

# Herstellung von Proteinmustern durch Schreiben in proteinabweisende Matrizen\*\*

Nirmalya Ballav, Heidi Thomas, Tobias Winkler, Andreas Terfort und Michael Zharnikov\*

Eine Herausforderung der modernen Nanotechnologie ist die Entwicklung zuverlässiger, effizienter und anpassungsfähiger Methoden zur Herstellung geordneter und komplexer Proteinmuster. Solche Muster sind von entscheidender Bedeutung für die Biologie und die medizinischen Disziplinen. Beispiele hierfür sind die Proteomik, Immunassay-Chips, Zellforschung, pharmazeutische Screenings nach potenziellen Wirkstoffen sowie die Kodierung biologischer Richtungsinformation, insbesondere für die Migration. Ein essenzieller Bestandteil nahezu aller verfügbarer Techniken<sup>[1–9]</sup> ist eine proteinabweisende Hintergrundmatrix, die die aktiven, proteinadsorbierenden Bereiche umgibt und die Anlagerung von Proteinen außerhalb dieser Bereiche verhindert. Solch eine Matrix besteht üblicherweise aus Oligo- oder Polyethylenglycol-basierten Materialien wie Polymerfilmen oder selbstorganisierten Monoschichten (SAMs) und wird im Allgemeinen durch Auffüllen des Hintergrunds des zuvor hergestellten proteinadhäsiven Musters erhalten.

Wir stellen hier einen alternativen Ansatz vor, bei dem die proteinabweisende Matrix, bestehend aus einer SAM oder einem Polymer, zum direkten Elektronenstrahl Schreiben eines Templates für nichtspezifische wie spezifische Proteinmuster jeglicher Form, Gradienten eingeschlossen, auf einer variablen Längenskala genutzt werden kann. Diese Faktoren machen den Ansatz interessant für eine Vielzahl von Anwendungen, was durch die Vielseitigkeit der Elektronenstrahlolithographie (EBL), den breiten Bereich einstellbarer Elektronenenergien, die kommerzielle Verfügbarkeit zahlreicher Oligoethylenglycol(OEG)-Verbindungen, verschiedene Substratmaterialien sowie die Auswahlmöglichkeiten beim Zielprotein gestärkt wird. Der Ansatz ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. In den Tests wurden hauptsächlich proteinabweisende SAMs aus OEG-substituierten Alkanthiolen,  $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_{11}\text{SH}$  mit  $n=3$  und 7 (EG3 bzw. EG7), auf bedampften Au(111)-Substraten genutzt.

Üblicherweise ist der erste Schritt zur Erzeugung von Proteinmustern die Herstellung eines chemischen Templates

aus einer SAM. Solch ein Template kann durch eine Kombination aus direktem Schreiben (von Molekülen mit spezifischer Bindungsstelle für Proteine oder intermediäre Reste oder andere geeignete Vermittlermoleküle) und Auffüllen (OEG-basierte Moleküle), wie es beispielsweise beim Mikrokontaktdruck oder bei der Dip-pen-Lithographie der Fall ist, erhalten werden.<sup>[1,4,7]</sup> Im Fall der EBL gelingt die Herstellung eines chemischen Templates für die Proteinadsorption durch Transformation spezifischer Schwanzgruppen aromatischer SAMs<sup>[9,10]</sup> oder durch strahlungsinduzierte Austauschreaktion (IPER), wobei Moleküle in einer aliphatischen SAM durch andere Moleküle substituiert werden.<sup>[11]</sup> Der erstgenannte Ansatz erfordert allerdings einen zusätzlichen Arbeitsschritt, nämlich das Auffüllen nichtbestrahlter Bereiche durch OEG-basierte Moleküle, der langsam verläuft.<sup>[9]</sup> Die Einsatzmöglichkeiten der IPER sind aufgrund der geringen Effizienz im Fall von langkettigen OEG-basierten SAMs<sup>[12]</sup> ebenfalls eingeschränkt. Daher wurden bisher nur inverse Proteinmuster (proteinabweisende Muster auf proteinadsorbierendem Untergrund) durch IPER hergestellt.<sup>[11]</sup>

