

Charakterisierung von Microarrays durch Anwendung physikalischer Methoden der chemischen Oberflächenanalytik

Paul M. Dietrich und Wolfgang E. S. Unger

AG Schicht- und Oberflächenanalytik, BAM Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung, Berlin

Charakterisierung von Microarrays

Microarrays haben in den letzten Jahren einen enormen wissenschaftlichen Fortschritt ermöglicht, zum Beispiel in der Genomforschung, der klinischen Diagnostik und der Pharmakologie.¹ Daher zählen sie mit zu den am schnellsten wachsenden Bereichen der biomedizinischen Forschung.^{2, 3} Für zukünftige Anwendungen in der Diagnostik muss diese Technologieplattform jedoch ein hohes Maß an Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit aufweisen, um die geforderten Standards erfüllen zu können, die für eine klinische Zulassung notwendig sind.

Trotz der vielen Bemühungen, die Qualität und Leistung von Microarrays zu verbessern, ist eine ausführliche chemische Charakterisierung der modifizierten Trägermaterialien, die den Ausgangspunkt eines jeden Microarrays bilden, bislang nur sehr selten in Betracht gezogen worden. Jedoch ist die Kontrolle bestimmter Parameter, wie Art, Dichte und Verteilung der jeweiligen Funktionalgruppen bzw. Sondenmoleküle an der Oberfläche der Microarrays von grundlegender Bedeutung für die Immobilisierung der zu untersuchenden Zielanalyten, wie zum Beispiel DNA, Proteine, Antikörper und Zucker.

Die chemische Oberflächenanalytik an Microarray-Substraten mit bildgebenden Methoden wie der Photoelektronenspektroskopie (XPS, ESCA) kann direkte Informationen zur atomaren Zusammensetzung sowie der chemischen Bindungssituation an der Oberfläche und inneren Grenzflächen liefern. Die Sekundärionen-Flugzeitmassenspektrometrie (ToF-SIMS) liefert spezifische molekulare Fragmentmuster, die analytisch mit den gleichen Zielen ausgewertet werden.

Aufgrund der komplementären Natur dieser Analysemethoden sind durch den kombinierten Einsatz von ESCA und ToF-SIMS Aussagen zur elementaren Zusammensetzung sowie zur chemischen Struktur, relativen Dichte und örtlichen Verteilung von relevanten Funktionalgruppen in den Spots oder Patches auf den Arrays möglich. Ortsaufgelöste, das heißt bildgebende Untersuchungen von Microarrays mit XPS und ToF-SIMS, erlauben grundsätzlich auch die markerfreie, chemische Einzelspotabbildung vor und nach Immobilisierungen von Analyten mit hoher Empfindlichkeit und einem oft deutlich besseren Signal-Rausch-Verhältnis als bei der Standarddetektion mit Fluoreszenzverfahren.

Methoden der chemischen Oberflächenanalytik für die Charakterisierung von Microarrays

Photoelektronenspektroskopie (ESCA, XPS)

Die Elektronenspektroskopie für die Chemische Analyse (ESCA) liefert sowohl elementspezifische als auch chemische Informationen für Oberflächen von Festkörpern weitgehend ohne Restriktionen bezüglich des zu untersuchenden Materials. Alternativ wird das Verfahren als XPS (Röntgen-Photoelektronen Spektroskopie) bezeichnet.

Für organische Materialien charakterisiert ESCA eine Oberflächenempfindlichkeit von circa 10 nm wenn die typischen Röntgenröhren mit Al oder Mg Anoden eingesetzt werden.

In der Photoelektronenspektroskopie wird die Probe im Ultrahochvakuum mit Röntgenstrahlung (monochromatisierte oder ungefilterte Aluminium bzw. Magnesium $K\alpha$ Strahlung) bestrahlt und aufgrund des photoelektrischen Effekts werden aus der Oberfläche Photoelektronen emittiert. Die kinetische Energie der gemessenen Photoelektronen ist hierbei charakteristisch für das jeweilige Element, das als Emitteratom auftritt. Die Position und Intensität der Peaks im Photoelektronenspektrum ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Elemente in der durch die Informationstiefe des Verfahrens erfassten Oberflächenschicht (mit Ausnahme von Wasserstoff). Darüber hinaus sind Aussagen zum Bindungszustand der Emitteratome möglich. Die chemische Umgebung eines Emitteratoms beeinflusst messbar die Bindungsenergie eines Photoelektrons. Dieser Einfluss wird als die chemische Verschiebung der Bindungsenergie beobachtet. Die Bestimmung der Bindungsenergie (BE) ist bei Kenntnis der Energie $h\nu$ der anregenden Röntgenstrahlung und der gemessenen kinetischen Energie der Photoelektronen entsprechend der Einsteinschen Gleichung für den Photoeffekt (Gleichung 1) möglich.

$$E_{kin} = h\nu - BE - Konst. \quad (1)$$

Quantitative Aussagen über chemische Zustände beziehungsweise Bindungsverhältnisse der Elemente in der Oberfläche der Probe sind anhand der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen möglich. In modernen Spektrometern werden die Röntgenstrahlen meist monochromatisiert. Diese monochromatische Anregung ermöglicht eine höhere Energieauflösung des Verfahrens und damit eine bessere Trennung koexistierender chemischer Spezies.

