	✓
A10C6	464	583	520±2,5 / 587±37,5	✓
A10C7	521	594	520±2,5 / 587±37,5	✓
A10C8	470	654	520±2,5 / 587±37,5	✓
A10C9	525	624	520±2,5 / 587±37,5	✓