In Anbetracht dieser Probleme könnte man erwägen, aliphatische SAMs, ähnlich den aromatischen Filmen, direkt zu strukturieren. Im Unterschied zu letzterem System kann die Schwanzgruppe aliphatischer SAMs allerdings normalerweise nicht spezifisch durch Elektronenbestrahlung modifiziert werden, ohne erheblichen Schaden innerhalb des Films zu verursachen und die Qualität des Templates zu verschlechtern.<sup>[13]</sup> Wir fanden jedoch, dass dieses Problem im Fall von OEG-terminierten SAMs nicht auftritt. Röntgenphotoelektronenspektroskopie(XPS)-Daten (siehe Abbildung 2a sowie Abbildung SI1 der Hintergrundinformationen) zeigen, dass der OEG-Teil solcher Filme gegenüber Elektronenbestrahlung sehr empfindlich ist (ein ähnliches Verhalten wurde kürzlich für UV-Bestrahlung beobachtet).<sup>[14]</sup> Diese Gruppe wird durch die Bestrahlung in hohem Maße verändert, und das sogar schon bei sehr niedrigen Dosen ( $\leq 1 \text{ mC cm}^{-2}$ ), bei denen sowohl der aliphatische Teil als auch die Thiolat-Ankergruppe der SAM größtenteils intakt bleiben, sodass die vollständige Anbindung der Moleküle an das Substrat bewahrt wird.<sup>[13]</sup> Durch den elektroneninduzierten Abbau der OEG-Kette nimmt die effektive Dicke der OEG-SAMs im Zuge der Bestrahlung allmählich ab (Abbildung 2b).

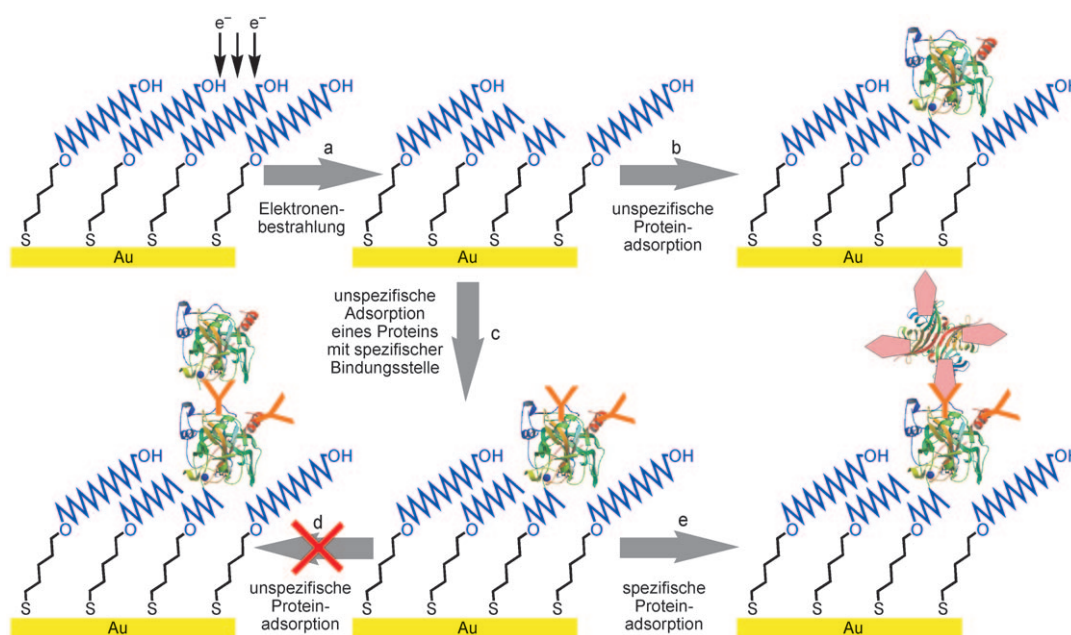
Neben dieser Dickenreduktion führt die Spaltung der C-O-Bindungen in den EG-Einheiten zum Auftreten chemisch aktiver Stellen, die in den folgenden Schritten Proteine unspezifisch binden können. Die Adsorbatmenge wird dabei durch die Dichte dieser Stellen bestimmt, also letztlich durch die primäre Strahlungs-dosis. Wie in Abbildung 2b gezeigt (vgl. auch Abbildung SI2 der Hintergrundinformationen), führt eine fortschreitende Bestrahlung der EG7- und EG3-

[\*] Dr. N. Ballav, Prof. Dr. M. Zharnikov  
Angewandte Physikalische Chemie  
Universität Heidelberg, 69120 Heidelberg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6221-54-6199  
E-Mail: michael.zharnikov@urz.uni-heidelberg.de