Das Verfahren Photoelektronenspektroskopie lässt sich bildgebend betreiben, wobei nicht nur Elementkontraste sondern auch durch Ausnutzung verschiedener chemischer Verschiebungen chemische Kontraste erzielt werden können. Die laterale Auflösung der letzten Generation von Laborgeräten liegt derzeit in einem Bereich von circa 10 μm .

Sekundärionen – Flugzeitmassenspektrometrie (ToF SIMS)

ToF-SIMS ist ein Akronym für das Verfahren Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS) beim Einsatz eines Flugzeitmassenspektrometers. Flugzeitmassenspektrometer zeichnen sich durch hohe Transmission und Empfindlichkeit aus. Mit ihren verschiedenen Betriebsarten – Oberflächenspektroskopie, Oberflächenabbildung, Tiefenprofilanalyse und 3D Analyse – bietet diese Analysetechnik ein außergewöhnliches Leistungsspektrum.

SIMS basiert auf dem Beschuss der zu analysierenden Oberfläche im Ultrahochvakuum mit Primärionen, die Energien von einigen keV aufweisen. Die Primärionenenergie wird dabei durch atomare Kollisionen auf den Festkörper übertragen. Eine Kollisionskaskade wird ausgelöst. Ein Teil der Energie wird dabei wieder zurück in die Oberfläche transportiert, wodurch Fragmente des Oberflächengitters, atomare Bruchstücke aber auch vollständige Moleküle aus der Oberfläche herausgelöst werden, die, wenn sie ionisiert vorliegen, durch das Massenspektrometer erfasst werden können. In den Randbereichen der Kollisionskaskade kann die auf Oberflächenmoleküle übertragene Energie so angepasst sein, dass Mol(ekül)-Peaks mit Massen bis zu 10.000 u im Sekundärionenmassenspektrum beobachtet werden können. Die Fragmentmuster, die immer im SIMS Spektrum beobachtet werden, können oft erfolgreich mit Verbindungen, die im analysierten Oberflächenbereich vorliegen, korreliert werden. Das Massenspektrum der emittierten Sekundärionen kann somit ausführliche Informationen der elementaren und molekularen Zusammensetzung der analysierten Oberfläche liefern, obwohl SIMS per se destruktiv ist. Für die chemische Analytik wird der so genannte statische SIMS Modus gewählt, bei dem Primärionenstromdichte und -dosis so eingestellt werden ($< 10^{13}$ Ionen/cm²), dass statistisch jedes einfallende Projektil eine unzerstörte Oberfläche vorfindet. Verteilungsbilder können bei Verwendung fein fokussierter Primär-Ionenquellen erstellt werden. Die erzielbare laterale Auflösung liegt deutlich im sub- μm Bereich. Das Verfahren SIMS ist oberflächenempfindlicher als ESCA, denn die detektierten Sekundärionen stammen nur aus den äußersten Monolagen.

Weitere Methoden in der Charakterisierung von Microarrays und deren Vorstufen

Die Messung der Benetzbarkeit mit Hilfe des Wasserkontaktwinkels ist eine oft benutzte Methode zur Bewertung von Objektträgern, die für den Aufbau von Microarrays eingesetzt werden. Diese Methode ist vergleichsweise einfach unter Umgebungsbedingungen durchzuführen. In der Durchführung des Verfahrens werden Wassertropfen auf der Probe abgesetzt, die dann eine Grundfläche von mindestens $\sim 500 \mu\text{m}$ Durchmesser einnehmen. Anschließend wird der Winkel zwischen der flüssigen und der festen Phase nach verschiedenen Modi bestimmt. Bedingt durch das Tropfenvolumen ist das Verfahren auf Testflächen limitiert, die deutlich größer sind als typische Einzelspots eines Microarrays.

Die chemischen Eigenschaften der Oberfläche werden oft auch mit Infrarot- und Raman-Mikrospektroskopischen Verfahren in einer orts aufgelösten Weise untersucht. AFM Analysen liefern ergänzende Informationen.

Die Palette der verfügbaren Oberflächenanalyseverfahren für Microarrays ist schematisch in Tabelle 1 zusammengefasst.