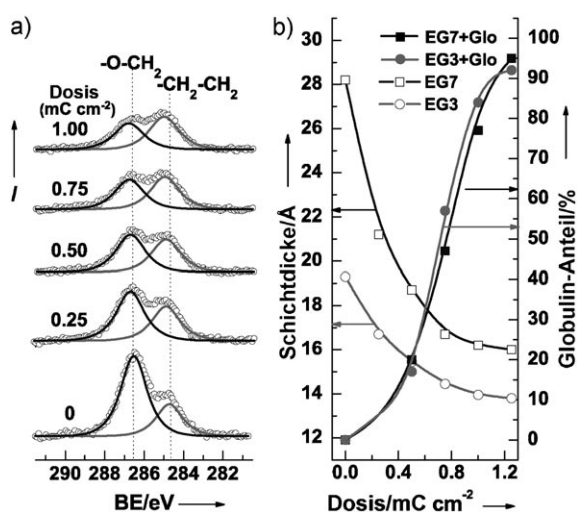
H. Thomas, Dr. T. Winkler, Prof. Dr. A. Terfort  
Institut für Anorganische und Analytische Chemie  
Goethe-Universität Frankfurt, 60438 Frankfurt (Deutschland)

[\*\*] Dieses Projekt wurde durch die DFG gefördert (ZH 63/9-2 und Te 247/6-2). Wir danken M. Grunze für seine Unterstützung und S. Schilp für die Hilfe bei der Elektronenstrahlolithographie.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200900950> zu finden.



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung des Verfahrens. Durch EBL wird direkt das Template für die Proteinmuster in einen OEG-basierten SAM- oder Polymerfilm geschrieben (a). Dieses Template kann entweder direkt für die nichtspezifische Anbindung von Proteinen verwendet werden (b) oder mit einem Protein belegt werden, das eine Bindungsstelle für eine folgende spezifische Adsorption eines anderen Proteins trägt (c). Das spezifisch modifizierte Template adsorbiert ausschließlich dieses bestimmte Zielprotein (d,e). In jedem Fall wird das Ausmaß der Proteinadsorption durch die primäre Strahlungsdosis bestimmt. Als Beispiel ist ein Thiolat-SAM auf einem Goldsubstrat gezeigt. Der Ansatz sollte auf alle OEG-basierten SAM- oder Polymerfilme auf jedem Substrat anwendbar sein, vorausgesetzt, der Primärfilm ist proteinabweisend.



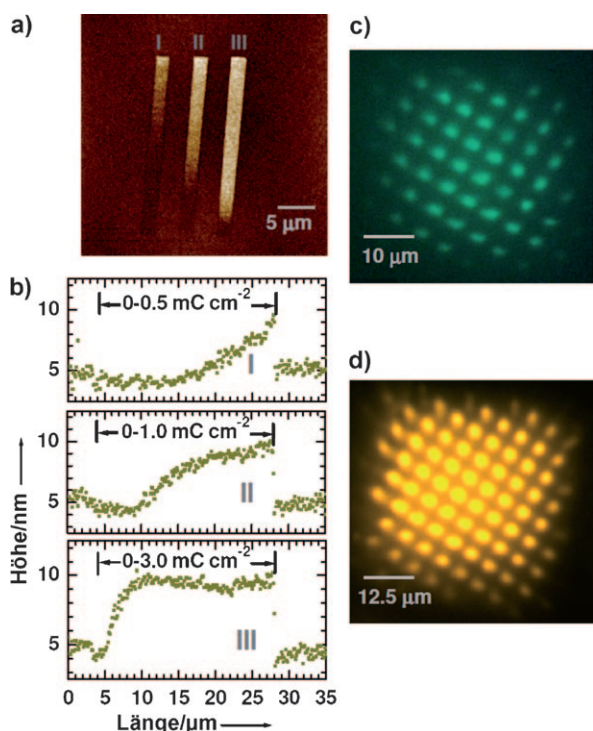
**Abbildung 2.** a) C1s-XP-Spektren der unbehandelten und elektronenstrahlmodifizierten EG7/Au-SAMs. In den Spektren werden zwei Signale sichtbar, die den OEG- (schwarz) und Alkan-Teilen (grau) der EG7-Moleküle zugeordnet werden können. b) Dicke der EG7/Au- (schwarz) und EG3/Au-Filme (grau; offene Symbole) und Anteil des adsorbierten Globulins auf den elektronenstrahlmodifizierten EG7/Au- (schwarz) und EG3/Au-SAMs (grau; gefüllte Symbole) als Funktion der Strahlungsdosis. Die Globulinbedeckung bezieht sich auf einen 1-Monoschicht-Film auf einer DDT/Au-SAM als 100%.

SAMs zu einer Proteinaffinität, die bis zur Sättigung zunimmt und bei höheren Dosen 100% der Affinität einer Dodecanthiolat(DDT)-SAM erreicht. Da eine erhebliche Proteinadsorption sogar bei kleinen Schichtdickenabnahmen auftritt, vor allem bei EG3/Au, sind offensichtlich nicht die bei der

Dickenreduktion auftretenden „Löcher“ in der Primärmatrize,<sup>[15]</sup> sondern neu gebildete, chemisch aktive Stellen für die Proteinbindung von Bedeutung. In jedem Fall lässt sich aber die Proteinbedeckung über die Dosis präzise einstellen: von 0 bis hin zu den Werten, die typisch sind für Oberflächen mit hoher Proteinaffinität (DDT-SAMs).

Wird dieser Ansatz mit Lithographie kombiniert, kann man jedes gewünschte Proteinmuster, einschließlich Gradienten, herstellen. Als Beispiel ist in Abbildung 3a eine AFM-Aufnahme eines Gradientenmusters von Fibrinogen, umgeben von einer unbehandelten proteinabweisenden EG7-Matrix, gezeigt. Die Höhenprofile entlang der Streifen (Abbildung 3b) spiegeln verschiedene Gradienten der Strahlungsdosis wider. Anhand dieser Profile ist ersichtlich, dass alle drei Gradienten wohldefiniert sind und die Proteinbedeckung präzise mit der Strahlungsdosis korreliert. Die Gradientenprofile stimmen gut mit den Proteinbedeckungskurven aus Abbildung 2b überein und geben unter anderem das typische verzögerte Einsetzen bei niedrigen Dosen wieder. Zudem variiert die Proteinbedeckung am Streifen I graduell, während bei den steileren Gradienten an den Streifen II und III eine Sättigung erreicht wird (Abbildung 3).

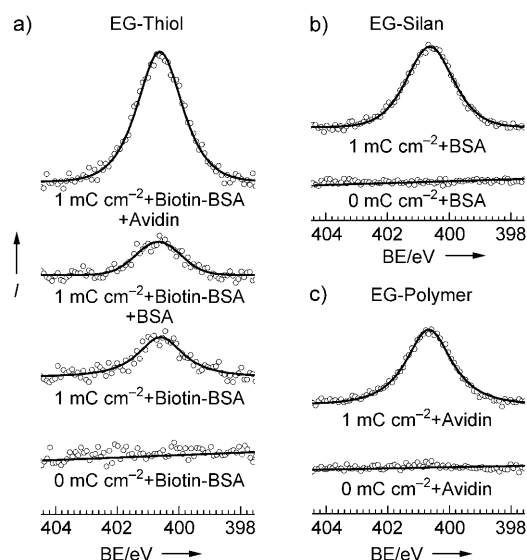
Die Sättigungsdosis beträgt ungefähr  $0.5 \text{ mC cm}^{-2}$ ; ihre Differenz zum analogen Wert in Abbildung 2b (ca.  $1.25 \text{ mC cm}^{-2}$ ) resultiert aus den verschiedenen kinetischen Energien der Elektronen, die für die großflächigen spektroskopischen Experimente (10 eV) und die Lithographie (1 keV) genutzt wurden.<sup>[16]</sup> Bemerkenswert ist, dass im Vergleich zu vielen anderen Techniken<sup>[17–19]</sup> nicht nur lineare oder radiale Gradienten, sondern auch Gradientenmuster jeglicher Form durch EBL erhalten werden können.<sup>[20]</sup> Einfache peri-