Oberflächenanalytische Verfahren					
	ESCA (XPS)	ToF-SIMS	WCA	Schwingungs- spektroskopie (IR, Raman)	AFM
Informationen	elementare und chemische Zusammensetzung	elementare und chemische Zusammensetzung	Benetzbarkeit, Oberflächenenergie	Chemische Funktionsgruppen	Youngscher Modul Härte Rauheit
Informationstiefe	10 nm	2 nm (1-3 ML)	1 nm	IR: 0.1 - 3 µm* Raman: –	1 ML
Anregung	Röntgenphotonen	Ionen	–	Photonen	–

Tabelle 1: Oberflächenanalytische Methoden für die Charakterisierung von Microarrays. **XPS** Photoelektronenspektroskopie, **ToF-SIMS** Sekundärionen-Flugzeitmassenspektrometrie, **WCA** Kontaktwinkelmessung, **IR / Raman** Infrarot- / Ramanspektroskopie, **AFM** Rasterkraftmikroskopie, ML Monolage, * z.B. mit abgeschwächter Totalreflexion (ATR-FTIR)

Anwendungen der Oberflächenanalytik in der Microarray-Technologie

In diesem Kapitel soll anhand einiger Beispiele ein Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten physikalisch-chemischer Oberflächenanalysemethoden in der Entwicklung und Optimierung von Microarray-Technologien gegeben werden. Die Palette der Anwendungen reicht hier von gespotteten DNA- und Zucker-Microarrays bis zu plasma-gedruckten Amino-Microarrays. Grundsätzliche Einsatzgebiete der Oberflächenanalytik sind die Entwicklung neuer und die Optimierung bekannter Reaktionen, die zur Ausbildung funktionaler Grenzflächen im Microarray eingesetzt werden, die Spezifizierung von Parametern und die darauf bezogene Qualitätssicherung im Herstellungsprozess von Microarrays und die Klärung von Problemen, die zu Fehlchargen führen.

Adressierbarkeit von Aminogruppen^{4,5}

Die Microarray-Technologie basiert auf der Fixierung (bio)molekularer Einheiten auf einer festen Unterlage wie Glas oder polymeren Trägern. Damit diese Anbindung möglichst stabil erfolgt, muss die Oberfläche geeignete funktionelle Gruppen tragen. Eine der am häufigsten genutzten Funktionalitäten zur Immobilisierung von Biomolekülen ist die Aminogruppe (–NH₂). Typische Protokolle zur Herstellung solch aminofunktionalisierter Substrate nutzen Aminosiloxanfilme auf Glas, selbst-assemblierte Aminothioldmonolagen (SAMs) auf Gold oder plasmachemische Modifizierungen von Polymeroberflächen.

Um verlässliche Protokolle und Resultate in Microarrayexperimenten zu generieren, ist eine quantitative Bestimmung der zur Anbindung nutzbaren Funktionalgruppen auf der Oberfläche essentiell. Die Kombination aus ESCA und einer spezifischen, chemischen Derivatisierungsreaktion ist hierfür ein häufig genutztes Verfahren. Ziel der Derivatisierung der Amine mit spezifischen Reaktionen ist die Bereitstellung eines Markers, zum Beispiel Trifluormethylgruppen, der zur Quantifizierung benutzt werden kann. In unserer Arbeitsgruppe ist hierfür ein Protokoll mit 3,5-Bis(trifluormethyl)phenylisothiocyanat (ITC) für primäre Aminogruppen entwickelt worden.⁴ Protonierungsreaktionen der freien Amine während der Derivatisierungsreaktion werden durch die Arbeit im basischen Medium (Triethylamin) unterdrückt.

Wie in Abbildung 1 gezeigt, ist eine Quantifizierung der zur Reaktion mit ITC befähigten Aminogruppen durch das hoch aufgelöste ESCA-Spektrum von Kohlenstoff möglich. Einerseits kann die Bestimmung mit Hilfe der Trifluormethylgruppe (CF₃) am ITC im C 1s ESCA Spektrum, aber auch alternativ durch die neu gebildete Thioharnstofffunktion (HN-CS-NH) im N 1s ESCA Spektrum erfolgen. Eine dritte Option ist die Bestimmung der Anzahl der derivatisierten Aminogruppen durch die Bestimmung der Fluor und Kohlenstoffoberflächenkonzentrationen, basierend auf der Messung des ESCA Übersichtsspektrums.

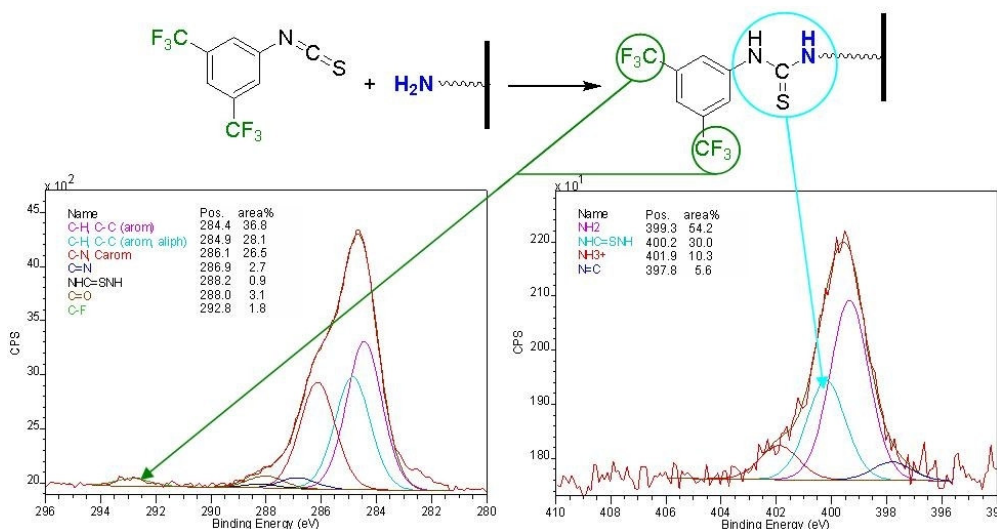


Abbildung 1: Hoch aufgelöste Kohlenstoff und Stickstoff 1s ESCA Spektren eines ITC derivatisierten Aminophenylsiloxanfilms auf oxidiertem Silizium.⁴