**Abbildung 3.** a) AFM-Aufnahme eines Proteingradientenmusters, das durch die Adsorption von Fibrinogen auf einer elektronenstrahlmodifizierten EG7/Au-SAM erhalten wurde. Die Strahlungsdosis wurde für die jeweiligen Streifen I, II und III graduell von 0 bis 0.5, 1.0 bzw. 3.0  $\text{mC cm}^{-2}$  variiert. b) Höhenprofile entlang der Streifen. Das Ausmaß der Fibrinogenadsorption folgt klar der primären Strahlungsdosis. c) Lichtmikroskopische Aufnahme des Punktmusters, das nach Adsorption von AlexaFluor488/HSA-Konjugat auf einer bestrahlten EG7/Au-SAM erhalten wurde. d) Lichtmikroskopische Aufnahme eines Punktmusters, das nach der Adsorption des AlexaFluor546-Konjugats von Streptavidin auf das obige Templat erhalten wurde, wenn dieses zuvor mit Biotin-BSA behandelt worden war.

odische Muster können ebenfalls hergestellt werden, wie in Abbildung 3c gezeigt. Dieses lichtmikroskopisch erhaltene Muster wurde zuvor in eine EG7/Au-SAM geschrieben, die anschließend mit einem AlexaFluor488-Konjugat von humanem Serumalbumin (HSA) behandelt wurde.

Diese mithilfe von EBL auf OEG-Schichten erhaltenen Muster können direkt für die nichtspezifische Adsorption jeden Proteins verwendet werden. Interessanter ist aber die Überführung in ein spezifisches Templat, indem zunächst ein Protein mit einer Bindungsstelle für die darauffolgende spezifische Adsorption eines anderen Proteins abgeschieden wird. Dieses Konzept wurde mithilfe der Biotin-Avidin-Kombination umgesetzt, die häufig in Screening-Assays genutzt wird.<sup>[21]</sup> Das Ergebnis ist in Abbildung 4a gezeigt. Um die Proteinadsorption zu verfolgen, wurden die N1s-XPS-Signale für Proteine gemessen. Als Primär-SAM wurde EG7/Au genutzt, die keine Affinität zu allen in dieser Studie eingesetzten Proteinen zeigt. Im ersten Schritt wurde EG7/Au mit Elektronen bestrahlt ( $1 \text{ mC cm}^{-2}$ ) und Biotin-konjugiertem bovinem Serumalbumin (Biotin-BSA) ausgesetzt, was ein charakteristisches N1s-XPS-Signal ergab. Die Exposition des modifizierten Templats mit einem nichtspezifischen Protein, z.B. bovinem Serumalbumin (BSA), führte zu keiner



**Abbildung 4.** a) N1s-XPS-Spektrum nach direkter oder aufeinanderfolgender Adsorption von Biotin-BSA, BSA und Avidin auf der unbehandelten und elektronenstrahlmodifizierten EG7/Au-SAM. b) N1s-XPS-Spektren nach Adsorption von BSA auf dem unbehandelten und elektronenstrahlmodifizierten EG-Silan/Si-Film. c) N1s-XPS-Spektren nach Adsorption von Avidin auf dem unbehandelten und elektronenstrahlmodifizierten EG-Polymer/Si-Film.

Änderung des XPS-Spektrums. Erwartungsgemäß fand also keine weitere Proteinadsorption statt. Dagegen führte das Eintauchen desselben Templats in eine Lösung des spezifisch bindenden Proteins Avidin zu einer signifikanten Erhöhung der N1s-Intensität, was die spezifische Adsorption anzeigt. Dieses Ergebnis wird durch die fluoreszenzmikroskopischen Daten in Abbildung 3d gestützt, in der ein Punktmuster eines AlexaFluor546-Konjugats von Streptavidin auf dem Biotin-BSA-EG7/Au-Templat gezeigt ist. Erwähnenswert ist, dass die selektive Anbindung auch in umgekehrter Reihenfolge abläuft, d.h. durch nichtspezifische Adsorption von Avidin gefolgt von einer spezifischen Adsorption von Biotin-BSA (Abbildung SI3 der Hintergrundinformationen).

Dieser Ansatz ist nicht auf SAMs auf Goldsubstraten beschränkt, sondern kann auf alle OEG-basierten Filme angewendet werden, einschließlich SAM- und Polymerfilmen auf Silicium oder Glas. Dafür wurden Filme OEG-substituierter Trichlorsilane mit verschiedenem langem OEG-Teil verwendet. In einem Fall (EG6-Silan) enthielt dieser Teil nur sechs EG-Einheiten, wodurch der Film nicht gegen alle Proteine resistent war (bei Siliciumsubstraten sind mehr als sechs EG-Einheiten für die komplette Abweisung von Proteinen nötig).<sup>[22]</sup> Mit dem geeigneten BSA konnte jedoch das Konzept erfolgreich demonstriert werden (Abbildung 4b). In einem anderen Fall (EG-Polymer) enthielt der EG-Teil etwa 2000 Einheiten, sodass eher ein Polymerfilm denn eine SAM vorlag. Dieser Film wies alle getesteten Proteine ab – auch Avidin, das als Testmolekül verwendet wurde.

Wie in den Abbildungen 4b und c gezeigt, begünstigt die Elektronenbestrahlung von EG6-Silan- und EG-Polymer-Filmen die Proteinadsorption: Während für nichtbestrahlte und anschließend mit BSA oder Avidin behandelte Filme



kein charakteristisches N1s-XPS-Signal beobachtet werden kann, erscheint dieses Signal nach der Elektronenbestrahlung. Dies deutet darauf hin, dass alle für die EG3/Au- und EG7/Au-SAMs beschriebenen Ergebnisse auch für andere OEG-basierte Filme auf verschiedenen Substraten zutreffend sind. Solch allgemeines Verhalten ist ein klares Anzeichen dafür, dass Proteine direkt an die modifizierte OEG-Matrix binden. Diese Bindung wird vermutlich durch chemische Bindungsstellen herbeigeführt, die bei der Elektronenbestrahlung entstehen. Die Bindung ist recht robust; das Proteinmuster bleibt auch nach intensivem Waschen und nachfolgender Bearbeitung intakt.

Zusammenfassend haben wir einen allgemeinen und einfachen Ansatz zur Herstellung von Proteinmustern vorgestellt. Er beinhaltet die einstufige Herstellung eines chemischen Templats für die nichtspezifische Proteinadsorption – durch direktes Elektronenstrahlschreiben in einen OEG-basierten, proteinabweisenden Film. Dieser Film kann eine SAM oder ein Polymerfilm sein und auf beliebigen Substraten vorliegen. Die erforderliche Strahlungsdosis ist um zwei Größenordnungen niedriger als bei einem alternativen mehrstufigen EBL-Ansatz.<sup>[9,10]</sup> Das nichtspezifische Template kann einfach, durch Adsorption eines Mediatorproteins mit spezifischer Bindungsstelle für ein sekundäres Zielprotein, in ein spezifisches Template umgewandelt werden.

Die EBL ermöglicht die Erstellung von Mustern im cm-bis nm-Bereich.<sup>[11,20,23]</sup> Hinsichtlich der Form der Muster gibt keine Einschränkungen; auch komplexe Gradientenmuster für Assays<sup>[20]</sup> sind herstellbar. Solche Muster können zur Simulation natürlicher biologischer Grenzflächen dienen, denn diese Grenzflächen weisen oft Gradienten auf, um gerichtete biologische Informationen zu codieren und zu vermitteln. Solche Modelloberflächen können als vielseitige Assays, z. B. für Studien zu Zellwachstum, Differenzierung und Migration von Zellen<sup>[24]</sup> oder Bakterienadhäsion<sup>[25]</sup> verwendet werden.

Während komplizierte Muster nur mithilfe eines fokussierten Elektronenstrahls, z. B. mit einem kommerziell erhältlichen Lithographieaufbau,<sup>[20]</sup> geschrieben werden können, können weniger komplexe Muster mit Maskenverfahren in einfachen Apparaturen hergestellt werden.<sup>[23]</sup> Der Ansatz kann auch auf Röntgenstrahl-<sup>[26]</sup> oder UV-Lithographie<sup>[9,27]</sup> erweitert werden. So können interferographische Techniken eingeschlossen werden, die für die nanometergenaue Herstellung beliebig großer Arrays geeignet sind.<sup>[9,25]</sup>

## Experimentelles

EG7 und EG-Silan-Verbindungen wurden gemäß Literaturvorschriften hergestellt (siehe Hintergrundinformationen). Die SAMs wurden durch Eintauchen nach Standardvorschriften hergestellt. Sie wurden entweder großflächig mit Elektronen bestrahlt (10 eV) oder mithilfe von Elektronen mit 10 eV (Punktmuster) oder 1 keV (Gradientenmuster) strukturiert. Anhand der homogen bestrahlten SAM-Proben wurden die Auswirkungen der Elektronenbestrahlung mit XPS untersucht. Die Proteinadsorption auf diesen Substraten und SAM-Mustern wurde nach Standardvorschriften durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durch XPS, wofür die charakteristische N1s-Emission genutzt wurde. Die Proteinmuster wurden durch Raster-

kraftmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Details sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen.