Beim Vergleich der unterschiedlichen Aminierungsstrategien für glas-, gold- und polymersubstratbasierte Oberflächen konnten bezüglich der Adressierbarkeit der Aminogruppen deutliche Unterschiede beobachtet werden. Während für die Aminothiolat SAMs 90% der freien Aminoheiten mit ITC reagierten, waren es im Falle der Aminosiloxanfilme nur noch 30%. Plasmabehandelte Polymersubstrate tragen mit etwa 5% eine deutlich geringere Oberflächenkonzentration von adressierbaren Aminen.

Dieses Beispiel zeigt sehr anschaulich, dass ESCA eine sehr leistungsfähige Methode zur chemischen Oberflächenanalyse, qualitativ sowie quantitativ, darstellt.

DNA Microarray^{6,7}

Die Untersuchung eines gespotteten *Escherichia coli* (*E. coli*) DNA Microarrays (Zusammenarbeit mit der *Scienion AG*) gespottet auf einem aminierten Glasträger soll die vielfältigen Möglichkeiten der hier vorgestellten Analysemethoden demonstrieren.

Die Bestimmung der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche individueller Spots ist mit abbildender hoch auflösender ESCA Analyse möglich (siehe Abbildung 2). Dafür werden die verschiedenen chemischen Verschiebungen der Bindungsenergie der Komponenten im C 1s ESCA Spektrum benutzt. Diese Komponenten repräsentieren die verschiedenen koexistierenden Kohlenstoff-Spezies und die Flächen der Komponenten-Peaks repräsentieren die entsprechenden Oberflächenkonzentrationsverhältnisse.

Bei einer Bindungsenergie von ~ 288 eV finden sich die Kohlenstoffatome die der gespotteten DNA zugeordnet werden können. Das linke Bild in Abbildung 2 verdeutlicht diesen Sachverhalt durch einen ausgeprägten Kontrast zur Umgebung. Die C 1s Komponente bei 285 eV ist dagegen nicht repräsentativ für DNA und deshalb fällt der Kontrast im rechten Bild der Abbildung 2 wesentlich schwächer aus. Die Abbildung des DNA Spots durch das ESCA Verfahren erfolgt direkt ohne jede zusätzliche Markierung.

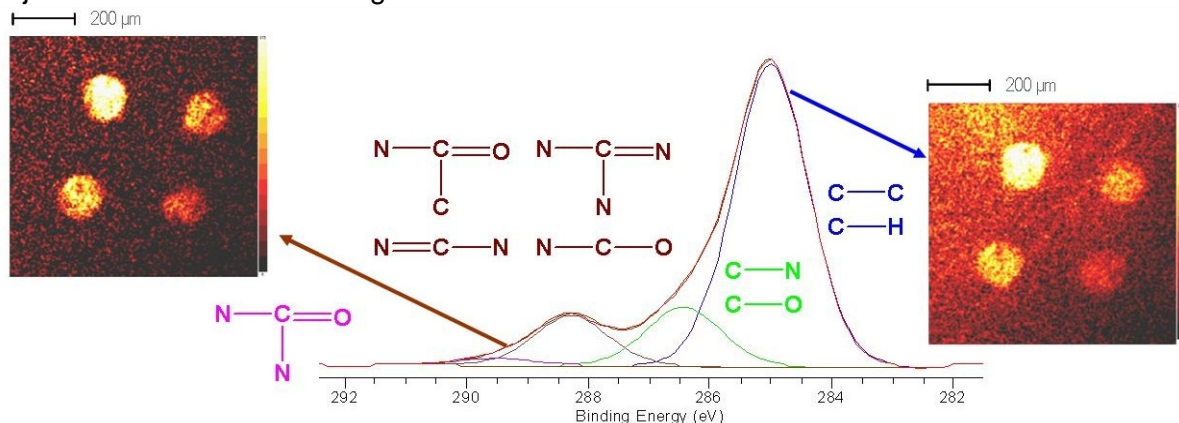


Abbildung 2: Hoch aufgelöstes Kohlenstoff C 1s Photoelektronenspektrum eines Einzelspots eines *E. coli* Microarrays (*Scienion AG*) gedruckt auf einem aminmodifizierten Glasträger. Die Komponenten des Spektrums repräsentieren quantitativ die koexistierenden Spezies im Spot. Das linke Bild zeigt einen hohen Kontrast, da hier die Photoemission DNA-spezifischer Kohlenstoffatome bei 288 eV bildgebend ausgenutzt wurde.