Eingegangen am 18. Februar 2009,  
veränderte Fassung am 31. März 2009  
Online veröffentlicht am 6. Juli 2009

**Stichwörter:** Chemische Lithographie · Gradientenmuster · Proteinmuster · Selbstorganisierte Monoschichten

- [1] M. Mrksich, C. S. Chen, Y. Xia, L. E. Dike, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 10775.
- [2] E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, H. Biebuyck, *Science* **1997**, 276, 779.
- [3] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 568; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 550.
- [4] A. S. Blawas, W. M. Reichert, *Biomaterials* **1998**, 19, 595.
- [5] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Science* **2000**, 289, 1760.
- [6] J. R. Kenseth, J. A. Harnisch, V. W. Jones, M. D. Porter, *Langmuir* **2001**, 17, 4105.
- [7] K. B. Lee, S. J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith, M. Mrksich, *Science* **2002**, 295, 1702.
- [8] J. Gu, C. M. Yam, S. Li, C. Cai, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8098.
- [9] A. Turchanin, A. Tinazli, M. El-Desawy, H. Großmann, M. Schnietz, H. H. Solak, R. Tampe, A. Götzhäuser, *Adv. Mater.* **2008**, 20, 471.
- [10] W. Eck, V. Stadler, W. Geyer, M. Zharnikov, A. Götzhäuser, M. Grunze, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 805.
- [11] T. Winkler, N. Ballav, H. Thomas, M. Zharnikov, A. Terfort, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 7348; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 7238.
- [12] N. Ballav, A. Shaporenko, S. Krakert, A. Terfort, M. Zharnikov, *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 7772.
- [13] M. Zharnikov, M. Grunze, *J. Vac. Sci. Technol. B* **2002**, 20, 1793.
- [14] M. Montague, R. E. Ducker, K. S. L. Chong, R. J. Manning, F. J. M. Rutten, M. C. Davies, G. J. Leggett, *Langmuir* **2007**, 23, 7328.
- [15] J. Rundqvist, J. H. Hoh, D. B. Haviland, *Langmuir* **2006**, 22, 5100.
- [16] M. Steenackers, A. Küller, N. Ballav, M. Zharnikov, M. Grunze, R. Jordan, *Small* **2007**, 3, 1764.
- [17] M. Riepl, M. Östblom, I. Lundström, S. C. T. Svensson, A. W. D. Van der Gon, M. Schäferling, B. Liedberg, *Langmuir* **2005**, 21, 1042.
- [18] T. Kraus, T. Kraus, R. Stutz, T. E. Balmer, H. Schmid, L. Malachukin, N. D. Spencer, H. Wolf, *Langmuir* **2005**, 21, 7796.
- [19] J. Genzer, R. R. Bhat, *Langmuir* **2008**, 24, 2294.
- [20] a) N. Ballav, S. Schilp, M. Zharnikov, *Angew. Chem. Int.* **2008**, 120, 1443; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1421; b) S. Schilp, N. Ballav, M. Zharnikov, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6891; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6786.
- [21] H. LeVine III, *Anal. Biochem.* **2006**, 356, 265.
- [22] C. M. Yam, J. M. Lopez-Romero, J. Gu, C. Cai, *Chem. Commun.* **2004**, 2510.
- [23] N. Ballav, A. Shaporenko, A. Terfort, M. Zharnikov, *Adv. Mater.* **2007**, 19, 998.
- [24] L. Liu, B. D. Ratner, E. H. Sage, S. Jiang, *Langmuir* **2007**, 23, 11168.
- [25] E. A. Burton, K. A. Simon, S. Hou, D. Ren, Y.-Y. Luk, *Langmuir* **2009**, 25, 1547.
- [26] R. Klausner, I.-H. Hong, M.-L. Huang, S.-C. Wang, T. J. Chuang, A. Terfort, M. Zharnikov, *Langmuir* **2004**, 20, 2050.
- [27] S. Ou Kim, H. H. Solak, M. P. Stoykovich, N. J. Ferrier, J. J. de Pablo, P. Nealey, *Nature* **2003**, 424, 411.