ToF-SIMS ist in gleicher Weise befähigt, die DNA Spots auf dem Objektträger durch die Abbildung DNA-spezifischer Fragmente zu identifizieren (siehe Abbildung 3 unten). Mit Hilfe intensiver Peaks, die auf Komponenten des Puffermediums zurückzuführen sind (zum Beispiel Cl⁻), kann ToF-SIMS auch die Binnenstruktur des Spots abbilden (siehe Abbildung 3, oben links). Im Beispiel finden sich deutliche Hinweise auf eine so genannte Donut-Struktur. Solche Unregelmäßigkeiten der Spotform sind unerwünscht, denn sie erschweren das Auslesen im Fluoreszenzmikroskop. Auch im überlagerten ESCA Bild der Elemente Kohlenstoff, Silizium und Stickstoff ist die Binnenstruktur des Spots deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 3, oben rechts).

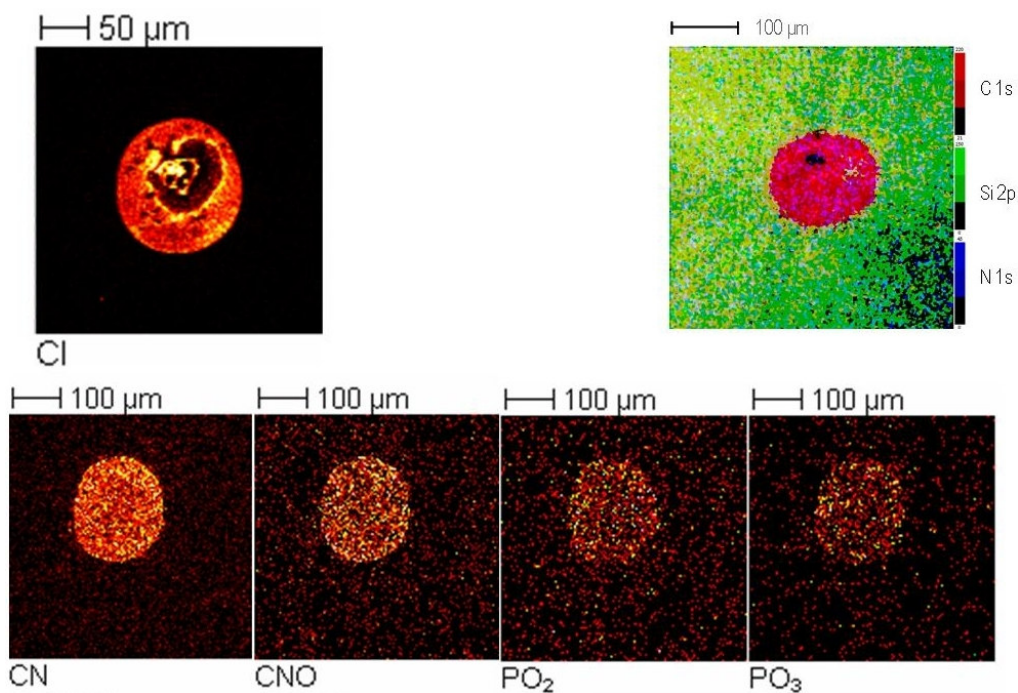


Abbildung 3: Oben: Negatives Cl⁻ ToF-SIMS Bild (links) und überlagertes XPS Elementverteilungsbild (C rot, Si grün, N blau) eines gespotteten *E. coli* DNA Microarrays (Scienion AG). Unten: Abbildungen DNA-spezifischer, negativer Sekundärfragmentionen (CN⁻, CNO⁻, PO₂⁻, PO₃⁻).

Es zeigt sich, dass sowohl mit abbildender ESCA als auch abbildender ToF-SIMS Analytik die Verteilung gespotteter Probenmoleküle direkt darstellbar ist. Auf das Anbringen von Fluorophoren als Marker kann verzichtet werden. Darüber hinaus kann die chemische Zusammensetzung individueller Spots charakterisiert werden. Beide Verfahren haben im Bereich der Entwicklung und Qualitätssicherung von Microarray-Technologien ein hohes Potential.

Kohlenhydrat-Microarrays ⁸

Die Erforschung zuckerbasierter Wechselwirkungen in biologischen Systemen wird zunehmend interessant. Aus diesem Grund bildet sich neben den beiden etablierten Gebieten der Genomik und Proteomik das noch relativ junge aber stetig wachsende Feld der Glykomik als dritte Anwendung der Microarray-Technologie aus.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Seeberger (MPI KG) sind erste Prototypen von Kohlenhydrat-Microarrays mittels ToF-SIMS und ESCA analysiert worden.⁸ Die grundlegende Idee hierbei ist eine weitgehende chemische Kontrolle während der einzelnen Produktionsschritte, also vom funktionalisierten Objektträger bis zum fertigen Microarray, mit dem Ziel der Verbesserung von Leistungsfähigkeit und Zuverlässigkeit.

Erste Ergebnisse sind in Abbildung 4 zusammengefasst. ESCA im abbildenden Modus zeigt, dass die Zuckermoleküle ausschließlich im gedruckten Bereich der Spots lokalisiert sind. Hierzu wurden die Kohlenstoffatome der Alkoholfunktion (C-OH, Bindungsenergie 286.5 eV) zur Abbildung genutzt, wohingegen die aliphatischen Kohlenstoffspezies (CC, CH) bei 285 eV über das gesamte Substrat verteilt sind (siehe Abbildung 4, links). Als Vergleich ist auch das ESCA C 1s Spektrum der *D*-Mannose gezeigt, welche die einfachste Grundeinheit des hier verwendeten Nonamannosids darstellt.

Auch die ToF-SIMS Analyse verdeutlicht noch mal die erfolgreiche Anbindung der Zuckermoleküle. Als Leitfragment für das Nonamannosid wird das HS⁻ Sekundärfragmentation genutzt. Auch bei diesem Microarray sind Abweichungen von der idealen Spotform erkennbar, zum Beispiel in den Intensitätsverteilungen der Sekundärfragmentationen C₂H₅O⁺ und C₂H₃O⁻ (siehe Abbildung 4, rechts).

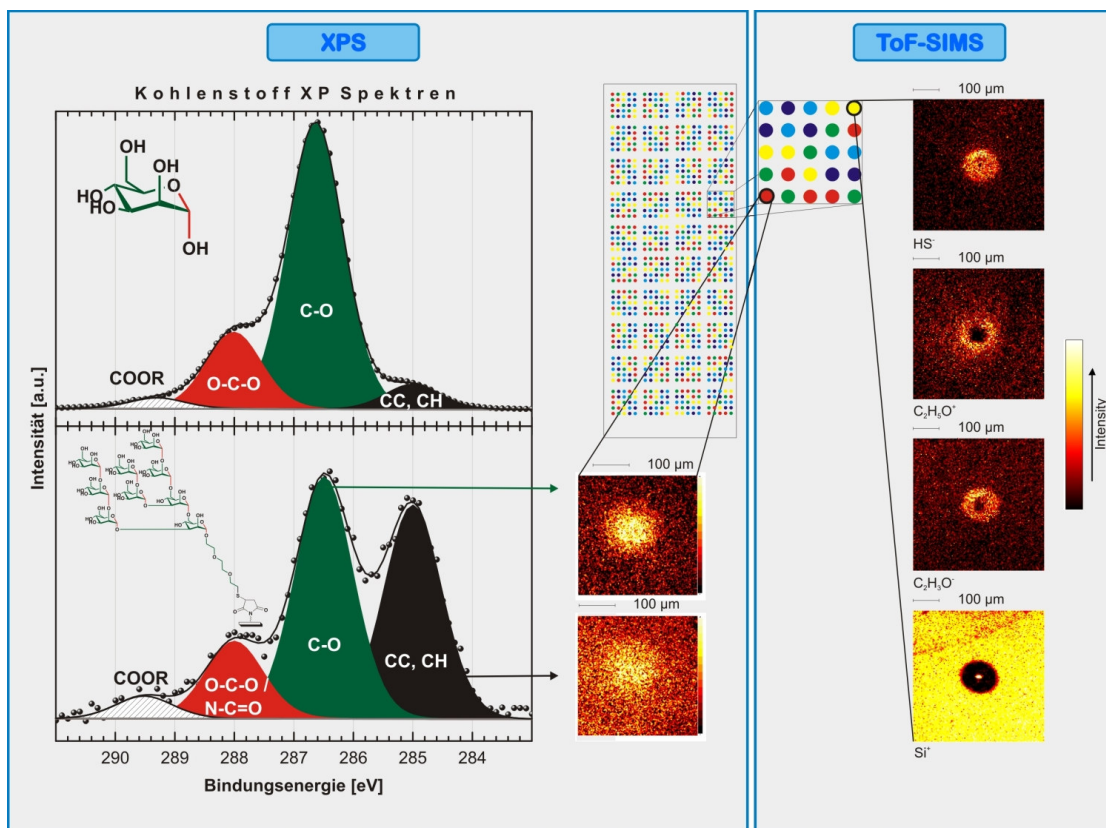


Abbildung 4: Links: Vergleich der Kohlenstoff ESCA Spektren eines einfachen Zuckers (Mannose, oben links) und eines Oligosaccharids innerhalb eines Spots, der auf eine maleinimidfunktionalisierte Glasoberfläche gespottet wurde (unten links). Rechts: ToF-SIMS Bilder der Verteilung einiger Sekundärionen einschließlich eines Leitfragments (HS⁻), welches spezifisch für das Oligosaccharid ist.

Plasma-gedruckte Amino Arrays⁹

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Claus-Peter Klages am FhG IST wurde ein ToF-SIMS Verfahren mit dem Ziel entwickelt, Microarrays, die mit einer DBD Plasmatechnologie auf Polymerfolien gedruckt werden (siehe Abbildung 5, links), bezüglich der lateralen Verteilung von Aminen über die Patch-Oberfläche zu charakterisieren. Die Plasmatechnologie muss so optimiert werden, dass eine möglichst homogene Verteilung der Amine über die Patch-Oberfläche erzielt wird. Abbildung 5, rechts zeigt einen Fall, in dem die gewählten Plasmaparameter zur unerwünschten inhomogenen Verteilung der Amine führen. Diese Verteilung kann durch abbildende ToF-SIMS Analyse dargestellt werden. Abbildung 6 zeigt unter anderem Verteilungsbilder von Sekundärfragmentationen, die charakteristisch für Amin-Spezies sind.^{9, 10} Deren inhomogene Verteilung, insbesondere der Abfall der Oberflächenkonzentration hin zu den Rändern der gedruckten Amino-Patches, ist deutlich erkennbar. Die durch Optimierung der Plasmaparameter erreichte homogene Verteilung der Amine wird durch abbildende ToF-SIMS im Direktverfahren validierbar.

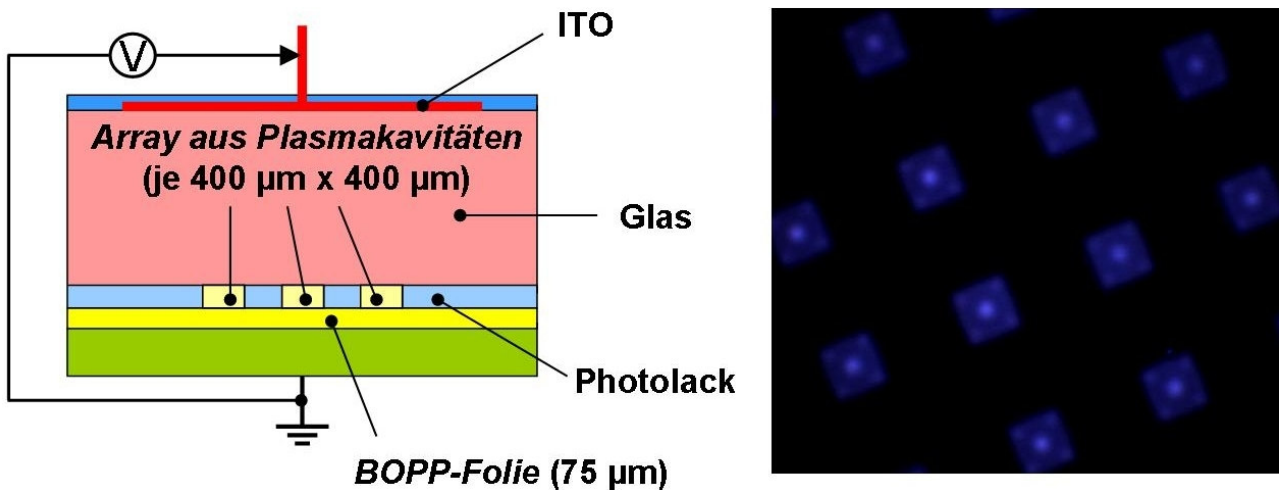


Abbildung 5: DBD Plasmadruckverfahren des FhG IST. Links: Prinzipieller Aufbau mit zu bedruckender Polymerfolie und Druckstempel mit einem Array von 400 x 400 µm² Mikrokavitäten in denen ein DBD Plasma in einer N₂/H₂ Atmosphäre gezündet wird. Rechts: Bilder einer inhomogenen Mikroentladung, aufgenommen durch die ITO/Glass-Schicht.

Field of view: 500.0 x 500.0 µm² BAM07443.MIF

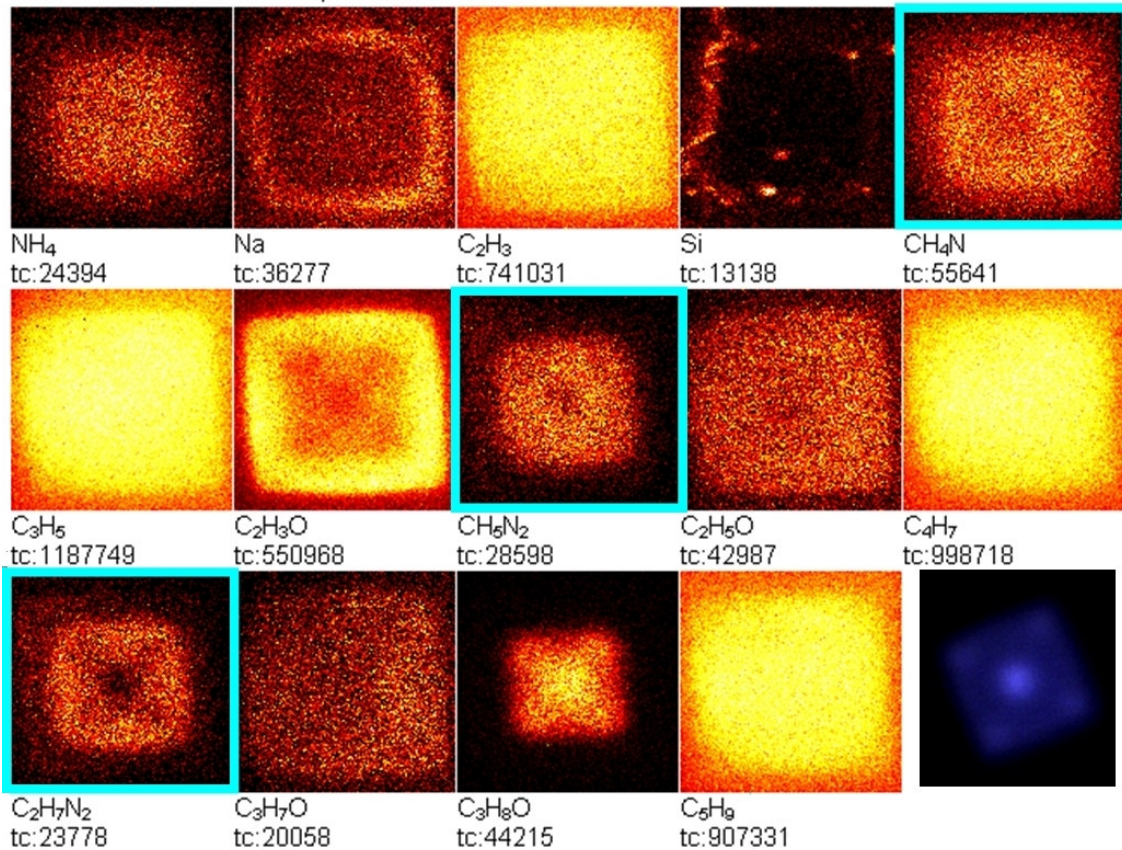


Abbildung 6: ToF-SIMS Verteilungsbilder von Sekundärfragmentionen, die an einem plasma-gedruckten Amino-Patch auf einem Microarray aufgenommen wurden. Gerahmt sind Verteilungsbilderaminspezifischer Fragmente. Rechts unten das entsprechende Bild der Plasmaentladung in der Mikrokavität.

Danksagung

Die dargestellten Inhalte sind eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse von Gemeinschaftsprojekten der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), der Scienion AG, dem Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung (MPI KG), dem National Physical Laboratory (NPL), der University of Nottingham und dem Fraunhofer-Institut für Schicht- und Oberflächentechnik IST (FhG IST), die während des 2. *Berlin-Brandenburger Technologieforums: In Vitro-Diagnostik und Bioanalytik* unter dem Titel „Optimierung von Microarrays durch Anwendung physikalischer Methoden der chemischen Oberflächenanalytik“ präsentiert wurden.

Zu danken ist den folgenden Kollegen: Dr. Th. Gross, Dr. N. Graf, Th. Wirth (alle BAM), Dr. W. Weigel (Scienion AG), Prof. Dr. P. H. Seeberger, T. Horlacher, R. Castelli (alle MPI), Dr. A. G. Shard (NPL), Dr. M. Alexander (University of Nottingham) und Prof C.-P. Klages und A. Hinze, (alle FhG IST).

P. Dietrich dankt der BAM für die finanzielle Unterstützung im Rahmen der Innovationsoffensive 2008, Projekt “Methoden zur Charakterisierung von Zwischen- und Endprodukten zur Herstellung von Microarrays für Forschung und Diagnostik”.

Literatur

- [1] A. L. Beaudet, J. W. Belmont, *Annual Review of Medicine* 2008, 59, 113.
- [2] D. G. Castner, B. D. Ratner, *Surface Science* 2002, 500, 28.
- [3] J. Sobek, K. Bartscherer, A. Jacob, J. D. Hoheisel, P. Angenendt, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 2006, 9, 365.
- [4] N. Graf, A. Lippitz, T. Gross, F. Pippig, A. Holländer, W. Unger, *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 396, 725.
- [5] P. M. Dietrich, N. Graf, T. Gross, A. Lippitz, B. Schüpbach, A. Bashir, C. Wöll, A. Terfort, W. E. S. Unger, *Langmuir* 2010, 26, 3949.
- [6] N. Graf, T. Gross, T. Wirth, W. Weigel, W. Unger, *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393, 1907.
- [7] W. E. S. Unger, N. Graf, T. Gross, T. Wirth, W. Weigel, *BIOforum Europe* 2008, 14.
- [8] P. M. Dietrich, T. Horlacher, T. Gross, T. Wirth, R. Castelli, A. G. Shard, M. Alexander, P. H. Seeberger, W. E. S. Unger, *Surf. Interface Anal.* 2010, 42, 1188.
- [9] A. Hinze, C.-P. Klages, A. Zänker, M. Thomas, T. Wirth, W. E. S. Unger, *Plasma Processes Polym.* 2008, 5, 460.
- [10] U. Oran, S. Swaraj, A. Lippitz, W. E. S. Unger, *Plasma Processes Polym.* 2006, 3, 288.